

蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 農藥有效成分檢驗方法

一、以小菜蛾(*Plutella xylostella* (Linnaeus))為供試昆蟲，力價單位為 DBMU/mg：

(一) 農藥性質：

普通名稱：蘇力菌品系包括鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 及庫斯蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)。

(二) 劑型：水懸劑 (SC)、可溼性粉劑 (WP)、水分散性粒劑 (WG) 及粒劑 (GR)。

(三) 作用：殺蟲劑。

(四) 分析方法：

1. 適用範圍：本方法適用於蘇力菌產品之鮎澤蘇力菌及庫斯蘇力菌有效成分力價檢定。

2. 檢驗方法：本實驗採用人工飼料餵食法。以小菜蛾3齡初幼蟲為供試昆蟲，估計 72 小時之半數致死濃度 (LC₅₀ 值)，再與標準劑比較，計算樣品之力價。

2.1 裝置：

2.1.1 均質機 (Tissue tearor)：機器零組件之轉子適用於消毒滅菌者。

2.1.2 試管振盪器 (Vortex)。

2.1.3 恆溫培養箱 (Incubator)：設定溫度 25±2°C，相對溼度 70±3%，光照週期 (光照：黑暗) = 12 hr：12 hr。

2.1.4 高壓殺菌釜 (Autoclave)。

2.1.5 電磁加熱攪拌器。

2.1.6 果汁機。

2.1.7 電子天平 (可分別顯示至小數點以下 2 位數及 4 位數者)。

2.1.8 吸管輔助器。

2.2 試藥：

2.2.1 標準劑：蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 標準劑，有效成分力價須 60,000 DBMU/mg 以上。

2.2.2 逆滲透水：導電度 20 µS/cm 以下，高溫滅菌後備用。

2.3 器具及材料：

2.3.1 可分解性聚乳酸 (PLA) 布丁杯容器，容量 120 mL。

2.3.2 刻度吸管 10 mL、25 mL 及 50 mL。

2.3.3 微量吸管 1,000 µL。

2.3.4 離心管 15 mL 及 50 mL。

2.3.5 燒杯 250 mL。

2.3.6 玻璃瓶 20 mL。

2.3.7 小楷毛筆。

2.2.8 溫度計（0 至 100°C）。

2.2.9 卷筒紙巾。

2.4 蘇力菌標準液配製：

2.4.1 將標準劑回溫備用。

2.4.2 秤取蘇力菌標準劑 0.100 g（記錄至 0.001 g），置於 20 mL 玻璃瓶中，加入 10 mL 無菌水，使用電磁加熱攪拌器（內置磁石）攪拌至完全均勻懸浮，配製成 10,000 µg/mL 標準液。

2.4.3 以均質機均質 1 分鐘（約 12,000 rpm）。

2.4.4 取 1 mL 均質過之 10,000 µg/mL 蘇力菌標準液，置於 15 mL 離心管中，加入無菌水 9 mL，稀釋成 1,000 µg/mL 標準液。

2.4.5 取 0.6 mL 之 1,000 µg/mL 標準液，置於 50 mL 離心管內，加入 19.4 mL 無菌水，以試管振盪器充分振盪混合均勻後使之成 30 µg/mL。取 10 mL 之 30 µg/mL 標準液，加入適量無菌水進行等量序列稀釋，稀釋成 6 個以上連續梯度的處理濃度，每稀釋濃度之標準液最終定量體積為 10 mL。

2.5 檢液配製：

2.5.1 將試驗物檢體回溫備用。

2.5.2 依 2.4.2 至 2.4.5 之程序配製 6 個以上連續梯度的檢液處理濃度。

2.5.3 以無菌水作為對照組。

2.5.4 試驗物須進行 3 次取樣。

2.6 有效成分檢定：

2.6.1 供試生物：將感受性品系小菜蛾在恆溫培養箱內飼育，待幼蟲由卵孵化後，約 7 天取得健康且體型大小一致的小菜蛾 3 齡初幼蟲。

2.6.2 製備小菜蛾生物活性檢定人工飼料（詳見附錄 1）。

2.6.3 標準液混拌人工飼料：

2.6.3.1 在標準液 10 mL 稀釋液內，每處理濃度各加入 20 g 約 60°C 保溫之人工飼料，以試管振盪器充分振盪混拌均勻。平均倒入 PLA 容器杯中，每處理濃度人工飼料分裝成 5 杯（6 mL/杯）後，以紙巾覆蓋，放置於室溫冷卻備用。

