

生物慢毒性檢測方法－藻類靜水式法

中華民國 102 年 7 月 30 日環署檢字第 1020065094 號公告
自中華民國 102 年 9 月 15 日生效
NIEA B907.20C

一、方法概要

本方法主要係以綠藻類之羊角月牙藻（*Pseudokirchneriella subcapitata*，註 1）為試驗生物，以靜水式生物毒性試驗方法，檢測生物慢毒性，計算 96 小時之半抑制濃度(Inhibition Concentration, IC₅₀)。

二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水及污水之生物慢毒性檢測。

三、干擾

- (一) 稀釋水、玻璃器皿、採樣器或試驗設備殘留有毒物質會影響試驗生長且可能造成耐受性改變。
- (二) 具高濃度溶解或懸浮固體、極端 pH 值、顏色之水樣，可能遮蔽水樣本身存在的毒性。
- (三) 營養鹽加入至水樣或稀釋水，可能會影響試驗結果。
- (四) 樣品如含有寄生生物或病原性微生物將影響試驗生物生長，進而影響試驗結果。

四、設備及材料

- (一) 藻體：羊角月牙藻（*Pseudokirchneriella subcapitata*），其大小約 6 μm 形態如圖一，應記錄藻來源。
- (二) 樣品容器：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。
- (三) 培養箱：具冷白螢光源，照度 4000 至 8000 lux 之間，培養位置之間光照差異不得超過 ± 10%，溫度控制在 25 ± 2°C，具有迴旋功能為佳。
- (四) 顯微鏡：能放大 400 倍以上。
- (五) 計數盤：賽吉計數池(Sedgwick-Rafter slide)、柏瑪計數盤(Palmer - Maloney slide) 或血球計數盤 (Haemocytometer) 等。
- (六) 量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。

- (七) 移液管：0.1、0.5、1 及 10 mL。
- (八) 錐形瓶：125 或 250 mL 硼矽玻璃材質。
- (九) 通氣栓：通氣，可高壓滅菌，搭配錐形瓶使用，避免養殖藻類時受到微生物污染。
- (十) 高壓滅菌釜：溫度能保持在 121°C（壓力約 15 lb/in² 或 1.05 kg/cm²）滅菌 15 分鐘以上。
- (十一) 溫度計：量測水溫用，刻度可以顯示至 1°C。
- (十二) 溶氧測定儀。
- (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：可精秤至 0.1 mg。
- (十七) 曝氣設備。
- (十八) 烘箱。
- (十九) 無菌操作檯：正壓式無菌操作檯或垂直循環負壓式無菌操作檯（Class II 生物安全櫃）。
- (二十) 藻濃度測試設備：除使用顯微鏡外，可依需求擇一使用下列儀器，儀器之量測值需與生物量呈線性相關。
 - 1. 螢光光譜儀：可進行葉綠素之量測。
 - 2. 分光光度計：波長 750 nm，能夠容納 5 至 10 cm 樣品槽。
 - 3. 電子式顆粒計數器：庫爾特計數器（Coulter Counter）或同級品。
 - 4. 流式細胞儀。
- (二十一) 離心機：離心力可達 1000 × g。
- (二十二) 無菌離心管：附螺旋蓋。
- (二十三) 過濾裝置。
- (二十四) 濾膜：過濾培養液或水樣用，孔徑 0.45 μm。

五、試劑

所有檢測時使用的試劑化合物除非另有說明，否則必須是分析級以上之試藥。

- (一) 試劑水：比電阻值須大於 10 MΩ-cm。
- (二) 培養液：每升培養液含下述 A、B、C、D 及 E 儲備液各 1 mL，可根據檢測需求量，依比例配製培養液。為避免濃度過高造成沉

澱，A、B、C、D 及 E 儲備液應分別配製，配製後置於陰暗處，可保存 6 個月，如水體變濁則廢棄重配之。培養液試驗前配製，pH 值調至 7.5~8.1 之間，經滅菌（過濾滅菌或 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘）後使用，培養液之營養鹽組成如表一，後續藻濃度如以電子顆粒計數器計數，則培養液需以 0.45 μm 濾膜過濾。

