

本土綠殭菌對大鼠急毒性與致病性 之安全評估

張敬宜 黃振聲 蔡三福*

行政院農委會農業藥物毒物試驗所 應用毒理組

(接受日期：2006 年 12 月 31 日)

摘 要

張敬宜、黃振聲、蔡三福* 2006 本土綠殭菌對大鼠急毒性與致病性之安全評估
植保會刊 48 : 331 – 340

以強迫投予方式檢測綠殭菌(*Nomuraea rileyi*)孢子對大鼠口服及肺急毒性與致病性安全評估，分別以胃管及氣管針投予 1×10^8 cfu 孢子，觀察 21 天內孢子分佈及清除之情形，評估其在大鼠體內之存活及對肺臟之影響。試驗結果顯示在口服急毒性與致病性方面，大鼠無任何明顯之臨床症狀或死亡現象；試驗組大鼠之體重增加與對照組無明顯之差異；所有供試鼠隻進行大體解剖及肉眼觀察無明顯病變；處理後第 1 天進行消化道、糞材、各臟器及血液微生物之培養，未發現綠殭菌菌落。進一步探討孢子的消化穩定性，以觀察孢子被人工胃腸液降解情形，發現在 37°C 胃液反應 2 小時後， 1×10^8 cfu 活孢子均被完全降解而不具活性，因此，顯示綠殭菌孢子對大鼠不具口服急毒性、感染性及致病性。在肺急毒性與致病性方面，以氣管針灌注投予後，處理組大鼠均產生明顯的呼吸音(水泡音)及體重增重減少之臨床症狀，但無致死性；微生物培養只在投予後第 1 天的肺臟組織中發現綠殭菌菌落。肉眼觀察可見處理組肺臟潮紅腫脹，切片可見多發性肉芽腫病變，唯此病灶屬於正常的異物性肺炎反應。又以 Periodic Acid-Schiff's (PAS) 特殊染色法檢測綠殭菌孢子在肺臟組織的發育情形，發現處理組的肺臟組織中含多量被染成紫紅色的綠殭菌孢子，且孢子的形態完整，可見孢子未在大鼠的肺臟組織中發育，因此，綠殭菌孢子對大鼠不具肺急毒性、感染性及致病性。本試驗顯示綠殭菌孢子對大鼠無明顯的口服及肺急毒性與致病性，且孢子易在消化道被降解而無法存活。此試驗研究資料，可提供對本綠殭菌菌株開發產品安全性毒理資料之參考。

(關鍵詞：綠殭菌、口服毒性、肺毒性、大鼠)

* 通訊作者。E-mail: sftsai@tactri.gov.tw

緒 言

目前國內有關農用微生物農藥的種類有真菌、細菌、病毒、酵母菌及原蟲等，主要用以代替部分化學農藥控制田間病蟲害，其中綠殭菌(*Nomuraea rileyi*)是一種具有廣泛宿主的蟲生真菌^(9, 13)，尤其是對夜蛾類幼蟲，如粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*)、黎豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatalis*)、大豆夜蛾 (*Pseudoplusia includens*)、番茄夜蛾 (*Hirchoplusia armigera*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)、黃條粘蟲 (*Spodoptera ornithogalli*) 等的防治，具有潛在利用價值，加上該菌易於以發酵方式大量生產之特性，應可積極將之開發成爲生物農藥，供農民使用。綠殭菌的特徵爲在宿主體表佈滿白色菌絲，待長出分生孢子柄及分生孢子，顏色由白色轉爲綠色，分生孢子呈橢圓形，其菌絲生長與產孢適溫均在 24°C⁽¹⁾。

國內外有關綠殭菌的安全評估報告，僅 1979 年 Ignoffo 等人⁽¹³⁾發表的綠殭菌對哺乳動物風險之評估，包括大小鼠之口服、呼吸急毒性及白兔之皮膚急毒性、眼刺激評估，結果皆無異常，顯示綠殭菌對哺乳動物無立即的急性危害。而目前國內並無綠殭菌自行研發產品之毒理安全評估資料，尤其是對人體及動物安全性評估資料。加上同一種菌株但品系不同，其對昆蟲及溫血動物之毒性亦可能不相同⁽²⁾，而在產品商品化過程，發酵之產物及製劑配方添加物的不同，對人體安全性亦可能產生相當大之變化。因此，本研究乃依據美國環保署農藥安全測試準則中微生物農藥毒理準則^(19, 20)，針對國內自行開發之本土性微生物農藥產品登記上市所需之動物毒理資料要件，進行二種必備的實驗動物安全性試驗，探討綠殭菌孢子經口服及氣管途徑給予大鼠後，孢子對動物之毒性與致病性，觀察孢子在大鼠體內分佈及存活之

