

微生物應用之管理及安全性評估

蔡三福 王順成

省農業藥物毒物試驗所 應用毒理系

摘要

本文針對目前微生物製劑於農業防治害蟲應用時，因微生物農藥之生物本質的特殊性，管理上所需之毒理資料要件與化學性農藥之差異進行說明；包括口服急毒性/致病性、肺急毒性/致病性、靜脈急毒性/致病性及鳥類急毒性/致病性等微生物農藥登記之毒理資料要件。並對微生物農藥安全性研究現況，包括微生物農藥對哺乳類動物安全性測試時之特殊測試技術及對動物感染性/致病性之安全性研究加以探討，以期對整個微生物農藥在現階段的應用及管理能相輔相成，協助政府建立微生物農藥安全評估及管理規範，並建立本土性微生物農藥之毒理研究基礎資料庫。

一、前言

國內生物防治觀念與應用近十年逐漸興起，由於微生物農藥之專一性高，對人畜及環境之危害及衝擊低，乃被大量應用於控制或減低田間作物病蟲害，其中本土性微生物農藥目前已應用或開發中的種類相當多，包括細菌類的 *Bacillus thuringiensis*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas cepacia*、*Streptomyces candidus*；真菌類的 *Metarhizium anisopliae*、*Beauveria bassiana*、*Nomureae rileyi*、*Trichoderma harzianum*；病毒類的 Nuclear polyhedrosis virus；線蟲類的 *Steinernematid*、*Heterorhabditid*。由於國內廠商申請上市之各類微生物農藥日益增加，而各種微生物之變種、亞種菌株或品系不同，對標的害蟲或病原具有不同程度的致病性、分解作用、抑制及拮抗作用，因此微生物農藥對動物安全性自是不同，故需同時進行不同之評估，以強化微生物農藥對環境生態及人體安全保護。

二、微生物農藥應用上之管理

(一) 國內微生物農藥管理之毒理資料需求

1. 國內有關微生物農藥在管理上所需之毒理資料詳如表一。該規定主要係參照美國環保署(U.S.EPA)對於微生物製劑之管理規定，並考慮國內微生物製劑開發及實際應用的情形加以規劃訂定。所需資料與美國環保署最大不同者即所要求的為第一階層基本毒理試驗。包括口服急毒性/致病性、皮膚急毒性、肺急毒性/致病性、靜脈注射急毒性/致病性、眼刺激性/感染性、過敏性反應及細胞培養試驗等對安全評估之急性試驗；以及鳥類、水生生物

表一、國內農用微生物製劑登記之毒理資料需求

資料項目	供試樣品		備註
	原體	成品	
一、急毒性試驗(Acute toxicity testing)			
口服急毒性/致病性(Oral toxicity/pathogenicity)	V		
肺急毒性/致病性(Pulmonary toxicity/pathogenicity)	V		
靜脈注射急毒性/致病性(Intravenous toxicity/pathogenicity)	V		1
皮膚急毒性(Dermal toxicity)	V	V	2
眼刺激性/感染性(Eye irritation/infectivity)	V	V	
過敏性反應報告(Report of hypersensitivity incidents)	V	V	3
細胞培養試驗(Cell culture test)	V		4
二、環境安全試驗(Environmental fate studies)			
水生物急毒性測試(Aquatic toxicity)	V		5
鳥類急毒性/致病性(Avian toxicity/pathogenicity)	V		
非目標植物致病性(Nontarget plant pathogenicity)	V		6
非目標昆蟲毒性/致病性(Nontarget insect toxicity/pathogenicity)	V		7
對蜜蜂急毒/致病性(Honey bee toxicity/pathogenicity)	V		8
備註：			
1. 產品為病毒者可免。			
2. 蘇力菌製劑可免。			
3. 如有任何過敏性反應時需提出報告。			
4. 病毒類製劑必備。			
5. 其他成份若具高毒性或增效性時必需另附成品水生物急毒性測試。			
6. 微生物殺草劑必備，所用植物種類視個案而定。			
7. 微生物殺蟲劑使用於天敵釋放區，必須附上對該天敵之毒性/致病性試驗。			
8. 使用於蜜源植物必備。			