A 儲備液：秤取氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 6.08 g、氯化鈣 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.20 g 及硝酸鈉 (NaNO_3) 12.75g，以試劑水溶解定量至 500 mL。

B 儲備液：秤取硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 7.35 g，以試劑水溶解定量至 500 mL。

C 儲備液：秤取磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 0.522 g，以試劑水溶解定量至 500 mL。

D 儲備液：秤取碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 7.50 g，以試劑水溶解定量至 500 mL。

E 儲備液：於 500 mL 量瓶中，秤取硼酸 (H_3BO_3) 92.8 mg、氯化錳 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 208.0 mg、氯化鐵 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 79.9 mg、鉬酸鈉 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3.6 mg 及乙二胺四乙酸二鈉鹽 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 150.0 mg，加入約 400 mL 試劑水中溶解，加入下述 1 mL 甲液及 0.1 mL 乙液，混合後，最後定量至 500 mL。

甲液：溶解氯化鋅 (ZnCl_2) 164.0 mg、氯化鈷 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 71.4 mg 及硒酸鈉 (Na_2SeO_4) 119.6 mg 於 100 mL 試劑水中。

乙液：溶解氯化銅 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 60.0 mg 於 1000 mL 試劑水中。

(三) 參考毒物：可使用氯化鎘 (cadmium chloride, CdCl_2)、硫酸銅 (copper sulfate, CuSO_4)、十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、重鉻酸鉀 (potassium dichromate, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、氯化鈉 (NaCl)。

(四) 10% (v/v) 鹽酸。

(五) 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)」。水樣量至少 1.5 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 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

(三) 水樣必須在採樣後 36 小時內開始進行試驗。

七、步驟

(一) 試驗準備

1. 試驗容器清洗：

量瓶、量筒、錐形瓶等玻璃器皿，須依下列步驟清洗：

- (1) 無磷清潔劑清洗，宜高於 50°C，以硬棕毛刷洗內壁，以清除瓶壁附著物。可使用洗瓶機清洗。
- (2) 用自來水沖洗。
- (3) 以丙酮潤洗，再以 10% (v/v) 鹽酸潤洗，或浸泡在 10% 鹽酸中數天。如果錐形瓶受到毒性有機污染或者是新的錐形瓶則以殘量級丙酮潤洗或者將其加熱至 400°C 30 分鐘。
- (4) 如將錐形瓶加熱者，俟冷卻後，以錫箔紙包裹瓶口，儲放備用。如以丙酮潤洗者，以試劑水潤洗 2 次，105°C 烘乾之。
- (5) 試驗前需經滅菌後方可使用。

2. 藻體馴養過程：

- (1) 藻體大量養殖：馴養過程中，將適量藻體，加入裝有 25 mL 培養液之 125 mL 錐形瓶內，置於溫度 25 ± 2°C，冷白螢光源，照度 4000 至 8000 lux 連續光照之培養箱中，每天搖晃 2 次或以迴旋速度約 100 cpm 培養之。爾後，藻液每星期取 1~2 mL 加入 50~100 mL 新鮮培養液，以維持藻體健康與密度。過程中，應保持無菌操作以避免藻種受到污染。每次取藻液前先以顯微鏡觀察是否遭受其他生物污染，剩餘的藻液可於 4°C 暗處保存 6 個月。記錄藻體取得來源、培養前藻液濃度（以 cells/mL 表示）及培養時間。
- (2) 進行試驗的藻體：試驗時為確保藻體健康與穩定，剛更換新鮮培養液之藻體不得立即進行試驗，直至更換第 4 至 7 天後方可進行毒性試驗。
- (3) 藻液濃度量測：以顯微鏡配合賽吉計數池或其他計數盤，量測藻濃度（詳如附錄一）。
- (4) 植藻液濃度調整(詳如附錄二)：進行毒性測試時，為使每一試驗錐形瓶中藻體濃度為 10^4 cells/mL ($\pm 10\%$)，每一試驗瓶中植入之植藻液體積不得高於 1/100（例如試驗水樣 100 mL 時植入 1.0 mL 植藻液，故植藻液濃度需調整為 10^6 cells/mL $\pm 10\%$)。