情形，並經由分析各組織臟器的回收培養情形、組織病理病變及孢子在人工消化液中中之穩定性等，作爲評估本土性綠殭菌原體對動物之安全性，以提供本試驗菌株之安全性及政府對此微生物製劑安全管理之參考。

材料與方法

試驗動物

六週齡之 Sprague-Dawley 品系雌、雄大鼠，體重在 150-185 g 左右，購自台北南港財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心，並飼養於無特定病原 (specific pathogen-free, SPF) 動物房中觀察至少一週，取體重相近且經檢疫合格之健康成鼠進行試驗。試驗動物除了在處理前 3 小時及處理後 4 小時禁食外，平時給予充足之飼料 (Lab Diet® 5001 Rodent diet, PMI® Nutrition International, LLC, MD, USA) 及飲水。動物飼育房控制溫度範圍爲 20-25°C、相對濕度範圍爲 40-70% 及 12 小時光/12 小時暗之光照週期⁽²²⁾。

孢子純化及品質監測

將綠殭菌 (*Nomuraea rileyi*; F055 品系，爲一野外株，分離自嘉義溪口被感染之斜紋夜盜蟲體，由本所生物藥劑組提供) 接種於 SMAY (1% neopeptone、2% yeast extract、4% maltose 及 1.5% agar) 培養基 (Difco, MD, USA) 中，於 24°C 培養箱培養 8-14 天後⁽⁸⁾，每個培養管加入適量的 20 µl/l Tween 80 (Sigma, MO, USA)，混合振盪 5 分鐘，經 2 層紗布過濾後，取得純化之孢子懸浮液，同時以顯微鏡鏡檢孢子純化之情形。再將孢子懸浮液連續 10 倍稀釋，各取 0.1 ml 進行培養，分裝於三個培養皿內，以 SMAY 培養基於 24°C 培養 8 天後，計算其菌落數 (colony forming unit, cfu)，測得孢子數爲 3.16×10^9 cfu/ml。以

phosphate buffered saline (PBS) 緩衝液稀釋調整接種的孢子數，使處理組每隻大鼠授予約 1×10^8 cfu 的活孢子。另孢子懸浮液亦進行其他雜菌培養，以證明未受到病原性微生物之污染。

實驗設計

試驗動物分組及劑量選擇，依據美國環境保護署頒佈之微生物製劑對溫血性動物急毒性、致病性及感染性毒性評估測試指引進行^(19, 20)。在口服急毒性方面以塑膠注射針筒(Terumo, Tokyo, Japan)，套上長 90 mm 不銹鋼胃管(Fine Science Tools, USA)，將 1×10^8 cfu 綠殭菌孢子強迫餵食大鼠，每隻灌注之液體量為 10 ml/kg body weight。肺急毒性方面以哈樂仙(Halothane, Sigma, MO, USA)進行全身性呼吸麻醉，將大鼠門齒掛於壓克力網架上，取 1 ml 塑膠注射針筒套上長 110 mm 不鏽鋼接種針(Hamilton 91072, USA)，透過耳鏡(Hene, Germany)經喉頭進入氣管，灌注 1×10^8 cfu 綠殭菌孢子，每隻灌注之液體量為 1 ml/kg body weight。於處理後第 1、3、7、14 天解剖雌、雄各 2 隻，第 21 天雌、雄各 3 隻。對照組則僅給予 PBS 緩衝液或滅菌液，處理後第 21 天解剖雌、雄各 3 隻。

試驗檢查及分析項目

觀察項目包括臨床症狀、體重變化及病理變化。臨床症狀之觀察，包括症狀發生、復原及死亡時間，在處理後 1/2、1、2、4 小時記錄；自處理後第 2 天起，每日觀察 1 次，至處理後第 21 天為止。於動物大體解剖時，採腦、肺、心、肝、腎、脾、腸繫膜淋巴器官及 0.1 ml 血液，進行塗抹培養及病理學檢查，以了解孢子在動物體內分佈之情形。同時也採集肺臟、消化道及糞材加入 9 倍量之 PBS 溶液後，以均質機打碎成 10% 懸浮液，再經連續 10 倍稀釋後，各取 0.1 ml 塗抹於三個培養皿內，進

