



# 環境用微生物製劑中蘇力菌之力價檢定方法

中華民國87年11月19日（87）環署檢字第77883號公告  
自中華民國88年2月19日起實施  
NIEA E210.01C



## 一、方法概要

本實驗採用浸浴法（Dipping method）進行，以埃及斑蚊（*Aedes aegypti*）Bora-Bora品系四齡初幼蟲為供試昆蟲，估計24小時LC<sub>50</sub>值（半數致死濃度），再與標準劑比較，計算樣品之力價（Potency）。

## 二、適用範圍

本檢定方法適用於蘇力菌以色列亞種（變種）（*Bacillus thuringiensis* subsp. (var.) *israelensis*）生物檢定。

## 三、干擾

- （一）供試昆蟲健康程度之一致性。
- （二）人工培養箱溫度濕度之恆定性。
- （三）藥劑攪拌之均勻性。

## 四、設備

- （一）量筒：一般使用100mL、250mL及500mL之玻璃量筒。
- （二）吸量管：使用具有0.5mL刻度之3mL塑膠吸量管及具有0.1刻度之1mL、5mL、10mL及25mL之玻璃吸量管。
- （三）試管：具有0.1mL刻度之10mL玻璃試管。
- （四）塑膠PVC布丁杯（或紙杯、玻璃杯）：直徑7.9cm、高5.7cm、容量250mL。
- （五）養蟲用塑膠水盤：長29.5cm、寬23cm、高2cm。
- （六）稀釋瓶：一般使用有100mL刻度及250mL刻度，且能耐高溫殺菌之玻璃製品。
- （七）人工培養箱：溫度能保持在25±1°C，相對溼度70±3%，光照週期（光照：黑暗）= 12：12。
- （八）冰箱：溫度能保持在0～5°C者。
- （九）電磁攪拌器：稀釋時使用，速度由慢而快，如有九個刻度者，本試驗之速度刻度設定為3，其轉速約為420rpm。
- （十）分注器（Dispenser）：一般使用有5mL、1mL、0.2mL及0.1mL。
- （十一）磁石：長2.5cm、重3.32g。
- （十二）自動吸量管：使用範圍1mL至25mL具有刻度之玻璃吸量管。

## 五、試劑及供試生物

### (一) 供試生物

在人工培養箱內（ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $70\pm 3\%$ 相對溼度，光照：黑暗=12：12），將乾燥的產卵紙片浸於蒸餾水中，待幼蟲孵化後，將飼養密度調整為每個方形盤（長29.5公分×寬23公分）裝盛500mL蒸餾水飼養約400隻蚊蟲的密度，1至2齡幼蟲以台糖健素粉餵食，3至4齡則可用錠劑，逐日刮去水盤中的薄膜及添加食物，約七天後可得齡期一致的四齡初供試埃及斑蚊之Bora-Bora品系幼蟲。

### (二) 標準劑

根據 Mclaughlinetal. (1984) 之推荐，採用法國巴斯德研究院Dr.deBarjac 提供之IPS-82做為標準劑。標準劑至少需50mg，力價為15,000IU/mg。

## 六、樣品保存與處理

樣品密封後置於 $4^{\circ}\text{C}$ 之冷藏箱中冷藏。

## 七、步驟

### (一) 供試容器之處理：

於容量250mL之PVC製杯中（紙杯或玻璃杯亦可）盛230mL蒸餾水備用。

### (二) 測試濃度之配製：

每一組生物檢定（Bioassay）包括對照組（僅以蒸餾水處理）標準組和供試樣品組，供試藥劑取樣不得低於50mg為原則，其儲存懸浮液（Stocksuspension）濃度為100ppm，以蒸餾水作系列稀釋。每個藥劑稀釋過程皆攪拌15分鐘在進行範圍找尋（Rangefinding）時以對數方式稀釋，經確定範圍後，在稀釋倍數不超過10倍的範圍內，應至少包括六個測試濃度。

### (三) 藥劑之施用：

供試稀釋液以電磁攪拌器，攪拌均勻，以吸量管吸取10mL供試藥液加入已盛裝230mL蒸餾水之供試容器中。

### (四) 蟲隻之處理：

將內含約20隻供試蚊幼蟲之10mL蒸餾水倒入已施加藥劑之供試容器中，添加台糖健素粉、加蓋，每個處理濃度進行10次重複分析。將試驗置於恆溫培養箱內（ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $70\pm 3\%$ 相對濕度，光照：黑暗12：12）進行觀察。

