

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

自中華民國102年10月15日生效

NIEA B905.13B

一、方法概要

本方法主要係以多齒新米蝦 (*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，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，會影響米蝦健康且可能造成耐受性改變。
- (二) 試驗生物有病或生長狀況不佳，影響耐受性。

四、設備及材料

- (一) 多齒新米蝦：使用全長(額角尖端至尾柄末端的長度)0.5 至 0.8 公分之多齒新米蝦幼苗 (圖一及圖二)，應有適當之物種證明或鑑定文件。可購自養殖場、水族館等或自行繁殖。(註 1)
- (二) 生物馴養及毒性試驗室：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 (如摺疊式水箱)。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。
- (六) 試驗容器：2 L 硼矽玻璃燒杯。
- (七) 量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。
- (八) 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
- (九) 溶氧測定儀
- (十) pH 計
- (十一) 導電度計
- (十二) 餘氯計
- (十三) 水質硬度計或水質硬度檢測試劑組
- (十四) 分析天平：可精秤至 0.1 mg。
- (十五) 曝氣設備
- (十六) 水循環過濾裝置：視需要。
- (十七) 手操網：大小合適之具握柄軟質尼龍網。
- (十八) 米蝦飼料：建議使用市售沉底型蝦飼料。
- (十九) 解剖顯微鏡：米蝦鑑定用。

五、試劑

- (一) 試劑水：比電阻值須大於 10 M⁻¹·cm。
- (二) 馴養水：可使用稀釋水、去氯自來水（註 2）、無污染之地下水等作為馴養水。馴養水之硬度應為 80 至 100 mg CaCO₃/L，可混合適量之逆滲透水或試劑水進行調整。
- (三) 稀釋水：

每 1 L 之稀釋水含下列成分（試藥級以上）：

碳酸氫鈉（NaHCO₃） 96.0 mg

七水硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	123.0 mg
氯化鉀 (KCl)	4.0 mg
二水硫酸鈣 ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	60.0 mg

可根據檢測需求量，依配方比例配製。20 L 稀釋水建議配製程序如下：

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，再測定硬度是否為 80 至 100 mg CaCO_3/L 。室溫下避光保存不宜超過 14 天。

(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 7 L。

(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. 米蝦馴養：

- (1) 將多齒新米蝦自繁殖場等取回後，放入內盛馴養水之馴養容器。
- (2) 馴養容器以曝氣設備曝氣，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%。
- (5) 蝦苗成長速度與馴養之密度及餵食狀況有關，須依實際情況調整馴養容器中蝦苗數量及餵食次數。
- (6) 馴養時若飼料充足，則大小米蝦不會互相殘食，可大小混養在一起。亦可將已抱卵之米蝦移至另一馴養容器飼養，待其自然孵化後馴養至試驗用之大小。
- (7) 試驗用米蝦全長應為 0.5 至 0.8 公分。

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。

(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 1 L 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。以手操網將經馴養且全長 0.5 至 0.8 公分之米蝦移入試驗容器，每個容器各放 5 隻。
- 4.試驗期間米蝦不得餵食，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，記錄米蝦存活數量並移出死亡之米蝦。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 2 L 以上，以 2 個試驗容器平均盛裝。
- 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。以手操網將經馴養且全長 0.5 至 0.8 公分之米蝦移入試驗容器，每個容器各放 10 隻。
- 4.空白試驗則取 2 個試驗容器，分別盛裝至少 1 L 之 100% 稀釋水，以手操網各放入 10 隻經馴養且全長 0.5 至 0.8 公分之米蝦

5. 試驗期間為 48 小時，水溫應控制在 25 ± 2 ，光照時間應維持每天 16 ± 1 小時。試驗期間米蝦不得餵食。
6. 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並記錄米蝦存活數量。
7. 結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗水樣之溶氧及 pH，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

八、結果處理

(一) 死亡判定：死亡之判定須符合下列二條件：

1. 觸鬚及鰓的活動停止。
2. 蝦體經輕觸沒反應。

(二) 48 小時 LC_{50} 之計算：

1. 計算各試驗濃度之 48 小時米蝦死亡總數及米蝦死亡百分率：

$$\text{米蝦死亡總數} = 20 - (\text{2 個試驗容器之米蝦存活數量加總})$$

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

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，詳細計算方式參見附錄。

(三) 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 個濃度之米蝦死亡百分率均小於 50%，則 48 小時之 $LC_{50} > 100\%$ ，換算之 $TU_a < 1.00$ 。
3. 若放流水水樣 5 個濃度之米蝦死亡百分率均大於 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(二)之方法計算 48 小時 LC_{50} , 再換算 TU_{ao}