行微生物之回收培養(recovery culture)。而綠殭菌之鑑定乃依接種用孢子懸浮液，進行培養基上生長之菌落形態、顏色及相位差(phase contrast)顯微鏡鏡檢，並依據分生孢子柄及分生孢子之形狀及排列方式等特徵加以確認(圖一 B)。

組織病理

肺臟組織置於 10%(v/v)中性福馬林溶液中固定 48 小時以上，經石蠟包埋等過程製成切片(2 μ m)，再經蘇木紫及伊紅(H & E)染色後，於一般光學顯微鏡下觀察組織病理變化。另外亦以 Periodic Acid-Schiff's (PAS)染色，評估綠殭菌孢子在肺臟組織之情形。

消化穩定性

人工胃液(simulated gastric fluid, SGF)及人工腸液(simulated intestinal fluid, SIF)的配製，乃依據 Anonymous 及 Astwood 等人的方法^(6, 7)，試驗主要將 100 μ l 綠殭菌活孢子(1.6×10^8 cfu)分別與 900 μ l SGF、SIF 或 PBS 混合，再於 25 或 37°C 下反應 2、4 或 24 小時，最後將反應不同時間的孢子液連續 10 倍稀釋，每一稀釋倍數各取 0.1 ml 進行塗抹培養，在 24°C 培養箱培養 8 天後觀察是否有菌落形成。

統計分析

各試驗組所得數值以 Microsoft Excel 之 AVERAGE 法求取平均值及 STDEV 法求取標準偏差值，以 Student's *t*-test 分析法比較各處理組與對照組值之組間差異顯著性。

結果與討論

由於綠殭菌對防治標的昆蟲之毒性，主要是昆蟲體表受到綠殭菌孢子附著，孢子體在體表發育及生長，當菌絲穿過蟲體造

成蟲體致病死亡。本實驗即模擬在自然情況下，綠殭菌最易經口及呼吸系統進入人體的毒性作用，評估其對實驗動物之影響，因此進行綠殭菌對大鼠之口服及肺急毒性安全評估。

首先在口服急毒性/致病性方面，以胃管投予大鼠 1×10^8 cfu 綠殭菌孢子，分別於第 1、3、7、14 及 21 天時檢測大鼠體內孢子之分佈及消退情形，結果顯示整個實驗過程中並未發現大鼠任何明顯之臨床症狀或死亡現象，且各試驗組大鼠之體重增重與對照組無顯著性差異(資料未列出)，各臟器於大體解剖及肉眼觀察亦未發現明顯的病變。另外，處理後第 1 天各消化道、糞材、臟器及血液微生物之培養，均未檢測出綠殭菌菌落(表一)，可見孢子經由口服不易在大鼠體內存活，在 1 天後即完全失去活性。此與蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)孢子可在大鼠腸胃道內容物及糞材中存活 2 天以上有很大不同，甚至在其他臟器，特別是脾臟中亦可發現蘇力菌孢子的存在^(3, 4)，可見綠殭菌之安全性較蘇力菌為高。

進一步以 *in vitro* 的消化穩定性方法

加以驗證，探討孢子是否易被人工胃腸液消化降解，實驗以不同溫度的人工胃腸液與 10^8 cfu 活孢子反應不同時間後，培養觀察菌落是否生長，進而推估孢子是否存活。結果發現孢子在 25°C 人工胃腸液消化反應 2、4、24 小時下，孢子均尚具有活性，約殘存 $10^4 \sim 10^6$ cfu/ml，但在 37°C 人工胃液下消化反應 2 小時後，孢子則完全被降解，失去活性(表二)。與蘇力菌⁽³⁾比較，可推測綠殭菌孢子較不易抵抗大鼠消化系統的作用，且在正常動物體溫約 37°C 下，極可能喪失存活能力，這與體內試驗可見孢子經口進入體內，幾乎在 1 天內完全降解，因而大大降低綠殭菌孢子致病性之風險。