## 八、結果處理

### (一) 觀察與記錄：

處理後24小時觀察並記錄七（四）中各組之死亡率。

### (二) 死亡率之校正：

對照組之死亡率不得超過10%，記錄之死亡率要經下式（Abbott formula）校正。

(三) 標準劑LC<sub>50</sub>值之計算：依八（一）記錄死亡率，經校正後，以死亡機率值（Probit）為縱座標，濃度對數值為橫座標，作死亡機率值分析（Probit analysis）估算LC<sub>50</sub>值。

(四) 樣品LC<sub>50</sub>之計算：計算方法同標準劑。

(五) 樣品力價之計算：

$$\text{樣品力價} = \frac{\text{標準劑之 LC}_{50}}{\text{樣品之 LC}_{50}} \times 15,000 \text{ (國際單位/毫克)}$$

## 九、品質管制

- (一) 上述試驗應重複三次，如果三次生物檢定獲得樣品力價變異係數（Coefficient of Variation, CV）超過0.2，則至少需再做兩組生物檢定。
- (二) 如果對照組死亡率超過10%時，則試驗結果不可採用，必須重做。

## 十、精密度及準確度

略。

## 十一、參考資料

- (一) de Barjac, H. and Thiery-Larget, I. 1984. Characteristics of IPS-82 as Standard for Biological Assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparation. WHO/VBC/84.892. World health Organization, < Geneva. 10pp.
- (二) Dame, D.A. and Saveage, K. E, Meisch M.V. and Oldacre, S. I. 1981. Assessment of Industrial Formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Mosq. News, 41:540-546.
- (三) Dulmage, H.T., Mclaughlin, R.E., Lacey, L.A. Couch, T.L. Alls, R. T. and Rose, R.I. 1985. HD-968-S-1983, A Proposed U.S. Standard for Bioassay of Preparations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*-H-14. Bull Entomol. Soc. Am. 31:31-34.
- (四) Goldberg, L. and Marglit. J. 1977. Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenis unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq News, 37:355-358.
- (五) Hall, I., Arakawa. K., Dulmage, H. and Correa, J. 1977. The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and *Culex* mosquitos. Mosq News, 37:24.
- (六) Lacey, L. A. and Lancey, J.M.1981. the Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*(H-14) Against Mosquitoes of the Central Amazon Basin. Mosq. News, 41:26-270.
- (七) Lacey, L.A. and Singer, S.1982, Larvicidal Acticity of New Isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against Anopheline and Culicine mosquitoes. Mosq. News 42:537-542.
- (八) Mclaughlin, R.E., Dulmage, H.T., Alls, R., Couch, T.L., Dame, D.A., Hall, I.M., Rose, R.I. and Versoi, P. L. 1984, U.S. Standard Bioassay for the Potency Assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 Against Mosquito Larvae. Bull. Entomol. Soc. Am. 30:26-29.
- (九) Mulla, M.S., Federici, B.A., Darwazeh, H.A. and Brenner R.J. 1982. Microbial Control Agents as Mosquito Larvicides. In Bactimos Reprints. Biochem Products. 52pp.
- (十) Purcell, B. H. 1981. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Aedes taeniorhynchus* and Some Non-Target Organisms in the Salt Marsh. Mosq. News 41:476-483.
- (十一) Snow, K.R. 1984. Evaluation of *Bacillus Thuringiensis*, serotype H-14 Formulation as Larvicides for *Aedes Punctur*(Kirby). International Pest Control 26:12-14.
- (十二) Thiery, I. 1987. Constraints and Value of Bioassay for Standardization of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. PP.677-681. In Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. (EDS). Samson R. A. Valk, J.M. and Peters, D. Society of Invertebrate Pathology. Wageningen, The Netherlands. 711pp.
- (十三) Van Essen, F.W. and Hembree, S.C. 1980. Laboratory Bioassay of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Against All Instars of *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus* larvae. Mosq.

News 40:424-431.

- (十四) WHO. 1982. Data sheet on the Biological Control Agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14(de Barjac,1987) WHO/VBC/79.750 Rev. I:VBC/BCDS/79.01 World Health Organization, Geneva.
- (十五) Yap,H.H.1987. Microbial Insecticides in Aquatic Environments: Factors Affecting Efficacy in the Field. FFTC Technical bulletin NO.104.9pp.