九、品質管制

- (一) 試驗蝦種必須確認為多齒新米蝦, 不可混合其他品種。
- (二) 執行毒性試驗後之試驗生物須廢棄, 不得重複使用。
- (三) 空白試驗: 每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗。若空白試驗之死亡率超過 10%, 則該次毒性試驗之試驗結果不可採用, 必須重做。
- (四) 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, 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。

十、精密度及準確度

單一實驗室以氯化鈉進行生物急毒性試驗結果, 48 小時 LC_{50} 之平均值為 4.01 g/L, 變異係數為 14.7% ($n = 5$)

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, Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test., 1992.
- (四) 陳弘成, 魚類毒性試驗標準方法之研究, EPA-83-E3S5-09-03-02, 中華民國 83 年。
- (五) 李俊宏、柳家瑞, 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, 中華民國 83 年。
- (六) 施志昀、游祥平, 台灣的淡水蝦, 國立海洋生物博物館籌備處, 中華民國 87 年。

註 1：生物屍體之清除及處理，依一般事業廢棄物相關規定辦理。

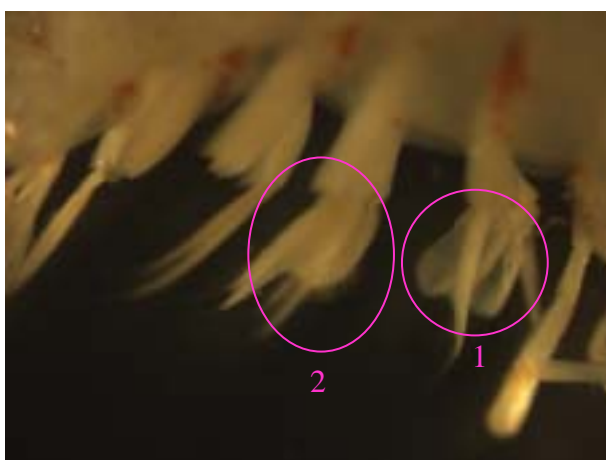
註 2：自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯，但不可使用化學藥劑去氯。