經由本試驗結果更證明綠殭菌孢子對大鼠不具口服急毒性、感染性及致病性，與 Ignoffo 等人試驗之結果雷同⁽¹³⁾，該試驗以胃管給予小鼠 2.48×10^9 cfu 孢子並連續觀察 14 天，同時每天收集糞材進行微生物培養，結果發現綠殭菌孢子在 1 天內由腸胃道排除達 99% 以上。由此可見綠殭菌孢子較其它微生物製劑孢子^(3, 12)對溫血動物

表一、大鼠口服綠殭菌孢子後組織器官之孢子培養生長情形

Table 1. Fungal culture of organ tissue after oral administration with *Nomuraea rileyi* spores in rats

Organ	No. of animals with tissue colonized by <i>N. rileyi</i> on different sacrificed days ¹⁾				
	1	3	7	14	21
Brain	0	0	0	0	0
Lung	0	0	0	0	0
Heart	0	0	0	0	0
Spleen	0	0	0	0	0
Liver	0	0	0	0	0
Kidney	0	0	0	0	0
MLN ²⁾	0	0	0	0	0
Blood ³⁾	0	0	0	0	0

¹⁾ The number of rats sacrificed was 6 at the 21st day and 4 for the others.

²⁾ Mesenteric lymph node.

³⁾ Sampled directly from aorta artery.

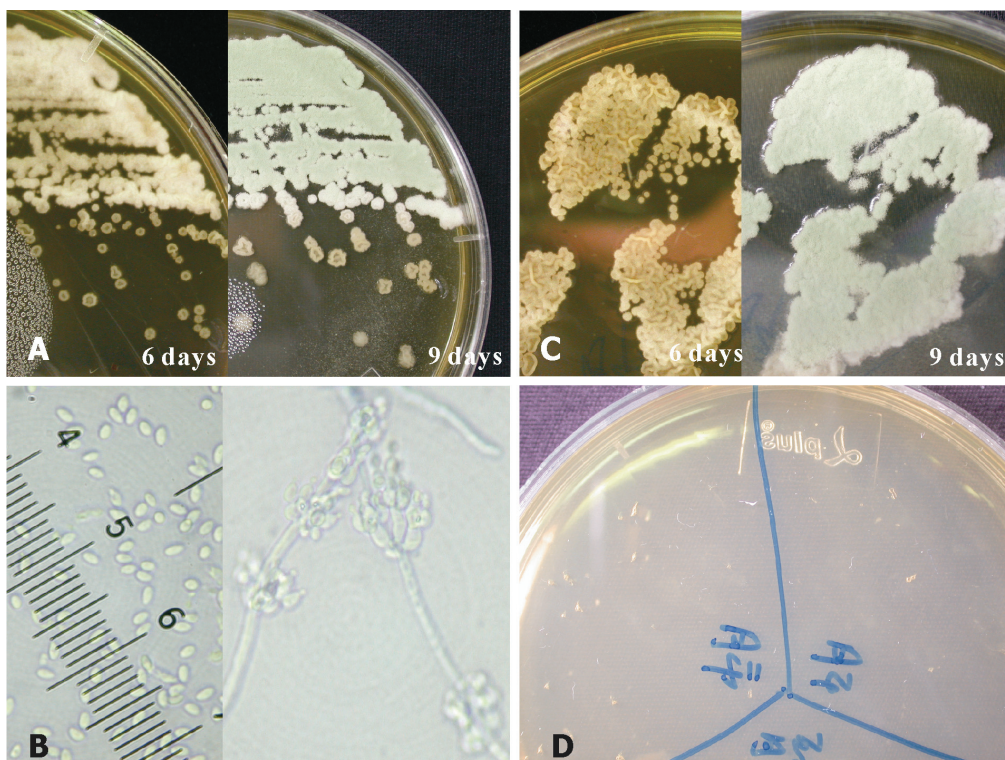
表二、綠殭菌孢子在消化穩定性試驗中之存活情形

Table 2. Viability of *Nomuraea rileyi* spores in digestive stability test

Item ¹⁾	Viable spores at different hours		
	2	4	24
PBS 25°C	+++ ²⁾	+++	++
PBS 37°C	++	++	++
SGF 25°C	+	+	+
SGF 37°C	-	-	-
SIF 25°C	++	++	++
SIF 37°C	++	++	+

¹⁾ PBS: Phosphate buffered saline; SGF: simulated gastric fluid; SIF: simulated intestinal fluid.