及非標的植物、蜜蜂之急毒性/致病性等對環境安全評估報告，經上述任一試驗結果判斷若有發生危及人類安全之潛在危險，即禁止在國內進行登記，本國之微生物農藥因限於特殊環境不考慮美國第二或第三階層的毒理資料試驗，此管理上是較美國嚴格的。

2. 微生物中，病毒因性質特殊，潛在危險性高，規定較嚴謹。任何以病毒或其製造產品，使用時均需先進行細胞培養試驗，目的在提供足夠的資料以證明病毒微生物農藥，於哺乳動物細胞中，是否可能產生感染、複製、轉形及細胞病變之潛力，以決定此產品已否達到安全標準足以上市。

(二) 微生物農藥與化學性農藥管理測試體系之不同

化學性農藥可依劑量與生物效應進行測試，目的強調化學物質之毒性，而微生物農藥之測試，因微生物之生物本質是主要考量因素，於大多數微生

物農藥均含有微生物活體，因能自行生長繁殖，並具感染性，因此利用動物之測試體系考量層面不同，其測試特殊性可歸納為三項：

1. 測試方法的不同：(a)毒性測試期不同：微生物農藥於哺乳類及魚類測試期分別為 1 至 2 個月及 30 天，而一般化學性農藥對哺乳類動物急性毒性測試期為 14 天、魚急性試驗僅需 4 天，且微生物農藥之魚毒試驗一般採靜置式試驗(Static test)，化學測試法則利用循環式試驗(Flow - through test)；(b)投予劑量的不同：微生物農藥一般給予生物活體之最高劑量(10^8 以上的 cfu 或 IU 單位)，而化學性農藥是以每公斤多少毫克作為單位投予；(c)投予途徑的不同：一般化學性農藥主要以口服強迫餵食法為主，微生物農藥則需增加氣管、靜脈及腹腔等投予途徑，以增強安全評估之潛力。
2. 測試過程的特殊性：(a)微生物農藥注重測試對生物的品質監測(quantification)：此特殊性需加以特別注意，由於微生物農藥含有微生物，試驗投予前，應針對不同的微生物品種，選擇其適合的溫度、培養基及 pH 值，以瞭解測試樣品的生物活性；(b)回收培養(recovery culture)：微生物投予後於動物各組織器官需進行特殊回收培養的技術，以瞭解微生物在動物體內的感染、分佈情形。
3. 評估的指標不同：微生物農藥藉由回收培養之微生物的數量及組織病理學的技術，以觀察致病性及感染性此與化學性藥劑較注重短期及長期之組織毒害的評估指標不同。

三、微生物農藥安全性評估

有關農用微生物製劑對哺乳類動物安全性評估最早的正式研究報告源自 1968 年 Schaerffenberg 以大白鼠對黑殭菌進行口服、呼吸、靜脈及皮下接種試驗。1975 年後陸續發展之農用微生物製劑安全評估，包括對魚類及鳥類(鵝鶉)等環境之非目標生物的安全性評估。往昔對大、小白鼠、天竺鼠、無胸腺老鼠、兔子、綿羊等溫血動物之毒理試驗研究如表二、表三，此安全毒性測試對微生物應用安全上提供相當重要初步基本資料。表二資料中 1983 年 Samples 和 Buettner 曾提出蘇力菌懸浮液所引起眼睛傷害個案，此些報告曾就微生物製劑引起眼睛潰瘍及對組織之侵入性(表三)有所報導。至於 Siegel 及 Haddey 等以回收培養試驗中之不同投予途徑，如腹腔方式投予小白鼠或拌於飼料中餵食綿羊，證明脾臟組織可累積大量微生物孢子，唯微生物製劑在動物和人體中存留方式及機制詳細情形至今仍未十分清楚。微生物大量增殖後與自然環境菌種競爭，有可能直接或間接地影響生態系或人類的安全，因此微生物農藥之安全評估試驗顯然十分重要。以下分別敘述微生物安全評估最重要部份，包括哺乳動物安全性評估及以禽類之環境生態安全性評估系統：

(一) 哺乳動物安全評估體系：

筆者等為建立本國微生物農藥對溫血動物之安全評估體系，乃著手建立其中二個關鍵性的安全評估系統。

1. 口服急毒性/致病性安全評估

筆者等曾以蘇力菌進行大鼠口服試驗(蔡等 1995)，發現蘇力菌於動物體中主要清除方式乃由糞材排出，排出量集中於接種後 1 天內，至於接種後第 28 天由代謝籠所收集之糞材，則未檢出蘇力菌之菌落(圖一)。而由動物消化道中各內容物懸浮液之培養經水浴加溫法，除去大部份雜

