

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
自中華民國102年10月15日生效
NIEA B901.14B

一、方法概要

本方法主要係以水蚤 (*Daphnia*) 為試驗生物，以靜水式生物毒性試驗方法檢測生物急毒性，計算 48 小時之半致死濃度 (lethal concentration 50%, LC₅₀) 或急毒性單位 (acute toxic unit, TU_a)。

二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥之生物急毒性檢測。

三、干擾

- (一) 生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體侵入、馴養水或稀釋水含有有毒物質、器皿或試驗容器未洗淨致殘留有有毒物質，會影響水蚤健康且可能造成耐受性改變。
- (二) 水蚤因飼料品質不佳、餵食量不足或水質劣化等因素，導致生長狀況不佳，影響耐受性。

四、設備及材料

- (一) 水蚤：使用 *Daphnia pulex* 或 *Daphnia magna* (圖一及圖二)。應記錄水蚤來源，分類鑑定可參考十一、(一)及十一、(二)。
- (二) 生物馴養及毒性試驗室(箱)：須為獨立之空間，通風良好，無化學氣體影響，且可屏蔽外界干擾(如噪音、震動、強光、人為驚擾等)。馴養及試驗區域宜加以區分，以避免污染。光照強度同一般工作亮度。
- (三) 溫度控制設備：可使用循環式水浴槽、空調、恆溫培養箱等方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在 25 ± 2 。
- (四) 採樣容器：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：可使用體積 2 L 以上之硼矽玻璃燒杯。

- (六) 試驗容器：30 mL 以上之硼矽玻璃容器或拋棄式聚苯乙烯 (polystyrene) 容器。
- (七) 量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。
- (八) 廣口滴管：開口直徑須為 4 mm 以上，亦可將塑膠滴管剪短替代。
- (九) 溫度監測裝置：須可顯示毒性試驗期間試驗水樣之最高及最低溫度
- (十) 溶氧測定儀
- (十一) pH 計
- (十二) 導電度計
- (十三) 餘氯計
- (十四) 水質硬度計或水質硬度檢測試劑組
- (十五) 分析天平：可精秤至 0.1 mg。
- (十六) 曝氣設備
- (十七) 均質機 (blender)：水蚤飼料配製用。
- (十八) 水蚤飼料：選取下列成份混合配製而成，配製方法詳見附錄一：
 1. 魚飼料：1 號鱒魚飼料、薄片飼料或成份類似之魚飼料。
 2. 乾酵母粉：酵母粉內之酵母菌含量會隨時間遞減，故建議使用新鮮之烘焙用酵母粉。
 3. 草葉粉：小麥草葉粉、大麥草葉粉或紫花苜蓿草葉粉。
 4. 螺旋藻粉及小球藻粉。

五、試劑

- (一) 試劑水：比電阻值須大於 10 M⁻¹-cm。
- (二) 稀釋水：使用 *D. pulex* 須用中硬度稀釋水，使用 *D. magna* 須用高硬度稀釋水，成份如表一，添加試劑純度須為試藥級以上。可根據檢測需求量，依配方比例配製。20 L 稀釋水之建議配製程序如

下：

1. 將碳酸氫鈉、七水硫酸鎂及氯化鉀加入 18 L 試劑水中，曝氣隔夜使試藥充分溶解。
2. 將二水硫酸鈣加入 2 L 試劑水中，充分攪拌使其完全溶解後，再加入前述 18 L 液體中。

試藥完全溶解後，劇烈曝氣至少 8 小時，再測定硬度是否落於範圍內。室溫下避光保存不宜超過 14 天。

(三) 馴養水：可使用稀釋水、去氯自來水（註 1）、無污染之地下水等作為馴養水。馴養水之硬度應與稀釋水一致，可混合適量之逆滲透水或試劑水進行調整。

(四) 參考毒物：氯化鈉，試藥級以上。

(五) 10% (v/v) 鹽酸或硝酸：試藥級以上。

(六) 丙酮：殘量級。

六、採樣及保存

(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)」。水樣量須以能做完所需檢測為度，但不得少於 500 mL。