²⁾ +++: > 10⁶ cfu/ml colonies detected; ++: 10⁴~10⁶ cfu/ml colonies detected; +: < 10⁴ cfu/ml colonies detected; -: No colonies detected.



圖一、肺臟組織中綠殭菌孢子在 SMAY 培養基塗抹培養生長之情形。(A) 培養 6 或 9 天後的綠殭菌孢子；(B)綠殭菌孢子及分生孢子之形態 (每小格為 0.1 mm)；(C)氣管灌注後第 1 天肺臟組織塗抹培養 6 或 9 天；(D) 氣管灌注後第 3 天之肺臟組織塗抹培養 9 天。

Fig. 1. Mycological smear culture of lung tissue on SMAY medium. (A) The spores of *Nomuraea rileyi* cultured after 6 or 9 days. (B) Morphological examination of the spores or conidiophores of *N. rileyi*. (A unit =0.1 mm) (C) Lung tissue (Day 1 after treatment) smears cultured after 6 or 9 days. (D) Lung tissue (Day 3 after treatment) smears cultured after 9 days.

較具口服安全性，當人體暴露於綠殭菌孢子的環境中，經由口腔進入人體的消化道系統後，其對人體較不具潛在的風險。另外針對防治根瘤線蟲之真菌類微生物製劑 *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* 孢子對大鼠進行口服急毒性與致病性評估中⁽¹¹⁾，發現大鼠投予 5×10^8 cfu 活孢子，除了在第 3、7 天時分析血液中的紅血球及淋巴球有輕微下降及上升的現象外，並未造成大鼠任何明顯之臨床症狀或病理變化，對大鼠口服途徑給予亦相當安全。

至於肺急毒性/致病性之研究，以氣管灌注法直接將綠殭菌孢子灌注於肺臟中探討其安全性，此技術具有劑量投予精確、操作快速及不需昂貴儀器設備之優點，對於開發新的本土性微生物或生化農藥是為不可或缺之安全性評估方法⁽⁴⁾。因此，在肺急毒性方面，以氣管針灌注投予大鼠 1×10^8 cfu 孢子，分別於第 1、3、7、14 及 21 天時進行肺臟之微生物回收培養，並評估孢子在大鼠體內之存活消退情形。結果處理組大鼠均產生明顯的呼吸音(水泡音)及體重增重減少之臨床症狀，但無致死性(資料未列出)。進行微生物之回收培養檢測

時，只在投予後第 1 天的肺臟組織中發現綠殭菌菌落約 10^5 - 10^7 cfu/g(圖一 A、B、C)，其餘時間的肺臟組織及其他臟器中皆未發現綠殭菌存活(表三、圖一 D)。文獻中蘇力菌以不同投予途徑試驗中，如以腹腔方式投予鼯鼠⁽¹⁷⁾及長期於飼料中添加蘇力菌餵食綿羊之試驗中⁽¹²⁾，發現在其他組織器官中亦含大量蘇力菌孢子；而本試驗中以同等數量的綠殭菌孢子進入肺臟組織後，綠殭菌孢子並未分佈至其它臟器，且實驗結果顯示綠殭菌孢子喪失存活能力，無論在數量或時間上均比蘇力菌或同為真菌類的黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)孢子多且快^(2, 18)。此是否與綠殭菌孢子較易受動物體的影響，或與不同的孢子種類構造有關，或如同人工胃液下消化反應試驗一樣，受溫度影響較大有關，有待進一步探討。另外肉眼病變觀察可見處理組大鼠的肺臟潮紅腫脹，同時在肺臟組織切片觀察下，可見處理組大鼠的肺臟有許多炎症細胞的浸潤，且隨著時間增長愈為明顯(圖二 A、B、C)，至第 7 或 21 天時可見肺泡壁細胞有少許的增生(圖二 D)，於高倍率顯微觀察下，病變區出現的細胞主要為淋巴

表三、大鼠氣管灌注綠殭菌孢子後組織器官之孢子培養生長情形

Table 3. Fungal culture of organ tissue after intratracheal administration with *Nomuraea rileyi* spores in rats

Organ	No. of animals with tissue colonized by <i>N. rileyi</i> on different sacrificed days ¹⁾				
	1	3	7	14	21
Brain	0	0	0	0	0
Lung	4	0	0	0	0
Heart	0	0	0	0	0
Spleen	0	0	0	0	0
Liver	0	0	0	0	0
Kidney	0	0	0	0	0
MLN ²⁾	0	0	0	0	0
Blood ³⁾	0	0	0	0	0

¹⁾ The number of rats sacrificed was 6 at the 21st day and 4 for the others.