2.6.3.2 每杯以毛筆挑入 10 隻小菜蛾 3 齡初幼蟲，杯口覆蓋紙巾及杯蓋。

2.6.3.3 放置於恆溫培養箱內，於 72 小時觀察記錄死亡幼蟲數。

2.6.4 檢液混拌人工飼料：

2.6.4.1 在檢液 10 mL 稀釋液內，每處理濃度各加入 20 g 約 60°C 保溫之人工飼料，以試管振盪器充分振盪混拌均勻。平均倒入 PLA 容器杯中，每處理濃度人工飼料分裝成 3 杯（10 mL/杯）後，以紙巾覆蓋，放置於室溫冷卻備用。

2.6.4.2 每杯以毛筆挑入 10 隻小菜蛾 3 齡初幼蟲，杯口覆蓋紙巾及杯蓋。

2.6.4.3 放置於恆溫培養箱內，於 72 小時觀察記錄死亡幼蟲數。

2.6.4.4 每一取樣檢液須依上述程序進行 3 重複檢驗。

2.7 結果處理：

2.7.1 觀察與記錄：處理後 72 小時觀察並記錄各組幼蟲死亡數。

2.7.2 資料分析：根據蘇力菌標準液及試驗物 72 小時各組幼蟲死亡數計算下列數值：

2.7.2.1 死亡率以 Abbott's formula 校正如下：

校正死亡率 (%) = [(試驗物死亡率 - 對照組死亡率) / (100 - 對照組死亡率)] × 100。

2.7.2.2 試驗物與標準液 LC₅₀ 之計算：以濃度對數與死亡率作 Probit analysis，分析 LC₅₀。

2.7.2.3 試驗物力價換算公式：

試驗物力價 (DBMU/mg) = (標準液之 LC₅₀ / 試驗物之 LC₅₀) × 標準液力價 (DBMU/mg)。

2.7.2.4 變異係數 (Coefficient of variation, CV) 計算：

變異係數 = 標準偏差 (SD) / 平均值 (\bar{X}) × 100%。

(五) 參考文獻：

1. Beagle, C. C., Couch, T. L., Alls, R. T., Versori, P. L., Lee, B. L. 1986. Standardization of HD-1-S-1980: U.S. standard for assay of lepidopterous active *Bacillus thuringiensis*. Bulletin of the Entomological Society of America 32: 44-45。
2. Dulmage, H. T. 1976. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) δ -endotoxin using the tobacco budworm. ARS USDA Technical Bulletin No. 1528。
3. Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom。

(六) 品質管制

1. 供試昆蟲健康及感受性程度之一致性。
2. 恆溫培養箱溫度、濕度之恆定性。
3. 藥劑攪拌之均勻性。注意人工飼料溫度過低時，導致飼料與稀釋液混拌之不均勻現象。
4. 每個試驗樣品應取樣 3 次，每一取樣應進行 3 重複試驗，每一取樣檢液稀釋 6 個以上濃度，每一濃度供試昆蟲至少 30 隻。其分析結果變異係數需小於 20%，以達到檢驗正確性。
5. 試驗濃度可依標準品標定力價及試驗檢體預估力價作調整。
6. 對照組死亡率超過 10% 時，則試驗結果不可採用，必須重做。
7. 人工飼料配方可依試驗需求作變更。
8. 所有品質管制數據，均需保存以便參考及檢查。

附錄 1、小菜蛾生物活性檢定人工飼料配方建議表

| 編號 | 材料 | 重量或體積 |
|----|-------------------------------|---------|
| A | 無菌水 | 500 mL |
| | 洋菜 | 6.5 g |
| B | 4 M potassium hydroxide | 6 mL |
| | wheat germ | 33 g |
| | casein | 39 g |
| | cabbage powder | 12 g |
| C | α -cellulose | 6 g |
| | sucrose | 29 g |
| | Wesson salt mix | 10 g |
| D | 36.5% formaldehyde solution | 0.82 mL |
| | 15% choline chloride solution | 7.3 mL |
| | wheat germ oil | 2 mL |
| E | 99% L-ascorbic acid | 4 g |
| | USDA vitamin | 0.073 g |

製作步驟：

1. A、B、C、D 項，個別秤重，備用。
2. 由總量 500 mL 無菌水中取 300 mL，加入洋菜混合加熱煮溶呈透明狀。
3. 將 E 項兩種材料分別以適量無菌水攪拌溶解備用。
4. 煮溶洋菜倒入果汁機攪拌，加入預留無菌水、B 項及 C 項材料，充分攪拌混合均勻。待溫度降至 60℃ 後，加入 D 項及經溶解之兩種 E 項材料，並用少量無菌水沖洗燒杯殘餘物，完全加入人工飼料中混拌均勻。