(二) 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 4 ± 2 。

(三) 水樣必須在採樣後 36 小時內開始進行確定試驗。

七、步驟

(一) 試驗準備

1. 水蚤馴養：如附錄一。

2. 試驗容器清洗：

(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) 接觸過放流水的玻璃器皿（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，用清潔劑刷洗內壁，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. 以試劑水潤洗 3 次。

F. 進行毒性試驗前，再以稀釋水潤洗 1 次。

3. 試驗前之水樣準備：

(1) 先將水樣靜置半小時，待粗顆粒沈降後，再取上層液進行試驗。

(2) 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。

4. 時齡不超過 24 小時之水蚤製備：製備方式如附錄一。試驗開始之 2 小時前須先餵食。

(二) 範圍尋找試驗 (range - finding test)

1. 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。放流水生物急毒性檢測則不須進行範圍尋找試驗。

2. 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 25 mL 以上，以 1 個試驗容器盛裝。

3. 每一濃度之試驗生物總數均為 5 隻。用廣口滴管將時齡不超 24 小時之水蚤移入試驗容器，每個容器各放 5 隻。

4. 試驗期間水蚤不須餵食，水溫應控制在 25 ± 2 ，光照時間應維持每天 16 ± 1 小時。

5. 觀察 8 至 24 小時水蚤存活數量並記錄。試驗結果作為確定試驗稀釋方式之參考。

(三) 確定試驗 (definitive test)

1. 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 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。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(註 2)。
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,再以廣口滴管各放 5 隻時齡不超過 24 小時之水蚤。
5. 試驗期間,水蚤不須餵食,水溫應控制在 25 ± 2 , 光照時間應維持每天 16 ± 1 小時。
6. 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。另試驗結束後,須測量並記錄最高濃度試驗水樣之溶氧及 pH,並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

八、結果處理

(一) 48 小時 LC_{50} 計算:

1. 計算各試驗濃度之 48 小時水蚤死亡總數及水蚤死亡百分率:

$$\text{水蚤死亡總數} = 20 - (\text{4 個試驗容器之水蚤存活數量加總})$$

$$\text{水蚤死亡百分率} = \text{水蚤死亡總數} \div 20 \times 100\%$$

2. 以下列 4 種方法計算 48 小時 LC_{50} :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)。方法取捨依圖三之流程作判斷，詳細計算方式請參考附錄二。

(二) 放流水之 48 小時 TU_a 計算

1. TU_a 為 LC_{50} 之倒數，即

$$TU_a = 100\% \div (48 \text{ 小時 } LC_{50})$$

2. 若放流水水樣 5 個濃度之水蚤死亡百分率均小於 50%，則 48 小時之 $LC_{50} > 100\%$ ，換算之 $TU_a < 1.00$ 。
3. 若放流水水樣 5 個濃度之水蚤死亡百分率均大於 50%，則 48 小時之 $LC_{50} < 20\%$ ，換算之 $TU_a > 5.00$ 。
4. 若結果數據不符合前述 2 種狀況，則依八、(一)之方法計算 48 小時 LC_{50} ，再換算 TU_a 。

九、品質管制

- (一) 毒性試驗必須以單一水蚤進行，不可混合不同品種水蚤。
- (二) 空白試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗。若空白試驗之死亡百分率超過 10%，則該次毒性試驗之結果不可採用，必須重做。
- (三) 參考毒物試驗：
 1. 氯化鈉以稀釋水溶解並配製為 5 個不同濃度，相鄰濃度差建議不超過 2 g/L。5 個試驗濃度之死亡百分率，至少須有一個 50%，及一個 50%，且至少須有 1 個濃度會造成試驗生物部分死亡。
 2. 新設立之實驗室，或實驗室改用不同品種之水蚤，應先以氯化鈉進行至少 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，每個月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 (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。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。

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。

(四) 水蚤馴養時若出現下列狀況，代表族群遭受壓力，不可用於製備試驗水蚤：高死亡率、出現冬卵（如圖二，註 3）水蚤變色等。

十、精密度與準確度：

單一實驗室以 *D. magna* 進行氯化鈉生物急毒性試驗結果，48 小時 LC_{50} 之平均值為 4.11 g/L，變異係數為 12.6% (n = 5)。

十一、參考資料

- (一) 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.
- (二) American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, Part 8000, 2012.
- (三) OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, 2004.