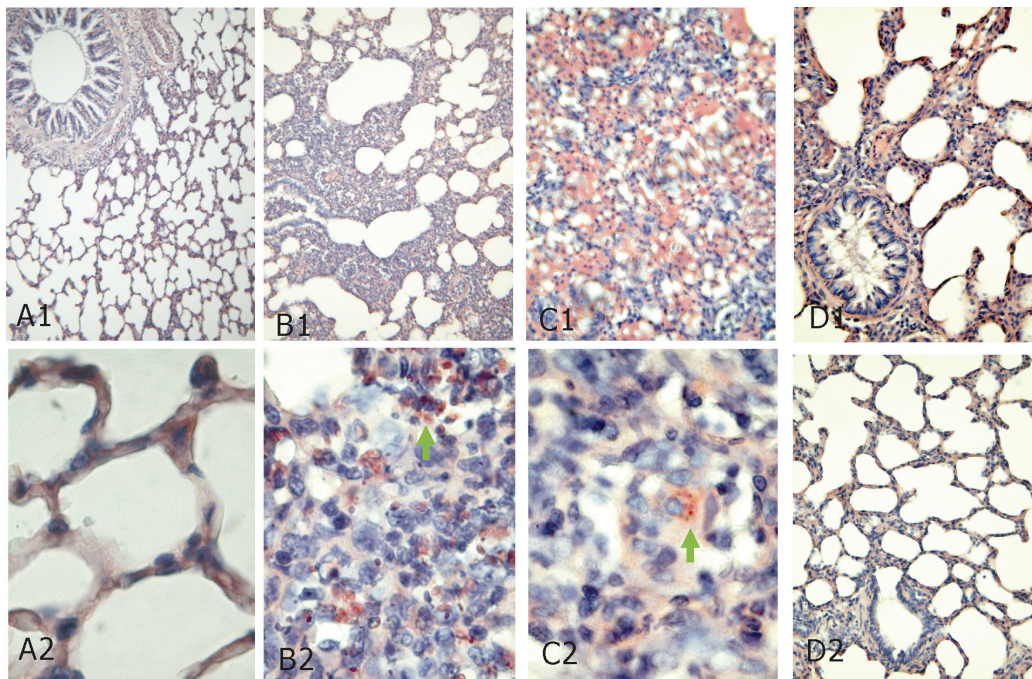
²⁾ Mesenteric lymph node.

³⁾ Sampled directly from aorta artery.

球、伴發少量的漿細胞、嗜中性球及多核巨噬細胞，形成一多發性肉芽腫病變，唯此病灶屬於正常的異物性肺炎反應病變。

為進一步證實綠殭菌孢子是否存在於肺臟組織，乃以 PAS 特殊染色法進行孢子壁多醣之染色，結果證實大鼠氣管灌注綠殭菌孢子後第 1 天的肺臟組織中，含多量被染成紫紅色的綠殭菌孢子，而且孢子的形態完整(圖 2B)，但可能因炎症細胞的浸潤或吞噬降解孢子活性，導致第 3 天已無法觀察到完整的孢子，只見少許孢子的殘留顆粒(圖 2C)，顯示孢子未在大鼠的肺

臟組織中發育。因此，綜合以上結果得知綠殭菌孢子對大鼠不具肺急毒性、感染性及致病性，僅對大鼠肺臟造成異物性的肺炎病變，然而此肺炎病變屬異物引起之正常反應。另外由同屬真菌類的黑殭菌之肺急毒性安全評估中⁽²⁾，亦可發現孢子存在於肺臟，同時亦不具發育存活能力。而 Ignoffo 等人⁽¹³⁾利用頭鼻暴露的呼吸急毒性方法進行綠殭菌對大鼠之安全評估，結果亦發現大鼠無明顯臨床症狀及組織病理之異常，雖然呼吸暴露方法與本試驗氣管灌注給予之方式不同，但本試驗較能精準反



圖二、大鼠氣管灌注綠殭菌孢子後的肺臟組織病理變化。(A)正常肺臟組織(100 或 1,000X)；(B)投予後第 1 天肺臟組織可見染成紅色的孢子(100 或 1,000X)；(C)投予後第 3 天肺臟肺泡腔可見大量滲出液浸潤及孢子的殘留顆粒(100 或 1,000X)；(D)投予後第 7 或 21 天可見肺泡壁有少許增生(100 X)。