3. 試驗前之水樣準備：

- (1) 水樣先測定 pH、溶氧、導電度、鹼度及硬度，並記錄之。
- (2) 以孔徑 0.45 μm 濾紙過濾水樣。
- (3) 水樣溶氧如過飽和或者低於 4.0 mg/L，應對水樣溫和曝氣，使溶氧高於 4.0 mg/L 以上。
- (4) 於試驗前 1 小時，每公升水樣各加入 1 mL A、B、C、D 及 E 儲備液，並調整水溫至 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

(二) 進行試驗

1. 將已加入培養儲備液之水樣以培養液適度稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。建議之試驗濃度為 100%、50%、25%、12.5%、6.25%，如已知或懷疑樣品具強烈毒性，則須進行較低濃度稀釋，如 25%、12.5%、6.25%、3.12% 及 1.56%。必要時可先進行 1~2 小時之試驗，如死亡率高時，則需再往下稀釋後再進行試驗。如樣品具有揮發性物質，則須先加入培養液於錐形瓶後，再將水樣注入在培養液面下接近瓶底處。
2. 每一批次水樣須有 1 組空白，每一水樣有 5 個不同稀釋度，每一稀釋度（含空白）須要 3 重複測試。
3. 將每一試驗瓶內盛裝 100 mL 之試驗溶液（使用 250 mL 錐形瓶）或 50 mL 之試驗溶液（使用 125 mL 錐形瓶），空白試驗瓶內則盛裝培養液。
4. 每一試驗溶液包括空白試驗，分別加入 1/100 體積之植藻液，例如 100 mL 試驗溶液加入 1.0 mL，使初始試驗溶液藻體濃度為 10^4 cells/mL ($\pm 10\%$)。
5. 隨機將試驗瓶放入培養箱中，培養箱溫度控制在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，冷白螢光源連續光照，以迴旋速度約 100 cpm 或靜置培養。
6. 為避免固定光源造成實驗組間偏差，每天 2 次（間隔在 4 小時以上）將試驗瓶取出，左右旋轉各 1 次後，再隨機將試驗瓶放入培養箱中。
7. 經 96 小時培養後，因須進行大量試驗瓶內藻體濃度量測，除繼續使用顯微鏡計數方式外，可由下述方式擇一使用測試（皆需經過顯微鏡計數方式校正。），測試結果至少 3 重複再取其平均值。
 - (1) 用電子顆粒計數器：先將控制試驗溶液混合均勻後取 1 mL，加入 9 mL 1% 食鹽水中，此液體通過電子顆粒計數器孔徑 100 μm 偵測管，讀取樣品中藻體個數。
 - (2) 將試驗溶液混合均勻，直接以螢光儀分析測其螢光值；或參

照「水中葉綠素 *a* 檢測方法—丙酮萃取/螢光分析法 NIEA E509」測定葉綠素 *a* 濃度。

- (3) 利用藻體大小、數量及色素與吸光值有相關性，試驗前先以培養液配製不同之藻體濃度，在波長 750 nm 下測其吸光值，建立藻體濃度-吸光值之檢量線。再測試驗溶液之吸光值，以內差法求得藻體濃度。本方式在水樣濁度不會干擾藻體濃度下方可使用。