註 1：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。

註 2：水蚤移入時，務必先將廣口滴管伸至液面下再緩緩將水蚤排出，以避免水蚤受傷或被氣泡留滯於液面而死亡。

註 3：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。

表一、稀釋水成份及水質

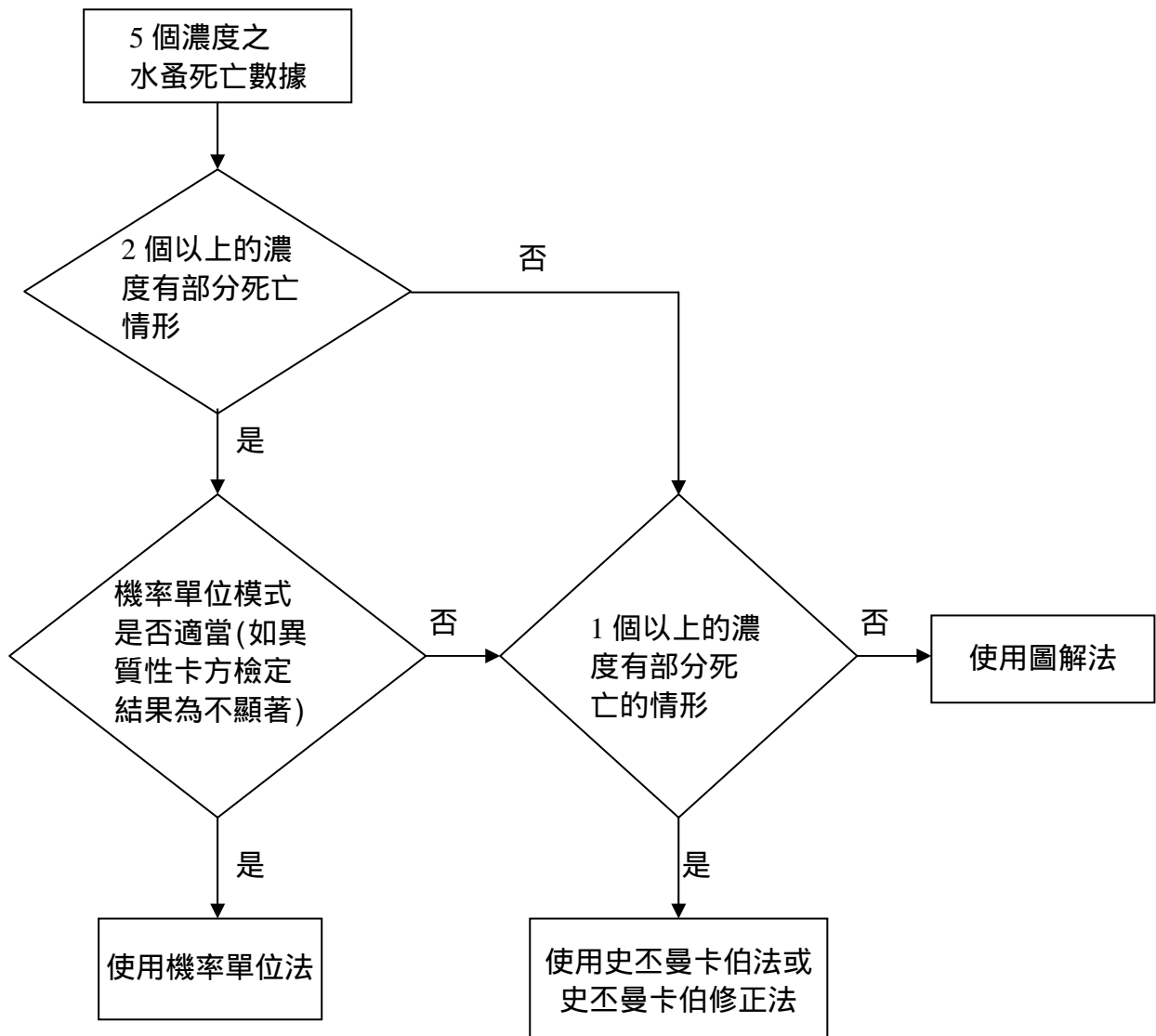
	添加試劑 (mg/L)				最終水質硬度 (mg CaCO ₃ /L)
	NaHCO ₃	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	CaSO ₄ ·2H ₂ O	
中硬度 稀釋水	96.0	123.0	4.0	60.0	80-100
高硬度 稀釋水	192.0	246.0	8.0	120.0	160-180



