

## 蘇力菌製劑之品質管制

高穗生 段淑人

台灣省農業藥物毒物試驗所  
生物藥劑系

### 摘 要

蘇力菌製劑之殺蟲藥效在於產品中殺蟲結晶蛋白之種類與含量的多寡。因此該類商品品質管制之重點可分為主成分含量測定、產品鑑定、有害不純物之檢測及成品理化性檢驗。主成分測定係以梨山品系小菜蛾做為標準供試蟲，進行生物檢定以決定商品小菜蛾力價。迄今檢測之六十件樣品中僅有四件不合格。同時又建立了以玉米螟及斜紋夜盜蛾為供試蟲之標準測試法。另已建立兩種生化分析法：分別利用多源抗體之酵素聯結免疫吸附檢定法 (ELISA) 或聚丙烯醯胺分離膠體電泳分析法 (SDS-PAGE) 測得產品主成份之種類與含量。此二檢定法較傳統生物檢定法更為簡便、省時省力，且靈敏度高，專一性強，再現性良好，並可同時進行大量樣品檢驗。目前經由 ELISA 及 SDS-PAGE 二法所測商品之相對力價與標示力價符合率均高，而與生物檢定之結果亦大致相符。產品之鑑定項目包括有：標準生化及形態測試、鞭毛抗原血清分析、原生質體剖面圖之分析等。並預計利用 HPLC 檢測部分品系之有害不純物  $\beta$ -外毒素。在成品之理化檢驗部分包括許多項目依農藥劑型之不同而異。本所擬於八十四年度完成蘇力菌品質管制之檢驗體系，並參照美國 EPA 之管理辦法，做好該類製劑之品質工作。

### 前 言

在歐美先進國家（美、西德、瑞士）微生物製劑已被普遍地應用於植物保護或環境衛生的蟲害防治工作上，且有良好的成效。現有之產品種類繁多，包括真菌（白僵菌、黑僵菌）、病毒（*Heliothis zea* NPV、*Trichoplusia ni* NPV）、原生動物（*Nosema locustae*）、以及蘇力菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *krustaki*、*aizawai*、*israelensis* 三亞種之產品 (DIPEL<sup>®</sup>, THURICIDE<sup>®</sup>, BIOBIT<sup>®</sup>, CONDOR<sup>®</sup>, MVP<sup>®</sup>, TUREX<sup>®</sup>, XENTARI<sup>®</sup>, VECTO-BAC<sup>®</sup> etc.)。一般而言，此類藥劑之藥效專一性，及對人畜、天敵等非標的生物之安全性均高於化學藥劑，且開發所需花費之成本及時間亦較節省，又無農藥殘毒之顧慮，故近年來在本省之推廣市場已被看好，申請登記上市之商品種類正陸續增加中。目

前最普遍且農民接受率最高之微生物藥劑應屬蘇力菌一類之藥劑，隨著農業市場之需要，其主成份之種類(Btk, Bta, Bti...; Cry IA, Cry IC, Cry III, Cry IV...)、含量(3%, 3.8%, 6.4%, 7.5%, 10.3%...)、以及劑型(WP, WDG, G, SC, AF, OF...)均走向多元化，針對不同之標的害蟲、施用作物或施藥方式，改良製劑配方，以提高該藥劑之殺蟲效力及擴大防治範圍。面對五花八門之各式蘇力菌藥劑，政府對此類藥劑之管理政策必須周詳完善，且品質管制之作業系統、評定標準、與分析技術亦必須能符合日新月異之產品，方能達到品質管制之效果。

### 品質管制之目的

品質管制之目的在於防止人為之疏失，以及避免不良之生產批次藥劑流入田間，造成藥效不佳、無法防治害蟲，或意外藥害等情事之發生，以確保農民及廠商之權益。因此品質管制之工作不僅需要農政管理單位之確實督導、檢驗機構之嚴格執行、專家學者之技術支援，更需要農藥廠商、以及農民之密切配合，可謂是結合廠、官、學、農之努力，方能共同做好之大工程。此項工作依品管性質及目的可分成三個階段：第一階段為藥劑製造工廠內部之例行品管檢驗工作，在每一個生產步驟包括培養、發酵、製劑、包裝，均需經過層層關卡之抽驗，以確保整生產條件控制無誤，且每一批次藥劑之主成份含量能符合一定之標準以保證藥效。第二階段為藥劑申請登記上市之審查及試驗工作（圖一），包括毒理資料之審查（表一）、田間藥效之試驗、室內生物檢定、及田間藥害試驗等，通過一連串之審查及試驗之後，確保該藥劑之安全性及對本省標的害蟲之有效性後，可由行政院農業委員會核發登記證，而取得上市資格。第三階段為市售之藥劑的抽驗（由農林廳每年度執行全省抽樣），或進口成品不同批次之檢驗（由廠商自行送檢），以篩檢保存不良或超過保存期限而失去藥效、及生產不良批次、主成份含量不足或有效成份喪失活性之藥劑，以保障銷售廠商之信譽及農民之權益。