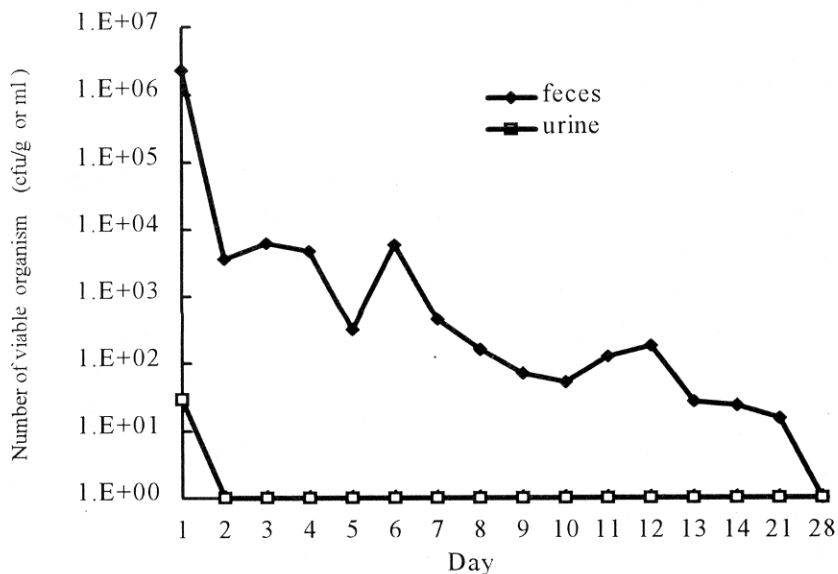
表二、黑殭菌微生物製劑之安全評估文獻報告

作者/試驗動物	投予方式	結果
Schaerften 大鼠(1968)	皮下注射、呼吸毒、餵飼	無致病性及過敏性反應
Latch 小鼠、天竺鼠(1976)	餵飼	與對照組無明顯差異
Robberts 魚(<i>Epiplatys bifasciatus</i>)(1975)	孢子混合於水中	死亡率與對照組無明顯差異
Wasti <i>et al.</i> 鵝鶉(Japanese quail) (1980)	飲水中	無致病性及毒性
Shadduck 小鼠、大鼠、兔子(1982)	腹腔及皮下注射、眼睛投予	無致病性及毒性、無眼刺激性
El-kaid <i>et al.</i> , 小鼠、天竺鼠(1983)	皮下注射、呼吸毒、餵飼	無致病性及毒性
王等 大鼠(1994)	肺急毒性	無致病性及感染性(異物性肺炎)

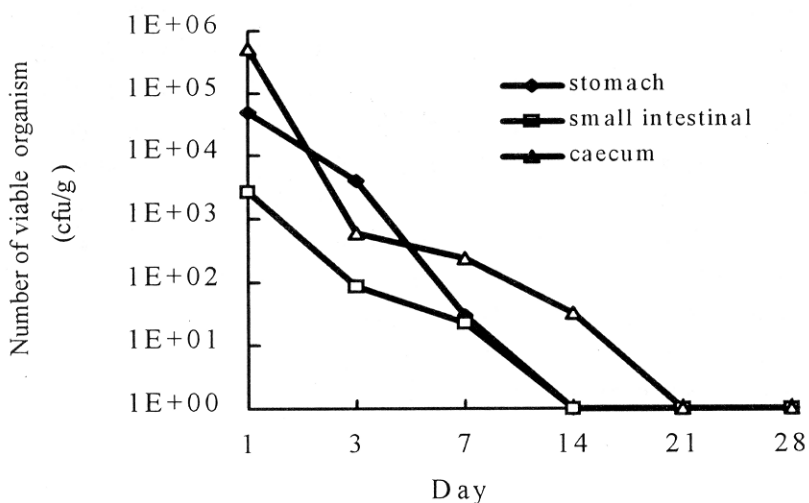
表三、蘇力菌農用微生物製劑之安全評估文獻報告

作者/試驗動物	投予方式	結果
Hadley <i>et al.</i> 綿羊(1987)	餵飼(5個月)	具有侵入性(分佈於血液)
Siegel <i>et al.</i> 小鼠、大鼠 兔子、無胸腺小鼠 (1987)	胃管、呼吸毒 腹腔皮下注射 眼睛投予	無毒性及致病性
Siegel <i>et al.</i> 小鼠、兔子(1990)	腹腔皮下注射 眼睛投予	無感染性
Snarski 魚類(1990)	混合於水中	於水生生物具散佈性
蔡等 大鼠(1995)	胃管	具有侵入性
蔡等 鵝鶉(1996)	胃管(連續五天投予)	無毒性及致病性