Fig. 2. Histopathological changes of lung from rat intratracheally administered with spores or conidiophores of *Nomuraea rileyi*. (A) Normal lung tissue (100 or 1000X). (B) Day 1, red colour of *N. rileyi* spores in rat lung (100 or 1000X). (C) Day 3, showed a severe exudates and red granule residue of *N. rileyi* spores in the alveolar space of rat lung (100 or 1000X). (D) Day 7 or 21, showed a recovery and slightly hyperplasia in the alveolar septal walls (100 X).

應出投予最高測試孢子劑量，以符合微生物活體的特性。

由本試驗綠殭菌孢子進入肺部會因不易降解或排除，而造成輕微異物性肺炎病變，推測經常大量接觸本孢子之使用者或工廠操作員，於施用或發酵回收純化時，若不慎吸入大量的粉末孢子，因孢子不同於化學物質且較不易分解與排除，可能對人體的肺臟組織造成類似的多發性肉芽腫病變。又以純化的白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 粗抗原及黑殭菌粗抗原，經呼吸及腹腔注射途徑對大鼠及小鼠進行過敏反應評估^(5, 21)，結果顯示無論是白殭菌或黑殭菌粗抗原均會導致大、小鼠的潛在的過敏反應，因此推估部分微生物製劑孢子本身對人類健康仍具有低潛在的風險性，在運用微生物製劑時，操作者仍應戴防護口罩及手套等，以確保安全。經由本試驗結果顯示，本土性綠殭菌 F055 菌株在口服及氣管灌注下，處理組與對照組間並無顯著毒性或致病性差異，因此本土性綠殭菌孢子在口服及氣管呼吸暴露情況下，對動物的無毒害作用劑量 (no-observed-adverse-effect-level, NOAEL) 為 1×10^8 cfu 活孢子，為一非常低潛在性的口服及肺急毒性物質，實驗資料結果可支持開發成爲一安全性微生物農藥。

謝 辭

本研究承蒙農委會農業藥物毒物試驗所科技計畫 93 農科-4.1.5-藥-P1(5) 及 95 農科-13.2.3-藥-P1(5) 之經費補助，本所生物藥劑組蔡勇勝博士、本組張淑滿小姐、湯秀枝小姐及洪慶和先生等協助實驗之進行，謹此誌謝。

引用文獻

1. 高穗生、蔡勇勝、楊凡仙、王伯徹、華

傑 編。1998。台灣常見蟲生病原真菌實用圖誌。食品工業發展研究所。新竹。80 頁。

2. 蔡三福、廖俊旺、洪文凱、王順成。1994。黑殭菌對白鼠肺急毒性、感染性及致病性之探討。植保會刊 36: 65-73。
3. 蔡三福、廖俊旺、王順成。1995。鼠口服蘇力菌之清除及分佈探討。植保會刊 37: 265-270。
4. 蔡三福、廖俊旺、王順成。1998。蘇力菌素對大鼠口服及肺毒性之評估。中華獸醫誌 24: 203-211。
5. 蔡三福、張敬宜、廖俊旺、黃振聲、何素鵬、王順成。2003。白殭菌粗抗原對大鼠之過敏性反應。植保會刊 45: 285-294。
6. Anonymous. 1995. Simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, pp. 2053. In: The United States Pharmacopeia 23, The National Formulary 18. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
7. Astwood, J. D., Leach, J. N., and Fuchs, R. L. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nat. Biotechnol. 14: 1269-1273.
8. Atlas, R. M. 1993. Handbook of microbiological media. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
9. Chan, P. K., and Hayes, A. W. 1994. Acute toxicity and eye irritancy, pp. 579-648. In: A. W. Hayes [ed.], Principles and Methods of Toxicology. 3rd ed. Raven Press, New York.
10. Devi, P. S. Vimala. 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. J. Invertebr. Pathol. 63: 145-150.

