

綠木黴菌 (*Trichoderma virens*) R42 農藥有效成分檢驗方法草案

一、適用範圍：本方法適用於綠木黴菌 (*Trichoderma virens*) R42 有效成分單位重量的活孢子數檢驗 (菌落形成單位 CFU, Colony Forming Unit)。

二、劑型：其他粉劑 (AP)。

三、作用：殺菌劑。

四、分析方法：

1. 器具及材料：

1.1 恆溫箱。

1.2 精密電子天平，至少需顯示至小數點以下 2 位。

1.3 電動移液器、25 mL 移液管。

1.4 微量吸管 (microdispenser) 1 mL、0.1 mL、微量吸管尖 (pipette tips) 1 mL、0.1 mL。

1.5 無菌操作台。

1.6 無菌離心管 (50 mL)。

1.7 試管振盪器 (vortex mixer)。

1.8 無菌 9 公分塑膠培養皿。

1.9 高溫高壓滅菌釜 (autoclave)。

1.10 馬鈴薯煎汁培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA)、鏈黴素、己二烯酸鉀、孟加拉玫瑰素 (Rose Bengal)。

2. 微生物培養基製備：

2.1 馬鈴薯煎汁培養基：

2.1.1 依市售 PDA 配方指示秤取其培養基粉末配製，再補足定量的去離子水。

2.1.2 以 121°C 高溫高壓滅菌釜進行滅菌，降溫後分裝至塑膠培養皿中。

2.2 木黴菌選擇性培養基：

2.2.1 配置 1,000 mL 之培養液，先取適量之去離子水加入己二烯酸鉀 1,000 mg、孟加拉玫瑰素 150 mg、PDA 0.6 g，混合均勻，再補足去離子水至 1000 mL。

2.2.2 以 121°C 高溫高壓滅菌釜進行滅菌，待降溫至 40-50°C 後，添加鏈黴素 250 mg，分裝至培養皿中。

3. 樣品前處理與稀釋步驟：

3.1 待測樣品均勻混合後，以電子天平秤取 3.0 g 樣品，放入 50 mL 無菌離心管中，加入無菌水，使最終體積為 30 mL，配製成稀釋懸浮母液 (3 重複)，置於試管振盪器，每管充分振盪 (vortex) 呈漩渦狀約需 30 至 60 秒。

3.2 將上述 3 重複各管 30 mL 之懸浮液，以試管振盪器充分振盪後，分別取 3 mL 進行 10 倍序列稀釋，至預期之倍數。

4. 培養步驟：

4.1 在無菌操作台內，預先將已滅菌馬鈴薯煎汁培養基或木黴菌選擇性培養基倒入培養皿內。待凝固後，置放於無菌操作台內，至培養基表面乾燥備用。

4.2 適當稀釋倍數之樣品 (例如標稱之孢子數為 10^9 CFU/g 或 CFU/mL，則取 10^5 至 10^7 的 3 種稀釋倍數菌液，依此類推)，以微量吸管各取 0.1 mL 滴於 3 片馬鈴薯煎汁培養基或木黴菌選擇性培養基上，並以滅菌之塗抹棒均勻塗佈至無餘液流動。不同稀釋倍數，每次取液及塗佈均需更換微量吸管尖及塗抹棒。

4.3 將培養基表面乾燥之培養皿，倒置於 35°C 恆溫箱，培養 6 日 (可依試驗需求調整)。

※*Trichoderma virens* R42 於 15-35°C 培養將不影響菌數的判別，但會影響培養時間。

5. 鑑別試驗：

目視觀察菌落型態須符合該檢驗菌株於學理之外觀描述：產孢後轉為暗藍綠色，背面無色或緩慢產生暗黃色到琥珀色陰影；於「新產品首次檢驗」、「觀察到非典型菌落形態」或「檢驗結果超出預期範圍」時，應執行基因鑑定作為確認步驟。可採 ITS（Internal Transcribed Spacers）基因序列進行美國國家生物技術資訊中心 NCBI（National Center for Biotechnology Information）菌種資料庫比對。

※基因序列分析的操作步驟為：挑選培養基上單一菌落接種至 LB 培養液震盪培養隔夜，提取菌液並抽取 DNA（濃度 20 ng/μL 為佳），接著進行聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction）（反應起始之模板 DNA 濃度為 2.5 ng/μL），產物以電泳凝膠分析確認目標片段（約 500-700 base pair），將該基因片段定序並以 NCBI 菌種資料庫比對一致性（Percent identity 95%以上）。

6. 結果計算：

6.1 觀察培養皿菌落數時，選取 25 至 250 菌落數（CFU）的稀釋倍數，進行紀錄。

6.2 單位重量活孢子數（CFU/g），計算公式如下：

$$\text{單位重量活孢子數 (CFU/g)} = (\text{平均菌落數} / 0.1 \text{ mL}) \times \text{菌液稀釋倍數} \times (30 \text{ mL} / 3 \text{ g})$$

五、參考文獻：

1. Askew, D. J., and Laing, M. D. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology* 42, 686-690.
2. Collins, C. H., Patricia M. Lyne, J. M. Grange, J. O. Falkinham III. 2004. *Microbiological Methods*, 8th ed. Arnold & Co., London.
3. Dhingra, Onkar D., and James B. Sinclair. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

六、品質管制：

1. 活孢子數檢驗需恆定培養箱溫度±0.5℃，另可參考民國 96 年行政院衛生署藥物食品檢驗局無菌操作作業指導手冊，避免汙染。
2. 試驗中所使用之器材，以高溫高壓滅菌釜進行滅菌（121℃、1.5 atm）。
3. 訂定精密電子天平以及微量吸管的校正週期以及儀器允收標準，以確保準確度。
4. 每個試驗樣品應取樣 3 次，每一取樣檢液稀釋 5 個以上濃度，每一濃度取 0.1 mL 塗佈於平板上，至少 3 皿。其分析結果取 Log 值後變異係數（coefficient of variation, CV）需小於 2%，以達到檢驗正確性。
5. 所有品質管制數據，均需保存以便參考及檢查。