圖一、*Daphnia magna* 雌性成蚤



圖二、含冬卵之 *Daphnia magna*



圖三、48 小時 LC_{50} 之計算流程圖

附錄一：水蚤馴養及時齡不超過 24 小時之水蚤製備

一、水蚤馴養

(一) 馴養注意事項

1. 馴養時間至少 3 週。水蚤自採集地區或飼養單位取回後，可放入內盛 3 L 馴養水之 4 L 硼矽玻璃燒杯中馴養。為避免水蚤意外造成全部死亡，馴養燒杯建議準備 2 個以上。
2. 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。
3. 馴養時須小心控制水蚤密度，並建議每 2 天換水一次，以避免廢棄物累積，造成冬卵產生或水蚤驟死。
4. 如以 3 L 水量馴養，開始時可放入約 25 隻成蚤，馴養期間水蚤數建議控制在 200 隻以下。建議於換水時將水蚤族群適度減量。
5. 馴養杯內溶氧建議維持在 5 mg/L 以上，可使用曝氣設備微量通氣以增加溶氧。

(二) 水蚤飼料：可選用飼料 A、飼料 B 或飼料 C 進行餵食，餵食量約 1 mL/L 馴養水。亦可使用前述飼料搭配小球藻、羊角月牙藻等藻類餵食，可得到最佳之幼蚤產出率。若單獨以藻類餵食，可能造成水蚤營養不良而影響生殖。

1. 飼料 A：將 6.3 g 魚飼料、2.6 g 乾酵母粉、0.5 g 草葉粉加入 500 mL 試劑水。以均質機高速攪打 5 分鐘後，冷藏靜置 1 小時。取上層液 300 mL，分裝後冷凍保存。解凍後可冷藏保存 7 天。
2. 飼料 B：將 15 g 小球藻粉、5 g 螺旋藻粉、5 g 乾酵母粉加入 1 L 試劑水，以均質機攪打均勻後分裝，冷凍保存。解凍後可冷藏保存 7 天。
3. 飼料 C：配製完成後，分裝冷凍保存。解凍後可冷藏保存 7 天。
成分及配製方式如下：

(1) 分解魚飼料：將 5 g 魚飼料加入 1 L 試劑水，以均質機打碎後倒入 1 個 2 L 錐形瓶(或大小適當之容器)，室溫下由底部

持續打氣 7 天以分解飼料。期間液面會持續下降，須以試劑水補足。7 天後，冷藏靜置 1 小時，取 300 mL 上層液，其餘丟棄。

(2) 草葉粉液：開始分解魚飼料後之第 6 天，將 5 g 草葉粉加入 1 L 試劑水，以均質機高速攪打 5 分鐘後，冷藏靜置隔夜。取 300 mL 上層液，其餘丟棄。

(3) 酵母菌液：開始分解魚飼料後之第 7 天，將 1.5 g 乾酵母粉加入 300 mL 試劑水。以均質機低速攪打讓酵母菌均勻懸浮後，立刻和上述兩種上層液合併混勻。

4. 小球藻：培養液之製備可參考「水樣急毒性檢測方法 - 藻類靜水式法(NIEA B906)」，或以花寶二號肥料配製(1.0 g/1L 試劑水)。可用搖盪培養或通氣培養。約培養 7 至 10 天後計算小球藻濃度，接著離心將培養液去除，再以馴養水重新調整濃度為約 3×10^7 個/mL。餵食量約 1.5 mL/L 馴養水。