八、結果處理

由各不同稀釋度及空白試驗之重複平均值，利用線性內插法(linear interpolation method)，計算 IC₅₀ (詳如附錄三)。

九、品質管制

- (一) 空白試驗：每次試驗應執行一空白試驗。若空白試驗出現下列狀況，則該次毒性試驗之結果不可採用：

- 1.96 小時培養後之空白試驗藻體平均濃度未超過 5×10^5 cells/mL 者。
- 2.3 重複試驗變異係數 (coefficient of variation, CV) 超過 20% 者。

$$\text{變異係數(\%)} = \frac{\text{標準偏差} \times 100\%}{\text{平均值}}$$

- (二) 參考毒物試驗：

1. 新設立之實驗室，應先進行至少 5 次同一種參考毒物試驗，計算 IC₅₀ 平均值及變異係數 (coefficient of variation, CV)。CV 值，不得超過 50%。
2. 執行毒性試驗期間，每個月至少執行一次參考毒物試驗。
3. 參考毒物試驗結果 (IC₅₀) 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。
4. 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、精密度與準確度 略

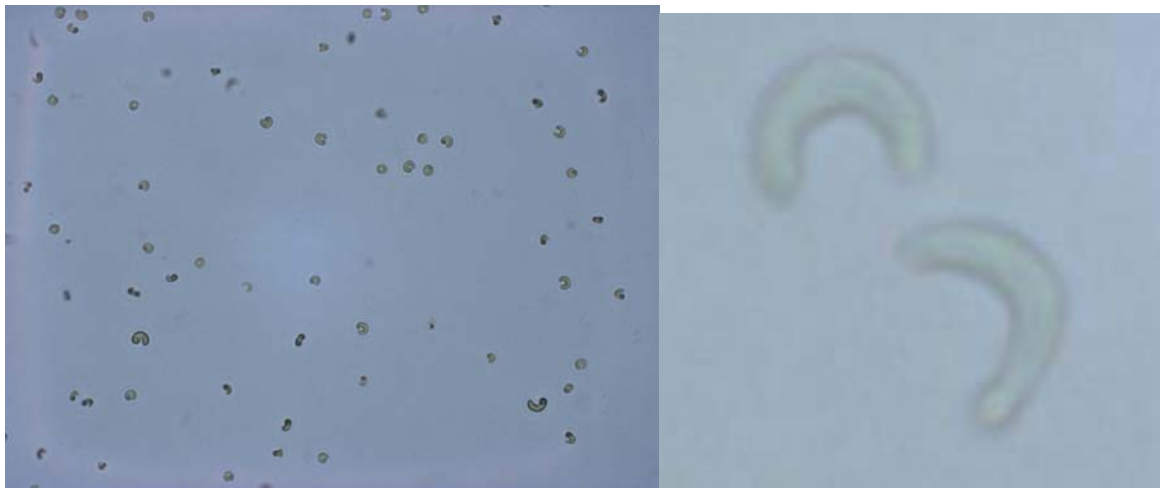
十一、參考資料

- (一) U.S.EPA, The Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms 4th Edition, EPA-821-R-02-013, 2002.
- (二) APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, Section 8711, 2012.
- (三) OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 201: Freshwater Algae and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test., 2011.
- (四) ISO 8692, Water quality- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae, 2012.

註 1：羊角月牙藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 原學名為 *Selenastrum capricornutum* 於 1990 年 Hindak 更名之，但因許多學者或方法仍用原學名，故二者並列之。

表一 培養液中組成

藥品名稱	每公升培養液含量
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.16 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.40 mg
NaNO_3	25.50 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.70 mg
K_2HPO_4	1.04 mg
NaHCO_3	15.00 mg
H_3BO_3	0.185 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.416 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.160 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0072 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.300 mg
ZnCl_2	0.00328 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00143 mg
Na_2SeO_4	0.00239 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.000012 mg