### 蘇力菌藥劑品質管制

蘇力菌產品之品質管制及標準化較一般化學藥劑複雜。由於蘇力菌產品係由側孢晶體、內生孢子為主成分，加入填充劑、防腐劑、紫外線保護劑及昆蟲取食促進劑等佐劑所組成。其殺蟲機制為標的害蟲幼蟲攝入側孢晶體毒蛋白後，經鹼性中腸腸液與分解酵素之作用，使晶體分解成具毒性之次單位（即毒素），造成幼蟲中腸細胞滲透壓不平衡、中腸穿孔、血腔酸鹼值改變，進而導致蟲體麻痺。因此，該類藥劑之殺蟲

效果係與側孢晶體之毒蛋白種類、含量與生物活性成正相關。以往蘇力菌藥劑之評估標準係以孢子含量為藥效高低之指標，其缺點是無法涵蓋毒蛋白之含量與毒效，而不能代表真實之藥效。由於近年來發展之蘇力菌藥劑均以殺蟲毒蛋白為主成分，故因應而生之生化分析法便極受重視。但某些害蟲必須在蘇力菌孢子同時存在時，結晶毒蛋白才能對害蟲發揮最大的毒殺效果，而一般生化分析方法又無法評估細菌孢子的數目與活性，因此行之有年的生物檢定法，似乎仍是目前大多數專家學者較為信賴的評估方法。以下就蘇力菌製劑之主成分含量、產品鑑定、有害不純物及規格檢驗等四項逐一討論之：

1. 蘇力菌主成分之檢測：蘇力菌主成分含量之檢測依美國環境保護署之規定可利用生物檢定法、酵素聯結免疫吸附檢定法、電泳分析法、或高效液態層析法，來訂定該類藥劑之力價（International unit/mg）或毒蛋白的含量百分比。而歐美許多知名的農藥製造公司，如Abbott Lab, Ecogen, Sandoz, Mycogen, Ciba Geigy均分別利用下列的檢定分析法進行主成分之測定。

(1) 生物檢定法：美國、西德等國採用擬尺蠖(*Trichoplusia ni*)幼蟲為生物藥效力價測試之標準供試昆蟲，訂定力價單位為IU/mg；日本採用家蠶(*Bombyx mori*)為供試蟲，訂定力價單位為BKU/或BBU/mg；中國大陸採用玉米穗蟲(*Heliothis armigera*)或小菜蛾為供試蟲。而我們為配合台灣蔬菜作物害蟲為害情形，及現有蘇力菌藥劑之防治對象申請狀況，訂定以小菜蛾(DBM, *Plutella xylostella*)三齡初蛻幼蟲為供試昆蟲。利用飼料混拌法，將系列稀釋藥液與人工飼料均勻混拌後，定量倒入布丁杯中，接入定數小菜蛾三齡幼蟲，48小時後換予新鮮無毒飼料，並累記幼蟲72小時內之死亡率，經Abbott Formula校正後，以Probit Analysis計算其半致死濃度(LC50)，並與標準劑（HD-1-S-1980或送檢廠商提供原廠標準劑）比較，估算該藥劑之力價（DBM unit/mg）。[樣品力價(DBM unit/mg)=(標準劑LC50÷樣品LC50)×標準品力價]。在近三年內，共計進行了六十件蘇力菌力價檢驗案件，檢驗結果藥效力價偏低、不合格之比例佔百分之六點七。本所亦於八十一及八一二年度，先後建立了以斜紋夜盜蛾、及亞洲玉米螟幼蟲為供試蟲之室內藥效測定法。同時也希望儘快探究出以擬尺蠖幼蟲與小菜蛾幼蟲為供試蟲進行生物檢定時，其測試結果間力價之相關性。以期能發展出更具代表性之標準測試法。