11. Garcia, L., Bulnes, C., Melchor, G., Vega, E., Ileana, M., de Oca, N. M., Hidalgo, L., and Marrero, E. 2004. Safety of *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata* in acute oral and dermal toxicity/pathogenicity evaluations in rats and rabbits. *Vet. Hum. Toxicol.* 46: 248-250.
12. Hadley, W. M., Burchiel, S. W., DeMowell, T. D., Thilsted, J. P., Hibbs, C. M., Whorton, J. A., Days, P. W., Friedman, M. B., and Stoll, R. E. 1987. Five-month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. *Fundam. Appl. Toxicol.* 8: 236-242.
13. Ignoffo, C. M., Garcia, C., Kapp, R. W., and Coate, W. B. 1979. An evaluation of the risks to mammals of the use of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, a biological insecticide. *Environ. Entomol.* 6: 354-359.
14. Ignoffo, C. M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, pp. 513-538. *In*: H. D. Burges [ed.], *Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980*, Academic Press, London.
15. McClintock, J. T., Schaffer, C. R., and Sjoblad, R. D. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* -based pesticides. *Pestic. Sci.* 45: 95-105.
16. Siegel, J. P., Shaddock, J. A., and Szabo, J. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *J. Entomol.* 80: 717-723.
17. Siegel, J. P., and Shaddock, J. A. 1990. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis* from mammals. *J. Econ. Entomol.* 83: 347-355.
18. Tsai, S. F., Liu, B. L., Liao, J. W., Hwang, J. S., Wang, S. C., Wang, J. S., Tzeng, Y. M., and Ho, S. P. 2003. Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicol.* 186: 205-216.
19. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances Washington D.C. 1996 (February). Acute pulmonary toxicity/pathogenicity (OPPTS 885.3150). Microbial Pesticide Test Guidelines. USA.
20. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances Washington D.C. 1996 (February) . Acute oral toxicity/pathogenicity (OPPTS 885.3050). Microbial Pesticide Test Guidelines. USA.
21. Ward, M. D. W., Madison, S. L., Sailstad, D. M., Gavett, S. H., and Selgrade, M. J. K. 2000. Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. *Toxicol.* 143: 141-154.
22. Yu, J. Y. L., Cheng, C. K., Chen, B. J., Chang, W. J., Chen, H. H. C., Hong, C. C., Lee, P. J., Liang, S. C., Sheu, K. S., Sung, Y. Y., Tang, S. H., Tsai, C. W., Wang, C. S., Wang, M. H., Yen, L. S., and Yu, C. K. 2001. A Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals (in Chinese). Published by the Chinese Society for the Laboratory Animal Science, pp. 1-171. Taipei, Taiwan, ROC.

ABSTRACT

Chang, J. Y., Hwang, J. S., and Tsai, S. F.* 2006. Safety evaluation of acute toxicity/pathogenicity of *Nomuraea rileyi* F055 in rats. Plant Prot. Bull. 48: 331-340. (Applied Toxicology Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC))

This study was conducted to evaluate the acute oral and pulmonary toxicity/pathogenicity of *Nomuraea rileyi* after a single oral or intratracheal administration of 1×10^8 spores in rats. The distribution and clearance of spores in rats were observed for 21 days. Animals with oral administration showed no significantly toxic signs or death, and no significant differences in body weight gain and gross or microscopic pathology compared to control rats. Fungal spores were not detected in gut content, feces, organ tissues or blood within one day after administration. When digestive stabilities of spores in a simulated gastric fluid or a simulated intestinal fluid were tested, 1×10^8 spores added were completely degraded within 2 hours in simulated gastric fluid at 37°C. These data demonstrated that *N. rileyi* showed no obvious evidence of oral toxicity or pathogenicity/infectivity in rats. In the acute pulmonary toxicity/pathogenicity study, rats with clinical signs showed respiration-roles in all treatment groups. The body weight gain decreased significantly in the treated rats compared with control groups. The spores were found in lungs on the 1st day, but not in other organs or blood during test periods. Gross findings revealed that the lungs of treated rats showed the sign of focal pneumonitis. Histopathological lesions characterized by the inflammatory changes were observed within both bronchioles and alveoli, and foamy cells were subsequently formed in the lungs. There was no sign of spore germination in tissues after administration. These data demonstrated that *N. rileyi* showed no pulmonary toxicity or pathogenicity/infectivity in rats. The above results confirm the safety of *N. rileyi* for rats, and show that spores would be degraded in the intestinal tracts.

(Key words: *Nomuraea rileyi*, oral toxicity, pulmonary toxicity, rat)

*Corresponding author. E-mail: sftsai@tactri.gov.tw