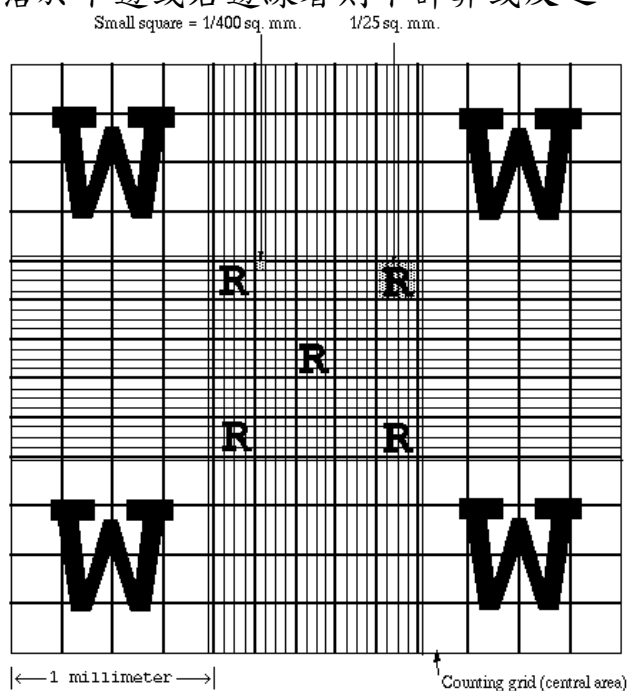
圖一 左為 40 倍接物鏡、右為 100 倍接物鏡下觀察之羊角月牙藻

附錄一 藻濃度量測

一、藻濃度量測步驟：

將藻儲液混合均勻後，取適量(視計數盤種類)藻儲液滴入計數盤內，靜置數分鐘後，讓藻體沉降至盤底，方便顯微鏡同一焦距下觀察。依據計數盤的公式推算藻儲液濃度。

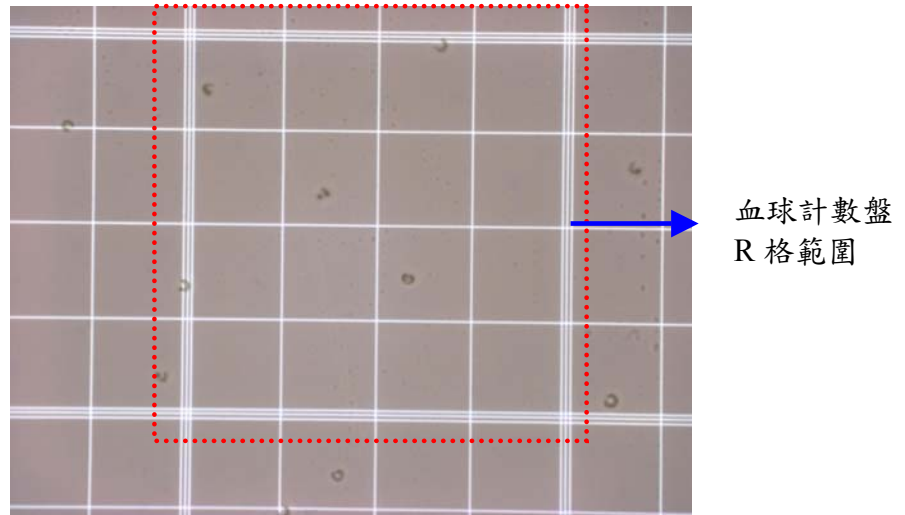
以血球計數盤為例(如圖二)：血球計數盤上細刻 9 個 1 mm^2 大正方形，4 個角落之大正方形(W)再細刻各 16 個中正方形，中間的大正方形則再細刻 25 個中正方形格(R)，每個中正方形格又細刻 16 個小正方形格，深度均為 0.1 mm 。當蓋上蓋玻片後，每個大正方形(W)之體積為 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ mL}$ ；每個中正方形格(R)之體積為 $1/25\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 4.0 \times 10^{-6}\text{ mL}$ 。使用時，計數 1 個大正方形(W)或中間正方形格(R)之藻數目，再乘以 10^4 或 2.5×10^5 ，即為每 mL 中之細胞數目。落於邊線上藻體計數原則為，落在上邊及左邊線者計數之，而藻體落於下邊或右邊線者則不計算或反之。