(2) 酵素聯結免疫吸附檢定法(ELISA)：本所採用專一性良好之多源抗體，（抗血清之製備方法係將毒蛋白以電泳分析法分離純化後，再經過蛋白質溶離與透析而取得抗原，又將抗原以皮下多處注射法免疫紐西蘭白兔，經力價追蹤測試後，

採大量之兔血離心，即可得到抗血清），以間接酵素聯結免疫吸附檢定法建立標準曲線，將標準劑HD-1-S-1980(16,000 IU/mg)及待測品經鹼溶處理後，其中所含之毒蛋白即可經由離心取上清液而得，再將其作二倍之系列濃度稀釋，爾後進行ELISA試驗，其步驟如下：

- a) Coating不同濃度之純化結晶蛋白4°C隔夜培養(100  $\mu$  l/well)。
- b)棄卻a)並以0.5%安佳脫脂奶粉做Blocking，室溫1小時(150  $\mu$  l/well)。
- c)棄卻b)並以PBS-Tween利用自動洗盤機清洗三次。
- d)加入以PBS稀釋200倍之自製陽性血清溶液，於室溫培養1小時，(100  $\mu$  l/well)。
- e)棄卻d)並以PBS-Tween利用自動洗盤機清洗三次。
- f)加入Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti- Rabbit IgG (H+L)2500倍稀釋濃度，於室溫1小時(100  $\mu$  l/well)。
- g)棄卻f)並以PBS-Tween利用自動洗盤機清洗五次。
- h)加入0.1% PNPP/Substrate buffer，呈色一小時後以Molecular Devices kinetic microplate reader Vmax判讀於波長405nm時之吸光值，以計算出OD值(y)與毒蛋白濃度(Log,x)之相關式 $y=a+bx$ 。

將各濃度之吸光值分別代入純化蛋白質標準相關式，換算出樣品中晶體蛋白之含量與相對力價。所測商品之相對力價與其標示力價符合率均高(93.6-99.4%)，且與生物檢定結果亦多半相符合(89.6-98.8%)。得知酵素聯結免疫吸附檢定法操作簡便、專一性強、靈敏度高且再現性強，偵測效率較傳統式生物檢定法省時省工，並可避免生物檢定時因供試昆蟲品種對藥劑感受性差異，而導致藥劑力價估算不確實之虞。本法適用於蘇力菌產品製劑過程中之常規檢測工作，並可作為上市前蘇力菌商品品質管制之參考。

(3)電泳分析法(SDS-PAGE)：本所以電泳分析法測定蘇力菌商品中毒蛋白之含量，樣品先經含微量EDTA之高鹽緩衝液懸浮處理後，再進行10%聚丙烯醯胺分離膠體電泳分析並以苦抹藍CBR染色後。利用穿透式電泳密度測定儀測得某條蛋白帶之吸光值，再配合電腦套裝軟體之分析，詳細步驟如下：

- a)取50毫克之蘇力菌商品溶於1毫升溶液(2M NaCl, 10 mM EDTA)中，以15,000rpm (KUBOTA KM-15200)離心二分鐘，取沈澱物以10mM EDTA再懸浮，並以15,000 rpm(KUBOTA KM-15200)離心二分鐘後，取沈澱物溶於50  $\mu$ l 10 mM EDTA，加入等量2X sample buffer，煮沸5分鐘即可進行SDS-PAGE電泳分析。

- b) 參考 Laemmli(1970)之方法，配製 4% stacking gel 及 10% resolving gel，用 BIO-RAD Mini-PROTEAN II (0.75mm spacers) 及 20 mA 之電流進行電泳分析，而後以 0.2% Coomassie Brilliant Blue R 染色，再以 25% 甲醇及 10% 醋酸褪染，以塑膠膜封片陰乾備用。
- c) 經染色褪色後之電泳膠片，利用電泳密度測定儀 (BIO-RAD Model 620 CCD Densitometer) 以 600 nm 波長之光源掃描膠片，所得之吸光值再以 1-D Analyst/Macintosh Data Analysis Software 套裝軟體分析積分數值，求出 Cry IA 標準直線迴歸方程式，並將樣品標準劑與樣品之毒蛋白吸光值代入方程式，求出毒蛋白含量及樣品相對力價。