菌後，確認回收培養之菌落屬蘇力菌之孢子所發育生長，實驗證實蘇力菌是以孢子方式排出，排出數量隨時間遞減(圖二)，上述證據顯示蘇力菌並未在鼠體內增殖發育。另微生物處理之動物組織中所進行各組織臟器培養，得到之血液、腦和腎組織塗抹培養均未檢出蘇力菌菌落，但肺臟、脾



圖一、供試鼠隻之糞材及尿液檢出蘇力菌之菌落消長



圖二、鼠隻消化道內容物之蘇力菌菌落消長

臟、肝臟及腸繫膜淋巴結中則均可檢出蘇力菌菌落，其中以脾臟之檢出率最高，脾臟甚至於第 4 週後仍可檢出該菌，由此可知蘇力菌經口服投予鼠後，蘇力菌可經由消化道分佈至體內其他之組織。蘇力菌於脾、肝、肺及腸繫淋巴結等可發現大量菌落，此現象是否與上述組織含大量吞噬細胞有關及蘇力菌之孢子是否可於此些器官中停留則有待進一步確認。就蘇力菌試驗而言脾臟組織是所有組織臟器中檢出蘇力菌菌落數最多之器官組織，且停留時間最長，此特殊性，顯現其具有標的器官角色，至於脾臟在蘇力菌中於動物體內作用及角色是個相當有趣及重要研究之主題。

2. 肺急毒性/致病性安全評估

筆者等(蔡等 1994)曾進行經喉頭氣管投予黑殭菌孢子之肺急毒性/致病性實驗，發現大白鼠未有任何明顯的臨床症狀或死亡，但肺臟組織有局部的肉芽腫病變，唯組織塗抹片中並未於肺臟組織及氣管組織中觀察到發育的孢子，肺臟的病理組織也未曾發現發育的孢子、菌絲或任何增殖的證據，進一步利用 PAS (Periodic Acid-Schiff's) 特殊染色觀察瞭解肺臟組織切片之病變，證實接種後第 14 及 21 天的肺臟組織中含很多被染紅之黑殭菌孢子，且部份孢子存在於巨噬細胞內，顯示造成肺臟的病變是為異物性的炎症反應，但說明本菌株的孢子並無法在大白鼠體內發育，故推斷此菌對哺乳類動物無感染性及致病性。由此可知本實驗之黑殭菌菌株，與真菌類麴菌可對人類及動物引起全身性之致病性，截然不同。

(二) 環境安全評估體系：

禽類急毒性/致病性安全評估：

為建立本國微生物農藥對環境安全評估體系，筆者等(蔡等 1996)曾以蘇力菌經口服處理鵝鵝後之糞材回收培養與鑑定試驗，顯示蘇力菌以口服方式投予鵝鵝後，於禽類中清除途徑主要經消化道系統排出，蘇力菌以孢子方式排出，數量隨時間遞減，亦無明顯增加現象。組織病理學觀察未見蘇力菌感染或增殖跡象，此等證據顯示蘇力菌並未在鵝鵝體內增殖發育。蘇力菌孢子於鵝鵝糞材排出期可持續至第 35 天，此與作者等往昔研究大鼠口服蘇力菌孢子試驗排出期不同，如鵝鵝連續投予五天，其總孢子數較高，推測可能因鳥類的消化道系統與白鼠不同，鳥類具有嗉囊及腺胃，加上腸道的長度不同可能使蘇力菌孢子在鵝鵝的消化道較白鼠消化道停留較長時間。另血液、組織臟器塗抹培養與鑑定，鵝鵝並未檢出蘇力菌菌落，此結果顯示蘇力菌在鵝鵝體內之分佈情形，未涉及其它器官，此與蔡等及 Hadley 等，利用口服方式投予蘇力菌於大鼠及綿羊後，在肺、脾、肝、腎、腸系淋巴結及血液中檢測出蘇力菌的菌落有所不同，推論蘇力菌對哺乳類動物潛在的風險性遠比鳥禽類高，因此微生物農藥對環境安全評估實有其特殊意義及重要性。