二、以擬尺蠖 (*Trichoplusia ni* (Hubner)) 為供試昆蟲，力價單位為 IU/mg：

(一) 農藥性質：

普通名稱：蘇力菌品系包括鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 及庫斯蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)。

(二) 劑型：水懸劑 (SC)、可溼性粉劑 (WP)、水分散性粒劑 (WG) 及粒劑 (GR)。

(三) 作用：殺蟲劑。

(四) 分析方法：

1. 適用範圍：本方法適用於蘇力菌產品之鮎澤蘇力菌及庫斯蘇力菌有效成分力價檢定。

2. 檢驗方法：本實驗採用人工飼料餵食法。以擬尺蠖 2 齡幼蟲為供試昆蟲，估計 72 小時之半數致死濃度 (LC₅₀ 值)，再與標準劑比較，計算樣品之力價。

2.1 裝置：

2.1.1 均質機 (Tissue tearor)：機器零組件之轉子適用於消毒滅菌者。

2.1.2 試管振盪器 (Vortex)。

2.1.3 恆溫培養箱 (Incubator)：設定溫度 25±2℃，相對溼度 70±3%，光照週期 (光照：黑暗) = 12 hr：12 hr。

2.1.4 高壓殺菌釜 (Autoclave)。

2.1.5 電磁加熱攪拌器。

2.1.6 果汁機。

2.1.7 電子天平 (可分別顯示至小數點以下 2 位數及 4 位數者)。

2.1.8 吸管輔助器。

2.2 試藥：

2.2.1 標準劑：蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 標準劑，有效成分力價須 60,000 IU/mg 以上。

2.2.2 逆滲透水：導電度 20 μS/cm 以下，高溫滅菌後備用。

2.3 器具及材料：

2.3.1 可分解性聚乳酸 (PLA) 布丁杯容器，容量 120 mL。

2.3.2 刻度吸管 10 mL、25 mL 及 50 mL。

2.3.3 微量吸管 1,000 μL。

2.3.4 離心管 15 mL 及 50 mL。

2.3.5 燒杯 250 mL。

2.3.6 玻璃瓶 20 mL。

2.3.7 小楷毛筆。

2.2.8 溫度計 (0 至 100℃)。

2.2.9 卷筒紙巾。

2.4 蘇力菌標準液配製：

- 2.4.1 將標準劑回溫備用。
- 2.4.2 秤取蘇力菌標準劑 0.100 g(記錄至 0.001 g)，置於 20 mL 玻璃瓶中，加入 10 mL 無菌水，使用電磁加熱攪拌器（內置磁石）攪拌至完全均勻懸浮，配製成 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 標準液。
- 2.4.3 以均質機均質 1 分鐘（約 12,000 rpm）。
- 2.4.4 取 1 mL 均質過之 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 蘇力菌標準液，置於 15 mL 離心管中，加入無菌水 9 mL，稀釋成 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 標準液。
- 2.4.5 取 0.6 mL 之 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 標準液，置於 50 mL 離心管內，加入 19.4 mL 無菌水，以試管振盪器充分振盪混合均勻後使之成 30 $\mu\text{g/mL}$ 。取 10 mL 之 30 $\mu\text{g/mL}$ 標準液，加入適量無菌水進行等量序列稀釋，稀釋成 6 個以上連續梯度的處理濃度，每稀釋濃度之標準液最終定量體積為 10 mL。
- 2.5 檢液配製：
- 2.5.1 將試驗物檢體回溫備用。
- 2.5.2 依 2.4.2 至 2.4.5 之程序配製 6 個以上連續梯度的檢液處理濃度。
- 2.5.3 以無菌水作為對照組。
- 2.5.4 試驗物須進行 3 次取樣。
- 2.6 有效成分檢定：
- 2.6.1 供試生物：將感受性品系擬尺蠖在恆溫培養箱內飼育，待幼蟲由卵孵化後，約 4 天取得健康且體型大小一致的擬尺蠖 2 齡幼蟲。
- 2.6.2 製備擬尺蠖生物活性檢定人工飼料（詳見附錄 2）。
- 2.6.3 標準液混拌人工飼料：
- 2.6.3.1 在標準液 10 mL 稀釋液內，每處理濃度各加入 20 g 約 60°C 保溫之人工飼料，以試管振盪器充分振盪混拌均勻。平均倒入 PLA 容器杯中，每處理濃度人工飼料分裝成 5 杯（6 mL/杯）後，以紙巾覆蓋，放置於室溫冷卻備用。
- 2.6.3.2 每杯以毛筆挑入 10 隻擬尺蠖 2 齡幼蟲，杯口覆蓋紙巾及杯蓋。
- 2.6.3.3 放置於恆溫培養箱內，於 72 小時觀察記錄死亡幼蟲數。
- 2.6.4 檢液混拌人工飼料：
- 2.6.4.1 在檢液 10 mL 稀釋液內，每處理濃度各加入 20 g 約 60°C 保溫之人工飼料，以試管振盪器充分振盪混拌均勻。平均倒入 PLA 容器杯中，每處理濃度人工飼料分裝成 3 杯（10 mL/杯）後，以紙巾覆蓋，放置於室溫冷卻備用。
- 2.6.4.2 每杯以毛筆挑入 10 隻擬尺蠖 2 齡幼蟲，杯口覆蓋紙巾及杯蓋。
- 2.6.4.3 放置於恆溫培養箱內，於 72 小時觀察記錄死亡幼蟲數。
- 2.6.4.4 每一取樣檢液須依上述程序進行 3 重複檢驗。
- 2.7 結果處理：
- 2.7.1 觀察與記錄：處理後 72 小時觀察並記錄各組幼蟲死亡數。