此種生化分析法較傳統生物檢定法更為簡便、省時省力且精確性高、再現性良好，可確實反映出商品主成份毒蛋白之種類與其含量之多寡。目前經由電泳分析法檢測之商品其相對力價與標示力價符合率均高 (91.5-98.9%)；而與酵素聯結免疫吸附檢定法之結果符合率亦高 (98.2 - 106.1%)。唯少數商品測試發現，以上二法與生物檢定法之間有差距較大之高估現象，推測其原因可能係生化分析法所測得之結晶蛋白含量同時包括有殺蟲活性及無殺蟲活性蛋白質，導致估算含量偏高。故該技術適用於蘇力菌製劑中，新產品主成份含量之常規監測及工廠品質管制之參考，而市售產品之抽驗則需配合生物檢定結果相互印證，才能更正確地判定產品之優劣。然此法在藥劑申請上登記上市時亦不失為鑑定主成分毒蛋白種類之好方法。

#### (4) 高效液態層析法 (HPLC)：

本所擬於下年度利用 Size-exclusion、affinity chromatography、或 C-18 reversed-phase column 建立快速、精確層析法，用以測定蘇力菌商品中主成份一殺蟲毒蛋白之含量，監測申請登記之新農藥其主成份含量是否符合標準，以確保藥劑品質達到農藥品質管制之目的。

2. 蘇力菌產品之鑑定：蘇力菌商品種類繁多，且近年來國際間不斷地開發更新更有殺蟲效力的品系，甚至以遺傳工程之技術製造毒素產量較高、或者含有多種殺蟲毒素之人工品系，同時 me-too compound 之商品也隨之增多。因此，蘇力菌產品之來源品系的鑑定工作也就日形重要。產品之鑑定項目包括有：標準生化及形態測試、鞭毛抗原血清分析、革蘭氏陽性反應、抗生素感受性模式測試、生產殺蟲毒素種類之測定、原生質體剖面圖之分析、標的昆蟲寄主範圍之生物檢定、小白鼠腹膜內毒性／病原性之篩檢。前四項測試方法本年度正在進行中，而殺蟲毒素種類之測定可利用電泳分析法及高效液態層析法來測定。目前已建立原生質體剖面圖分

析法，自蘇力菌培養液中抽取質體後，經 0.6% 洋菜凝膠電泳分析，及 Ethidium bromide 染色，再利用紫外光之透射，可看出不同蘇力菌亞種具有不同之原生質體剖面圖，且每亞種所帶之原生質體個數與分子量大小也有明顯之差異，可鑑別不同蘇力菌之亞種及品系，此法適用於辨識製劑之 me-too compound。

3. 不純物之檢測：某些蘇力菌亞種或品系（*Bt. subsp. kurstaki* NRD-12, *thuringiensis*, *tolworthi*, *darmstadiensis*）在醱酵的過程中，會產生  $\beta$ -外毒素，此為腺嘌呤核苷酸類似物，對家蠅的幼蟲具有相當高的致死力，且會造成昆蟲發育畸形；最重要的是哺乳動物之訊息核糖核酸（mRNA）亦對此毒素相當敏感，會影響正常之蛋白質合成作用。因此美國環境保護署絕不認可含有該毒素之藥劑，而對新開發品系之蘇力菌產品均加強篩檢其是否含有  $\beta$ -外毒素。以前大多是以家蠅幼蟲進行生物檢定，但既費時又不夠敏感，故近年來利用高效液態層析法（HPLC）可快速且精確地檢測  $\beta$ -外毒素的含量，達成爲消費者安全把關的任務。
4. 成品之規格檢驗：成品農藥標準規格檢驗包括理化檢驗及生物檢驗兩大項，理化檢驗依農藥劑型之不同（如乳劑、可濕性粉劑、水懸劑、粒劑、水分散性粒劑等）所需檢驗的項目亦有所差別，例如最普遍的可濕性粉劑需做有效成分、細度、懸浮率、及水濕性試驗。而水懸劑則需檢驗有效成分、細度、懸浮率、分散性、起泡試驗、及安定試驗。此類檢驗結果有助了解藥劑在田間施用時應注意的條件，以增進田間藥效，並避免藥害的發生。生物檢驗包括室內藥效測定及藥害測定（辦理農藥委託田間試驗者，申領農藥許可證時，免辦本項試驗）。