圖二 血球計數器

二、藻濃度量測(案例)：

在顯微鏡 40 倍接物鏡視野下(如圖三)，在血球計數盤 R 格範圍內共有 5 個羊角月牙藻(數落於上邊及左邊線上藻，不數落於下及右邊線藻)，其藻濃度為 $5 \times 2.5 \times 10^5 = 1.25 \times 10^6\text{ cells/mL}$ 。



圖三 顯微鏡 40 倍接物鏡視野下血球計數盤羊角月牙藻

附錄二 調整植藻液濃度：

進行毒性測試時，須將藻儲液依下述方式將濃度調整為 10^6 cells/mL ($\pm 10\%$)，成為植藻液。

(一)離心置換新培養液：

取適量藻儲液以離心力約 $1000 \times g$ 離心 5 分鐘去掉上層液，加入適量培養液使離心管底部藻體重新懸浮混合，再次離心，再去掉上層液（此過程會損失部分藻體）。

(二)調整藻濃度：

再次加入適量培養液 L_1 mL 混合均勻，確認此混合液之藻體濃度（假設為 P cells/mL），依下式計算需再加入培養液之體積 L_2 。

$$\text{需再加入培養液體積} = \frac{P \text{ cells/mL} \times L_1 \text{ mL}}{10^6 \text{ cells/mL}} - L_1 \text{ mL} = L_2 \text{ mL}$$

(三)最後確定植藻液濃度：

加入 L_2 mL 培養液混合均勻，最後以顯微鏡確認植藻液濃度，是否為 10^6 cells/mL ($\pm 10\%$)。

二、調整濃度範例

(一)離心置換新培養液：

取適量藻儲液以離心力約 $1000 \times g$ 離心 5 分鐘去掉上層液，加入適量培養液使離心管底部藻體重新懸浮混合，再次離心，再去掉上層液。

(二)調整藻濃度：

加入培養液 10 mL 混合均勻，取少量藻儲液置於顯微鏡下以血球計數盤測藻濃度，隨機取血球計數盤上 3 個 W 大小方格，計數藻個數，分別為 267、232 及 251 個(平均為 250)，藻濃度為 $250 \times 10^4 = 2.5 \times 10^6$ cells/mL。為取得藻濃度為 10^6 cells/mL 之植藻液，依下列公式計算需再添加培養液體積量。

$$\text{需再加入培養液體積} = \frac{2.5 \times 10^6 \text{ cells/mL} \times 10 \text{ mL}}{10^6 \text{ cells/mL}} - 10 \text{ mL} = 15 \text{ mL}$$

(三)最後確定植藻液濃度：

加入培養液 15 mL 混合均勻即為植藻液(共 25 mL)，取少量植藻液置於顯微鏡下以血球計數盤測藻濃度，隨機取血球計數盤上 3 個 W 大小方格，計數藻個數，分別為 97、95 及 105 個(平均為 99)，藻濃度為 $99 \times 1 \times 10^4 = 9.9 \times 10^5$ cells/mL。

附錄三 IC₅₀計算方法

一、計算步驟

(一) 將藻濃度平滑化：

- 1、假設空白試驗藻體濃度為 M_0 ，而樣品 5 個稀釋度之平均藻體濃度依序為 M_1 、 M_2 、 \dots 、 M_5 (由第 1 稀釋度至第 5 稀釋度)，依 (二) 使用線性內插法計算。若平均藻體濃度未依循 $M_0 \geq \dots \geq M_5$ 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平均藻體濃度加總後平均，再以平均值取代原有之平均藻體濃度。若取代後仍有數據未依循 $M_0 \geq \dots \geq M_5$ 之順序，則重複前述步驟，直到所有數據皆符合順序為止。