二、時齡不超過 24 小時之水蚤製備：開始試驗前 24 小時，自馴養容器內以廣口滴管，吸取成熟水蚤放入內盛稀釋水之燒杯。飼養溫度為 25 ± 2 ，光照時間維持在每天 16 ± 1 小時。飼養 24 小時即可獲得毒性試驗所需之時齡不超過 24 小時之水蚤。

附錄二：LC₅₀ 計算方法

一、機率單位法

(一) 使用條件

1. 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%。
2. 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%。

(二) 計算步驟

1. 可使用程式 probit.exe 進行計算。
2. probit.exe 之輸入範例如圖 1，輸出結果如圖 2。本程式之結果輸出檔為文字檔，內容包含異質性之卡方檢定結果 (Chi - square test for heterogeneity) 及 LC₅₀ 計算結果。計算所得之卡方值 (Chi - square for heterogeneity (calculated)) 須小於查表值 (tabular value at 0.05 level)，LC₅₀ 之計算結果才可採用。
3. 若數據輸入後出現 Overflow 或錯誤訊息、結果輸出檔呈現錯誤訊息、或計算所得之卡方值未小於查表值，則改用史丕曼 - 卡伯法進行計算。

(三) 範例

1. 若結果數據如表 1 之結果 1，因試驗濃度 40% 及 60% 出現部分死亡情形，故使用機率單位法進行計算。
2. 執行 probit.exe 檔，數據輸入如圖 1，結果如圖 2。

(1) 計算所得之卡方值 (5.151) 小於查表值 (7.815)，故機率單位模式適用於此組數據。

(2) LC₅₀ 為 56%，TU_a 為 1.79。

二、史丕曼 - 卡伯法及史丕曼 - 卡伯修正法：

(一) 使用條件

1. 5 個試驗濃度之死亡百分率數據經過平滑化及調整後，須有至少一組 50%，及至少一組 50%。
2. 5 個試驗濃度之死亡百分率數據經過平滑化及調整後，必須有 1 個以上的濃度有部分死亡的情形。
3. 若最低濃度之平滑調整死亡百分率為 0%，且最高濃度之平滑調整死亡百分率為 100%，則使用史丕曼 - 卡伯法。若不符合前述條件，則使用史丕曼 - 卡伯修正法。

(二) 計算步驟

1. 可使用程式 tsk.exe 進行計算。
2. tsk.exe 之輸入範例如圖 3，輸出結果如圖 4。本程式會自動進行死亡百分率數據之平滑化及調整，而結果輸出內容包含 SPEARMAN - KARBER TRIM 之數值及 LC_{50} 計算結果。

(1) 若 SPEARMAN - KARBER TRIM 之數值為 0%，代表計算時使用史丕曼 - 卡伯法。

(2) 若 SPEARMAN - KARBER TRIM 之數值非 0%，代表計算時使用史丕曼 - 卡伯修正法。

(三) 範例

1. 若結果數據如表 1 之結果 2，雖然試驗濃度 40% 及 100% 出現部分死亡情形，但機率單位法無法計算，故使用史丕曼 - 卡伯法或史丕曼 - 卡伯修正法進行計算。

2. 執行 tsk.exe 檔，數據輸入如圖 3，結果如圖 4。

(1) 計算所得之 SPEARMAN - KARBER TRIM 為 20.51%，代表計算時使用史丕曼 - 卡伯修正法。

(2) LC_{50} 為 92%， TU_a 為 1.09。

三、圖解法：適用於各濃度均無部分死亡的情形。

- (一) 5 個試驗濃度之死亡百分率數據經過平滑化及調整後，須有至少一組 50%，及至少一組 50%。

(二) 計算步驟

1. 將死亡百分率數據平滑化：

(1) 假設空白試驗之死亡百分率為 p_0 ，而樣品 5 個濃度之死亡百分率依序為 p_1 、 p_2 、 p_3 、 p_4 、 p_5 （由低濃度至高濃度）。若死亡百分率未依循 p_0 至 p_5 之順序，則必須進行平滑化。