## 品質管制工作的現況及目標

近年來行政院農業委員會非常重視蘇力菌藥劑之品質管制工作，已連續五年將此工作列爲“農藥安全使用及農業藥物毒物研究”之重點研究計畫。省政府農林廳及其所屬省藥試所等單位均對此等工作不遺餘力。目前已逐年建立了數套檢驗方法，包括生物檢定法（小菜蛾、斜紋夜盜蛾、玉米螟）、生化測定法（酵素聯結免疫吸附檢定法、電泳分析法、原生質體剖面圖分析法）、生理檢驗法（菌種品系生理生化測試分類系統）、及成品農藥理化檢驗法（暫訂）。但面對國際間新藥劑、新劑型的快速發展，蘇力菌製劑不同劑型標準規格之訂定，與檢測技術實爲當前蘇力菌品質管制工作的重要課題。

## 結 語

農藥的品質管制工作是一項農政單位及研究機構攜手合作，為農民、消費者及優良農藥廠商之權益把關的重要工作，更是一種需要專業知識與先進技術才能完成的艱巨任務。不可諱言的，本省對蘇力菌藥劑開發的腳步較其他國家落後二、三十年，可想而知該類藥劑的品質管制工作的政策制度、及技術方法亦在研究發展的起步階段，遠不及歐美先進國家來得完善。因此，我們迫切需要各廠商的配合與協助，提供我們意見與技術，讓蘇力菌品質管制之工作進度能一日千里，登上國際水準，共同做好農藥品質管工作。

## 引用文獻

- 1.大庭道夫。1991。バイオ農藥の開發技術。"バイオ農藥・水産藥の開發と利用"(監修 江草周三、駒田旦、岩花秀典)，p.37-42. CMC. Japan.
- 2.沈鞠群、楊團員、喻子牛.1990.聯結免疫吸附測定法測定四種蘇云金杆菌菌株的晶體蛋白含量.生物防治通報增刊: 47-50.
- 3.段淑人、宣詩玲、高穗生.1993.利用酵素聯結免疫吸附檢定法測定蘇力菌商品力價之研究.植物保護會刊35: 70-78.
- 4.羅紹彬、閻建平、戴順英、張用梅、劉娥英、胡名瑞.1990.測定蘇云金杆菌制劑伴孢晶體蛋白指示毒力效价的方法.生物防治通報.6(2): 85-87.
- 5.Andrews, R. E. Jr., J. J. Iandolo, B. S. Campbell, L. I. Davidson and L. A. Bulla Jr. 1980. Rocket immunoelectrophoresis of the entomocidal parasporal crystal of thuringiensis subsp. Appl. Environ. Microbiol. 40: 897-900.
- 6.Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. Thuringiensis and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1-24.
- 7.Birnboim, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods in Enzymology 100: 243- 255.
- 8.Brussocck, S. M., and T. C. Currier. 1990. Use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to quantify Bacillus thuringiensis delta-endotoxins. · pp. 78-87. In Hickie, L. A. and W. L. Fitch. (eds.), Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis. ACS symposium series No. 432 · 148pp.
- 9.Bulla, L. A., L. J. Kramer, D. J. Cox, B. L. Davison and G. L. Lookhard. 1981. Purification

- and characterization of the entomocidal protoxin of Bacillus thuringiensis. J. Biol. Chem. 256: 3000-3004.
10. Chak, K. F., and Y. M. Young. 1990. Characterization of the Bacillus thuringiensis strains isolated from Taiwan. Pro. Natl. Sci. Counc. B. ROC. 14: 175-182.
11. Chestukhina, G. G., I. A. Zalunin, L. I. Kostina, T. S. Kotova, S. P. Kattrukha and V. M. Stepanov. 1980. Crystal-forming proteins of Bacillus thuringiensis. Biochem. J. 187: 457-465.
12. Edwards, D. L., Payne, J., and Soares, G. G. 1988. Novel isolates of Bacillus thuringiensis having activity against nematodes. European Patent Application, EPO 303 426 A2. Chem. 263: 561-567.
13. Endo, Y., and J. Nishiitsutsuji. 1980. Mode of action of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol. 36: 90-103.
14. Faust, R. M., Abe, K., Held, G. A., Iizuda, T., Bulla, L. A., and Meyers, C. L. 1983. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Plasmid 9: 98-103.
15. Finey, D. J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University.
16. Gonzalez, J. M. Jr., Dulmage, H. T., and Carlton, B. C. 1981. Correlation between specific plasmids and endotoxin production in Bacillus thuringiensis. Plasmid 5: 351-365.
17. Gonzalez, J. M. Jr., and Carlton, B. C. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of Bacillus thuringiensis. Plasmid 3: 92-98.
18. Grinsted, J. and Bennett, P. M. 1988. Preparation and electrophoresis of plasmid DNA. In "Plasmid Technology" (J. Grinsted and P. M. Bennett, Eds.), p. 129-142. Academic Press, London.
19. Groat, R. G., J. W. Mattison and E. J. French. 1990. Quantitative immunoassay of insecticidal proteins in Bacillus thuringiensis products. pp. 88-97. In Hickle, L. A., and W. L. Fitch, eds. Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis. ACS symposium series No. 432. 148 pp.
20. Hofte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
21. Kao, S. S., and S. J. Tuan. 1992. Bacillus thuringiensis potency bioassay against Plutella xylostella larvae. p.276. Proceedings XIX International congress of Entomology. Beijing,