圖一、多齒新米蝦

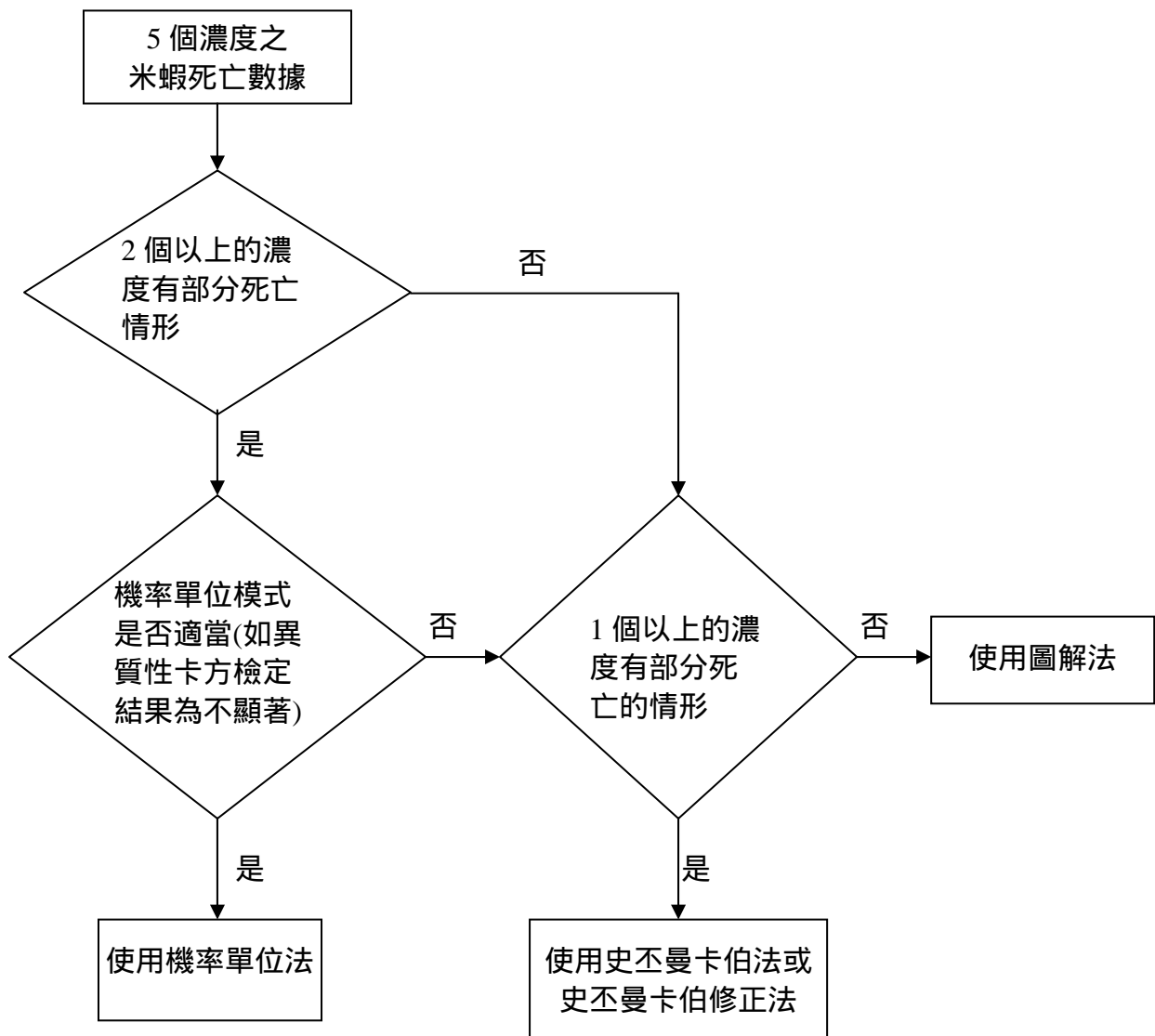


(a) 額角上緣前端約 1/5 範圍內不具額齒



(b) 1. 雄性第一腹足膨大呈梨形
2. 第二對腹足膨大而厚，並密生剛毛

圖二、多齒新米蝦鑑定特徵



圖三、48 小時 LC_{50} 之計算流程圖

附錄：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

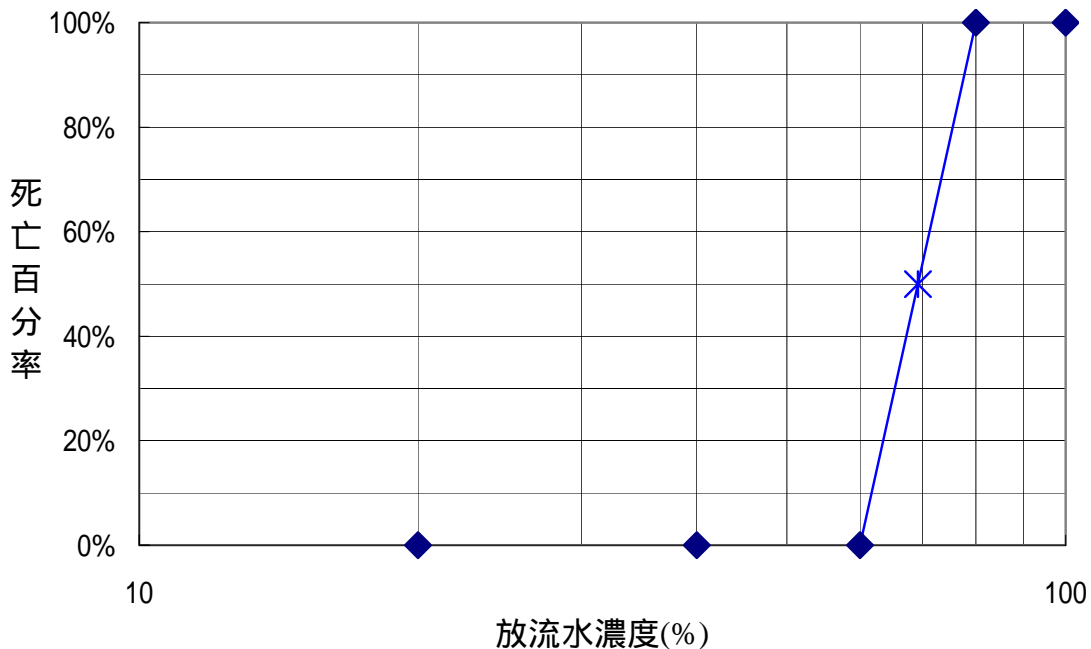


圖 5、圖解法作圖範例