(2) 進行平滑化時，將不符合上述順序之相鄰死亡百分率加總後平均，再以平均值取代原有之死亡百分率。

舉例來說，若 $p_1 = p_2 = p_3 < p_0 < p_4 = p_5$ ，則不符順序之數據為 p_0 、 p_1 、 p_2 、 p_3 。此時需進行數據平滑化，將 p_0 至 p_3 加總平均，並以平滑後之死亡百分率取代原有之 p_0 至 p_3 ： $p_0^s = p_1^s = p_2^s = p_3^s = (p_0 + p_1 + p_2 + p_3) / 4$ 。

2. 死亡百分率調整：完成死亡百分率平滑化後，若 $p_0^s > 0$ ，則將樣品各濃度之死亡百分率依據 p_0^s 加以調整。

$$p_i^a = (p_i^s - p_0^s) / (1 - p_0^s)$$

p_i^a ：稀釋樣品 i 之調整死亡百分率

p_i^s ：稀釋樣品 i 之平滑化死亡百分率

p_0^s ：空白試驗之平滑化死亡百分率

3. 將樣品濃度（對數座標軸）對調整死亡百分率（線性座標軸）作圖。找出括住 50% 之兩點，畫一直線。找出此一直線上死亡百分率為 50% 時之濃度值，即為 LC_{50} 。

(三) 範例

1. 若結果數據如表 1 之結果 3，死亡百分率計算結果依序為 5%、0%、0%、0%、100%、100%。

2. 因 p_0 至 p_3 未依循 p_0 至 p_5 之順序，故進行死亡百分率平滑化。平滑後之死亡百分率依序為 1.25%、1.25%、1.25%、1.25%、100%、100%。

3. 因 $p_0^s > 0$ ，故進行死亡百分率調整。調整後之死亡百分率依序為 0%、0%、0%、0%、100%、100%。

4. 將樣品濃度（對數座標軸）對調整死亡百分率（線性座標軸）作

圖如圖 5。在濃度 60 % 及 80 % 之資料點之間畫一直線，該直線上死亡百分率為 50 % 時，濃度值為 69.28 %，故 LC_{50} 為 69%， TU_a 為 1.45。

表 1、試驗生物死亡數量原始數據（每組之試驗生物均為 20 隻）

放流水濃度	結果 1	結果 2	結果 3
空白試驗(控制組)	0	1	1
20%	0	0	0
40%	3	2	0
60%	9	0	0
80%	20	0	20
100.0%	20	16	20
分析方法	機率單位法	史丕曼 - 卡伯 修正法	圖解法

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

Do you wish abbreviated (A) or full (F) input/output? a
 Output to printer (P) or disk file (D)? d
 File name for output? Test1
 Title? Test1

Number responding in the control group = ? 0
 Number of exposure concentrations, exclusive of controls? 5

Input data starting with the lowest exposure concentration

Concentration = ? 20
 Number responding = ? 0
 Number exposed = ? 20

Concentration = ? 40
 Number responding = ? 3
 Number exposed = ? 20

Concentration = ? 60
 Number responding = ? 9
 Number exposed = ? 20

Concentration = ? 80
 Number responding = ? 20
 Number exposed = ? 20

Concentration = ? 100
 Number responding = ? 20
 Number exposed = ? 20

Number	Conc.	Number Resp.	Number Exposed
1	20.0000	0	20
2	40.0000	3	20
3	60.0000	9	20
4	80.0000	20	20
5	100.0000	20	20

Do you wish to modify your data? n

The control response = 0
 Do you wish to modify it? n

Output stored in Test1

圖 1、probit 程式之輸入範例

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

Test1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	0	0.0000	0.0000
40.0000	20	3	0.1500	0.1500
60.0000	20	9	0.4500	0.4500
80.0000	20	20	1.0000	1.0000
100.0000	20	20	1.0000	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 5.151
 Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level) = 7.815

Test1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	31.620	22.002	37.962
LC/EC 50.00	55.550	49.626	61.121