China. June 28- July 4, 1992.

22. Kronstad, J. W. and Whiteley, H. R. 1986. Three classes of homologous Bacillus thuringiensis crystal-protein genes. *Gene* 43: 29-40.
23. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
24. Lecadet, M. M., and D. Martouret. 1987. Host specificity of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxin toward Lepidopteran species: *Spodoptera littoralis* Bdv. and *Pieris brassicae* Invertebr. Pathol. 49: 37-48.
25. Lereclus, D., Delecluse, A., and Lecadet, M. M. 1993. Diversity of Bacillus thuringiensis toxins and genes. In "Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice" (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs, Eds.), p. 37-69. John Wiley & Son, New York.
26. Luthy, P., and Ebersold, H. R. 1981. Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: Histopathology and molecular mode of action. In "Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases" (E. W. Davison, Ed.) p. 235-267. Allanheld, Osmun Publishers, Totowa, New Jersey.
27. Ma, M., and J. Ballerino. 1988. Course in hybridoma technology. Summer Session II, July 11th -August 19th, 1988 Department of Entomology, UMCP 61pp.
28. Ma, M., J. K. Burkholder, R. E. Webb and H. T. Hsu. 1984. Plasticbead ELISA: an inexpensive epidemiological tool for detecting gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 77: 537-540.
29. Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P., and Burges, H. D. 1992. Distribution, frequency, and diversity of Bacillus thuringiensis in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1344-1350.
30. Pang, A. S. D., and B. Mathieson. 1991. Peptide mapping of different Bacillus thuringiensis toxin gene products by CNBr cleavage in SDS-PAGE gels. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 82-93.
31. Smith, R. A., and J. T. Ulrich. 1983. Enzymelinked immunosorbent assay for quantitative detection of Bacillus thuringiensis crystal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 586-590.
32. Smith, R. A., and Couche, G. A. 1991. The phyllophane as a source of Bacillus thuringiensis variants. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 311-315.
33. Tyski, S. 1989. Radioimmunoassay of delta-endotoxin from B. thuringiensis: Correlation with bioassay. *Toxicon* 27: 947-949.

34. Tyrell, D. J., L. A. Bulla, Jr., R. E. Andrews, Jr., K. J. Kramer, L. I. Davidson and P. Nordin. 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected Bacillus thuringiensis strains. *J. Bacteriol.* 145: 1052-1062.
35. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington D. C., 1988. Registration standard for the reregistration of pesticide products containing Bacillus thuringiensis as the active ingredient, , Case No. 0247. 48pp.
36. Wie, S. I., R. E. Andrews, B. D. Hammock, R. M. Faust and L. A. Bulla Jr. 1982. Enzymelinked immunosorbent assay for the detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 891-894.
37. Wie, S. I., B. D. Hammock, S. S. Gill, Elizabeth Grate, R. E. Andrews Jr., R. M. Faust, L. A. Bulla Jr., and C. H. Schaefer. 1984. An improved enzymelinked immunoassay for the detection and quantification of the entomocidal parasporal crystal proteins of Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *Appl. Bacteriol.* 57: 447-454.
38. Winkler, V. W., G. D. Hansen, and J. Yoder. 1971. Immunochemical analysis of parasporal crystal digests of Bacillus thuringiensis as an index of insecticidal activity. *J. Bacteriol.* 171: 965-974.