2.7.2 資料分析：根據蘇力菌標準液及試驗物 72 小時各組幼蟲死亡數計算下列數值：

2.7.2.1 死亡率以 Abbott's formula 校正如下：

校正死亡率 (%) = [(試驗物死亡率 - 對照組死亡率) / (100 - 對照組死亡率)] × 100。

2.7.2.2 試驗物與標準液 LC_{50} 之計算：以濃度對數與死亡率作 Probit analysis，分析 LC_{50} 。

2.7.2.3 試驗物力價換算公式：

試驗物力價 (IU/mg) = (標準劑之 LC_{50} / 試驗物之 LC_{50}) × 標準液力價 (IU/mg)。

2.7.2.4 變異係數 (Coefficient of variation, CV) 計算：

變異係數 = 標準偏差 (SD) / 平均值 (\bar{X}) × 100%。

(五) 參考文獻：

1. Beagle, C. C., Couch, T. L., Alls, R. T., Versori, P. L., Lee, B. L. 1986. Standardization of HD-1-S-1980: U.S. standard for assay of lepidopterous active *Bacillus thuringiensis*. Bulletin of the Entomological Society of America 32: 44-45。
2. Dulmage, H. T. 1976. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) δ -endotoxin using the tobacco budworm. ARS USDA Technical Bulletin No. 1528。
3. Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom。

(六) 品質管制

1. 供試昆蟲健康及感受性程度之一致性。
2. 恆溫培養箱溫度、濕度之恆定性。
3. 藥劑攪拌之均勻性。注意人工飼料溫度過低時，導致飼料與稀釋液混拌之不均勻現象。
4. 每個試驗樣品應取樣 3 次，每一取樣應進行 3 重複試驗，每一取樣檢液稀釋 6 個以上濃度，每一濃度供試昆蟲至少 30 隻。其分析結果變異係數需小於 20%，以達到檢驗正確性。
5. 試驗濃度可依標準品標定力價及試驗檢體預估力價作調整。
6. 對照組死亡率超過 10% 時，則試驗結果不可採用，必須重做。
7. 人工飼料配方可依試驗需求作變更。
8. 所有品質管制數據，均需保存以便參考及檢查。

附錄 2、擬尺蠖生物活性檢定人工飼料配方建議表

| 編號 | 材料 | 重量或體積 |
|----|-------------------------------|---------|
| A | 無菌水 | 750 mL |
| | 洋菜 | 7.5 g |
| B | soya flour | 80.3 g |
| C | wheat germ | 36.5 g |
| | sucrose | 14.6 g |
| | Wesson salt mix | 11.68 g |
| D | 36.5% formaldehyde solution | 2.8 mL |
| | 15% choline chloride solution | 10 mL |
| E | 99% L-ascorbic acid | 4 g |
| | USDA vitamin | 0.109 g |

製作步驟：

1. 將 A、B、C 及 E 項材料個別秤重備用。
2. 由總量 750 mL 無菌水取 400 ml 加入 B 項材料浸泡數分鐘後，放入微波爐煮沸，倒入果汁機中攪拌，同時加入 C 項材料混拌均勻。
3. 取 300 mL 無菌水，加入洋菜混合加熱煮溶呈透明狀。
4. 將 E 項兩種材料分別以適量無菌水攪拌溶解備用。
5. 待溫度降至 60°C 後，加入 D 項及經溶解之兩種 E 項材料，並用少量無菌水沖洗杯中殘餘物，完全加入人工飼料中混拌均勻備用。