舉例來說，若 $M_2 > M_3 > M_1 > M_0 > M_4 > M_5$ ，則不符順序之數據為 M_0 、 M_1 、 M_2 及 M_3 ，此時需進行數據平滑化，將 M_0 至 M_2 加總平均，並以平滑後藻體濃度取代原有之 M_0 至 M_3 ： $M_0 = M_1 = M_2 = (M_0 + M_1 + M_2) / 3$ 。

(二) 使用線性內插法 (Linear Interpolation Methode) 計算 IC₅₀：

- 1、計算 IC₅₀ 時，須先計算當抑制效應為 50% 時，藻體濃度：

$$M_p = M_0 \times \left[1 - \frac{50}{100} \right]$$

M_p = 當生長抑制效應為 50% 時，預估之藻體濃度
 M_0 = 空白試驗的藻體濃度

- 2、由試驗結果之 M_1 至 M_5 ，找出 M_p 之上下鄰近值，再依下列公式計算 IC₅₀。

$$IC_{50} = C_j + (M_p - M_j) \times \frac{(C_{j+1} - C_j)}{(M_{j+1} - M_j)}$$

M_p = 當生長抑制效應為 50% 時，預估之藻體濃度

M_j = M_p 之上鄰近藻體濃度值

M_{j+1} = M_p 之下鄰近藻體濃度值

C_j = M_j (上鄰近) 之水樣稀釋度

C_{j+1} = M_{j+1} (下鄰近) 之水樣稀釋度

二、不須平滑化，直接計算案例

試驗數據如下：

測試水樣 (8 g-NaCl/L)	重複 1	重複 2	重複 3	平均藻體濃度 ($\times 10^4$ cells/mL)
空白試驗 M_0	157	150	154	154
第 1 稀釋度 M_1 (6.25%, 0.5 g/L)	143	147	123	138
第 2 稀釋度 M_2 (12.5%, 1 g/L)	104	101	142	116
第 3 稀釋度 M_3 (25%, 2 g/L)	44	49	44	46
第 4 稀釋度 M_4 (50%, 4 g/L)	26	31	21	26
第 5 稀釋度 M_5 (100%, 8 g/L)	0	0	0	0

計算 IC_{50}

預估 50%抑制效應時藻體濃度 M_p

$$M_p = 154 \times 10^4 \times \left[1 - \frac{50}{100} \right] = 77 \times 10^4$$

因 77×10^4 之上鄰近值為 M_2 (116×10^4 cells/mL) 及下鄰近值為 M_3 (46×10^4 cells/mL)：

$$IC_{50} = C_2 + (M_p - M_2) \times \frac{(C_3 - C_2)}{(M_3 - M_2)}$$

$$IC_{50} = 1 + (77 - 116) \times 10^4 \frac{(2 \text{ g/L} - 1 \text{ g/L})}{(46 - 116) \times 10^4} = 1.56 \text{ (g-NaCl/L)}$$

$$IC_{50} = 12.5\% + (77 - 116) \times 10^4 \frac{25.0\% - 12.5\%}{(46 - 116) \times 10^4} = 19.5\% \text{ (稀釋度)}$$

三、須平滑化，再取代計算

案例之一試驗數據如下：

測試水樣	重複 1	重複 2	重複 3	平均藻體濃度 ($\times 10^4$ cells/mL)	平滑化
空白試驗 M_0	132	153	164	<u>150</u>	155
第 1 稀釋度 M_1 (6.25%)	153	185	142	<u>160</u>	155
第 2 稀釋度 M_2 (12.5%)	116	119	110	115	115
第 3 稀釋度 M_3 (25%)	60	44	73	59	59
第 4 稀釋度 M_4 (50%)	35	22	40	32	32
第 5 稀釋度 M_5 (100%)	2	3	2	2	2