附件一

### 蘇力菌主成分委託試驗申請書

申請廠商：\_\_\_\_\_ 申請日期：\_\_\_\_\_

地 址：\_\_\_\_\_

聯 絡 人：\_\_\_\_\_ 電 話：\_\_\_\_\_ 傳真機：\_\_\_\_\_

農藥商品名稱：\_\_\_\_\_

農藥主成份：Bacillus thuringiensis subsp. \_\_\_\_\_ strain \_\_\_\_\_  
Toxin \_\_\_\_\_

主成份含量：\_\_\_\_\_ 標示力價：\_\_\_\_\_ 劑 型：\_\_\_\_\_

送檢樣品批號：\_\_\_\_\_ 申請防治對象：\_\_\_\_\_

### 以下由試驗單位填寫

送檢藥劑用量：\_\_\_\_\_ 標準劑用量：\_\_\_\_\_

接受委託日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日 預定完成日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

試驗編號：\_\_\_\_\_ 試驗單位：台灣省農業藥物毒物試驗所生物藥劑系

試驗負責人：\_\_\_\_\_ 電話：(04)3302010-304 傳真機：(04)3323073

附件二 (一式三頁)

### 蘇力菌主成分委託試驗申請基本資料表

申請廠商：\_\_\_\_\_ 地址：\_\_\_\_\_

負責人：\_\_\_\_\_ 電話：\_\_\_\_\_ 傳真機：\_\_\_\_\_

#### (一) 藥名稱及產品組成

普通名稱：(中文)\_\_\_\_\_ 含量：\_\_\_\_\_

劑型：\_\_\_\_\_

(英文)\_\_\_\_\_ 含量：\_\_\_\_\_

劑型：\_\_\_\_\_

農藥主成份：Bacillus thuringiensis subsp.\_\_\_\_\_ strain\_\_\_\_\_

Toxin\_\_\_\_\_

商品名稱：\_\_\_\_\_ 批號：\_\_\_\_\_

原體製造工廠：

名稱：\_\_\_\_\_

所在地：\_\_\_\_\_

成品來源：  自行生產  成品輸入

成品製造公司：\_\_\_\_\_

成分說明：

	成分名稱	含量(%)
--	------	-------

有效成分	_____	_____
------	-------	-------

	_____	_____
--	-------	-------

\*  
不純物 \_\_\_\_\_  
(副產品等) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