圖 2、probit 程式之結果範例

```
TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD.  VERSION 1.5

ENTER DATE OF TEST:

ENTER TEST NUMBER:

WHAT IS TO BE ESTIMATED?
(ENTER "L" FOR LC50 AND "E" FOR EC50)
L
ENTER TEST SPECIES NAME:

ENTER TOXICANT NAME:

ENTER UNITS FOR EXPOSURE CONCENTRATION OF TOXICANT:
%
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS IN THE CONTROL:
20
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES IN THE CONTROL
1
ENTER THE NUMBER OF CONCENTRATIONS
(NOT INCLUDING THE CONTROL; MAX = 10)
5
ENTER THE 5 EXPOSURE CONCENTRATIONS (IN INCREASING ORDER):
20 40 60 80 100
ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION EQUAL(Y/N)?
Y
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:
20
ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT
(ENTER "H" FOR HOURS, "D" FOR DAYS, ETC.):

ENTER DURATION OF TEST:
48
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:
0 2 0 0 16
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION(Y/N)?
Y
```

圖 3、tsk 程式之輸入範例

DATE:	TEST NUMBER:	DURATION:	48
TOXICANT :			
SPECIES:			
RAW DATA:	Concentration (%)	Number Exposed	Mortalities

	.00	20	1
	20.00	20	0
	40.00	20	2
	60.00	20	0
	80.00	20	0
	100.00	20	16
SPEARMAN-KARBER TRIM:		20.51%	
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	LC50:		91.97
	95% LOWER CONFIDENCE:		89.05
	95% UPPER CONFIDENCE:		94.99
NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING. ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.			

WOULD YOU LIKE TO HAVE A COPY SENT TO THE PRINTER(Y/N)?			

圖 4、tsk 程式之結果範例

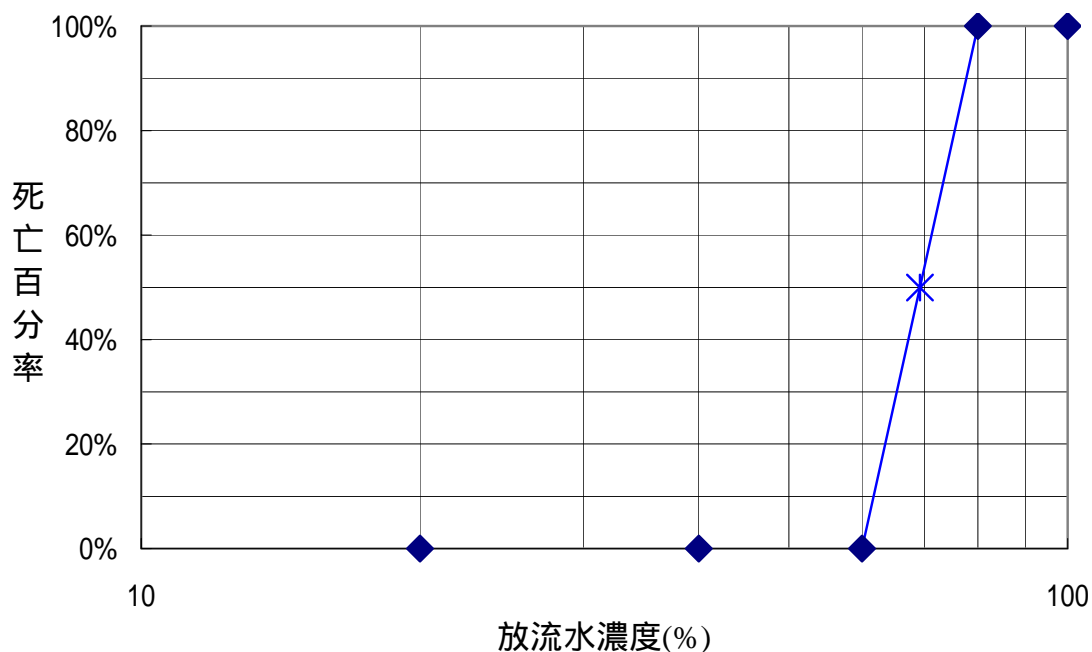


圖 5、圖解法作圖範例