1、藻濃度平滑化：

將平均藻濃度由大至小排序， $M_1 > M_0 > M_2 > M_3 > M_4 > M_5$ 。

2、找出不符順序之數據者：

M_3 、 M_4 與 M_5 已按濃度高低排序，不符順序者為 M_0 、 M_1 。

3、計算不符順序者之平均值：

M_0 、 M_1 ，依計算步驟（一）2 計算並取代。

$$\frac{M_0+M_1}{2} = \frac{(150+160)\times 10^4}{2} = 155\times 10^4 = M_0' = M_1'$$

4、再次排序視其是否依大小排序：

$M_0' = M_1' > M_2 > M_3 > M_4 > M_5$ ， $155\times 10^4 = 155\times 10^4 > 115\times 10^4 > 59\times 10^4 > 32\times 10^4 > 2\times 10^4$ 已由大至小排序，完成數據平滑化。

5、計算 IC_{50}

$$M_p = 155\times 10^4 \times \left[1 - \frac{50}{100} \right] = 77.5\times 10^4$$

因 77.5×10^4 之上鄰近值為 M_2 (115×10^4 cells/mL)及下鄰近值為 M_3 (59×10^4 cells/mL)：

$$IC_{50}=C_2+(M_p-M_2)\times\frac{(C_3-C_2)}{(M_3-M_2)}$$

$$IC_{50}=12.5\%+(77.5-115)\times 10^4\times\frac{(25.0-12.5)\%}{(59-115)\times 10^4}=20.9\%(\text{稀釋度})$$

案例之二試驗數據如下：

測試水樣	重複 1	重複 2	重複 3	平均藻體濃度 ($\times 10^4$ cells/mL)	平滑化 1	平滑化 2
空白試驗 M_0	145	143	173	<u>154</u>	167	167
第 1 稀釋度 M_1 (6.25%)	165	193	180	<u>179</u>	167	167
第 2 稀釋度 M_2 (12.5%)	101	112	102	105	<u>105</u>	110
第 3 稀釋度 M_3 (25%)	120	103	122	115	<u>115</u>	110
第 4 稀釋度 M_4 (50%)	40	51	64	52	52	52
第 5 稀釋度 M_5 (100%)	5	3	3	4	4	4

1、藻濃度平滑化：

將平均藻濃度由大至小排序， $M_1 > M_0 > M_3 > M_2 > M_4 > M_5$ 。

2、找出不符順序之數據者：

M_0 、 M_1 、 M_2 、 M_3 。

3、由低濃度開始計算不符順序者之平均值：

M_0 、 M_1 ，依計算步驟（一）2 計算並取代。

$$\frac{M_0+M_1}{2}=\frac{(154+179)\times 10^4}{2}=167\times 10^4=M_0'=M_1'$$

4、再次排序視其是否依大小排序：

$M_0'=M_1' > M_3 > M_2 > M_4 > M_5$ ，但尚未完成數據平滑化。

5、找出不符順序之數據者：

M_2 、 M_3 ，依計算步驟（一）2 計算並取代。

$$\frac{M_2+M_3}{2} = \frac{(105+115)\times 10^4}{2} = 110\times 10^4 = M_2' = M_3'$$

6、再次排序視其是否依大小排序：

$M_0' = M_1' > M_2' = M_3' > M_4 > M_5$ ， $155\times 10^4 = 155\times 10^4 > 110\times 10^4 = 110\times 10^4 > 52\times 10^4 > 4\times 10^4$ 已由大至小排序，完成數據平滑化。

7、計算 IC_{50}

$$M_p = 167\times 10^4 \times \left[1 - \frac{50}{100} \right] = 83.5\times 10^4$$

因 83.5×10^4 之上鄰近值為 M_3' (110×10^4 cells/mL) 及下鄰近值為 M_4 (52×10^4 cells/mL)：

$$IC_{50} = C_3 + (M_p - M_3) \times \frac{(C_4 - C_3)}{(M_4 - M_3)}$$

$$IC_{50} = 25\% + (83.5 - 110)\times 10^4 \times \frac{(50 - 25)\%}{(52 - 110)\times 10^4} = 36.4\% (\text{稀釋度})$$