其他成分 油懸劑必須填寫所含油種 \_\_\_\_\_  
(含溶劑、安定劑、  
紫外線保護劑等) \_\_\_\_\_

\*請就不純物(Unintentional ingredients) 之形成加以討論。

(二)產品鑑定

標準生化及形態測試： \_\_\_\_\_

鞭毛抗原血清分析： \_\_\_\_\_

品系歷史： \_\_\_\_\_

標準，革蘭氏陽性，抗生素感受性模式： \_\_\_\_\_

生產殺蟲毒素之種類： \_\_\_\_\_

原生質體之剖面： \_\_\_\_\_

昆蟲寄主範圍之生物檢定： \_\_\_\_\_

小白鼠腹膜內毒性/病原性之篩檢： \_\_\_\_\_

(三)防治對象害蟲

學名： \_\_\_\_\_

(四)樣品分析說明

SDS-PAGE \_\_\_\_\_

或 ELISA \_\_\_\_\_

或 HPLC \_\_\_\_\_

(五)理化性

1.原體

顏色：\_\_\_\_\_ 物理狀態：\_\_\_\_\_

氣味：\_\_\_\_\_ 密度或比重：\_\_\_\_\_

酸鹼度：\_\_\_\_\_ 安定性\*：\_\_\_\_\_

儲藏安定性：\_\_\_\_\_

\*指蘇力菌製劑對陽光、水、(酸鹼度 5、7 和 9 時)，空氣、常溫和高溫，金屬和其離子的安定性。

2.成品

顏色：\_\_\_\_\_ 物理狀態：\_\_\_\_\_

氣味：\_\_\_\_\_ 密度或比重：\_\_\_\_\_

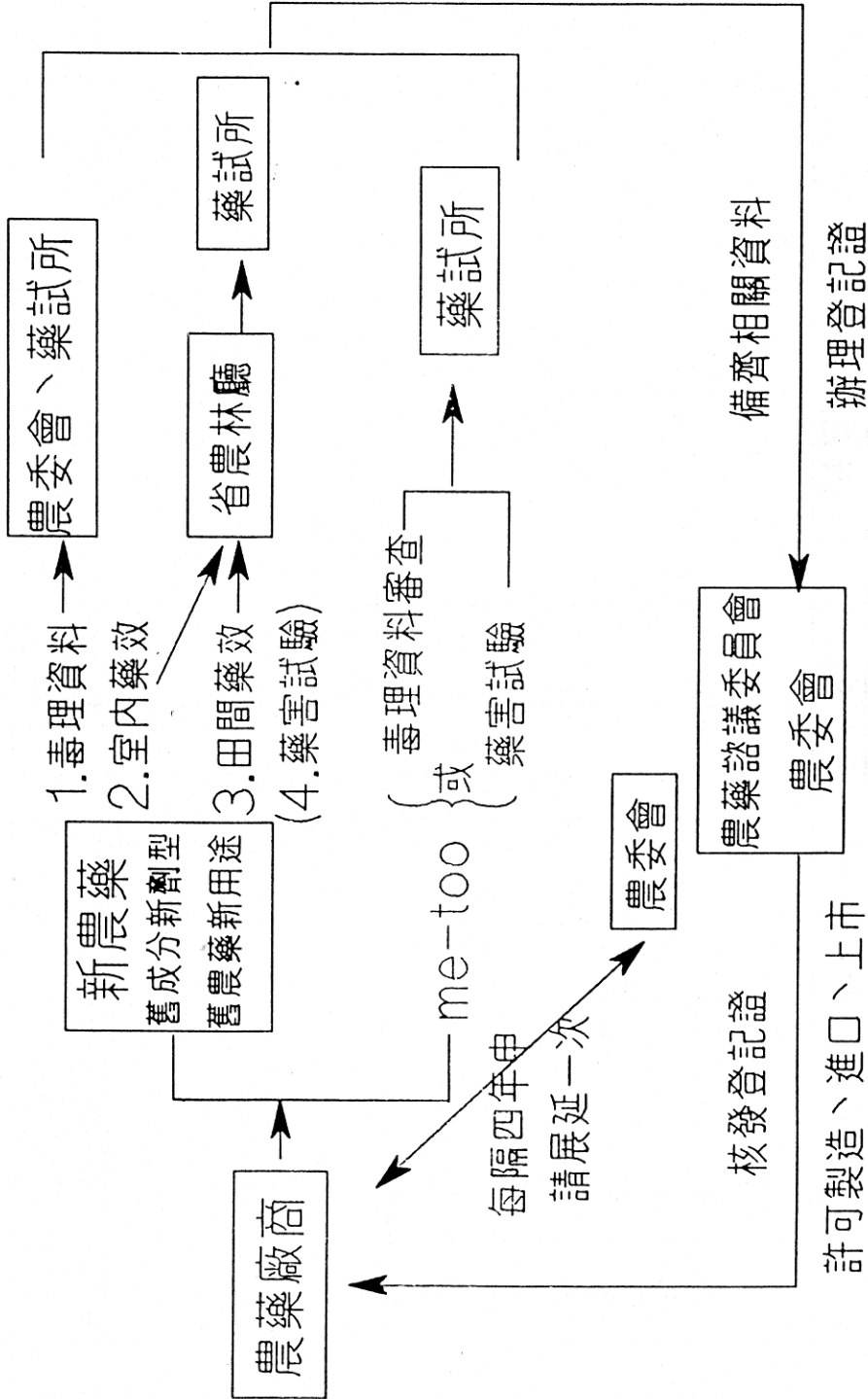
酸鹼度：\_\_\_\_\_ 儲藏安定性：\_\_\_\_\_

黏度：\_\_\_\_\_ (液態時需要)

可混合性：\_\_\_\_\_ (乳化液態時需要)

腐蝕性：\_\_\_\_\_

(當以金屬、塑膠或紙質的容器包裝時需要)



圖一、農藥登記證申請流程

表一、微生物製劑之毒理資料要件：

資料項目	新有效成份		供試樣品		備註
	食用作物	非食用作物	原體	成品	
一、急毒性試驗					
□服急毒性/致病性	○	○	✓		1
肺急毒性/致病性	○	○	✓		2
靜脈注射急毒性/致病性	△	△	✓		3
皮膚急毒性	△	△	✓	✓	4
眼刺激性/感染性	○	○	✓	✓	5
過敏性反應報告	△	△	✓	✓	6
細胞培養試驗	△	△	✓	✓	7
二、環境安全試驗					
水生生物急毒性測試	○	○	✓		8
鳥類急毒性/致病性	○	○	✓		
非目標植物致病性	△	△	✓		
非目標昆蟲毒性/致病性	△	△	✓		
對蜜蜂急毒性/致病性	△	△	✓		

○：必備要件

△：視情況而定

✓：需要資料