四、結語

台灣由於微生物製劑之快速開發與應用，一般人的觀念均以為微生物製劑絕對安全，事實上由於微生物製劑可能具感染性、致病性此與菌(病毒)株種類及給予途徑有密切關係，微生物農藥是否絕對安全，值得存疑，因此國內應加強此研

究管理。由於一般微生物製劑之動物安全性評估管理時與一般化學藥劑不同，故建議安全評估時，給予較高或最高的劑量及較嚴苛的毒理投予途徑，以增加其安全性，如1995年的美國環保署的報告中，即明白的指出增加腹腔注射給予途徑可作為蘇力菌新品系或其它微生物製劑申請登記前的一個橋樑，其它如氣管內投予，靜脈注射等方式，甚至以顱內注射方式以瞭解其致死劑量，目的即在避免人類及環境受到微生物製劑高劑量下可能受到危險之衝擊，這一點在研究及管理時應相當注意。此外微生物製劑與一般化學藥劑相同的是，對不純物的成份及其副產物毒性不可忽視，尤其微生物製劑量產時，通常需經發酵過程，對於不純物或雜菌管理十分重要，故在評估毒理資料時應包括有效成份及商品化成品之測試，以確保整體微生物製劑評估安全可靠。目前微生物製劑之研究資料仍十分缺乏，就生態觀點而言其安全性，有待加強探討。目前國內微生物製劑發展遭受之瓶頸限制，包括微生物製劑安全評估之動物模式尚不完整，微生物於動物體內之作用機制、代謝作用不明及遺傳基因工程產品大量加入，故如何有效評估等需加強研究，以強化國內微生物製劑管理之合理化、制度化、統一化及國際化。

參考文獻

- 蔡三福、廖俊旺、王順成。1996。微生物製劑蘇力菌以色列變種對鵝鶉口服之安全性。中華獸醫誌 22: 340-347。
- 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。
- 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。
- Brown, E. M., H. D. Dellmann, and L. Nicander. 1987. Lymphatic organs. pp.164-184. in: Dellmann, H. D., and E. M. Brown eds. Textbook of Veterinary Histology. Lea & Febiger, U. S. A.
- Hadley, W. M., S. W. Burchiel, T. D. DeMowell, J. P. Thilsted, C. M. Hibbs, J. A. Whorton, P. W. Days, M. B. Friedman, and R. E. Stoll. 1987. Five-Month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. Fundam. Appl. Toxicol. 8: 236-242.
- Kallapur, V. L., M. E. Mayes, F. W. Edens, G. A. Held, W. C. Dauterman, C. Y. Kawanishi, and R. M. Roe. 1992. Toxicity of the crystalline polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Japanese quail. Pestic. Biochem. Physiol. 44: 208-216.
- McClintock, J. T., C. R. Schaffer, and R. D. Sjoblad. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic. Sci. 45: 95-105.
- Ohba, M., and K. Aizawa. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan. J. Invertbr. Pathol. 47: 12-20.

- Siegel, J. P., J. A. Shaddock, and J. Szabo. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *J. Entomol.* 80: 717-723.
- Siegel, J. P., and J. A. Shaddock. 1990. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis* from mammals. *J. Econ. Entomol.* 83: 347-355.
- Snarski, V. M. 1990. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2618-2622.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1988. Pesticide Assessment Guidelines. FIFRA Subdivision M: Microbial and Biochemical Pest Control Agents, Subsection 154A-16. Environment Protection Agency, Office of Pesticide Program. Washington, D. C. 192 pp.
- U. S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances Washington D. C. 1982. Toxic Substances. Health Effects Test Guidelines. EPA 56016-82-001.
- Wasti, S. S., G. C. Hartmann, and A. J. Rousseau. 1980. Gypsy moth mycoses by two species of entomogenous fungi and an assessment of thier avain toxicity. *Parasitol.* 80: 419-424.

Management and safety evaluation of microbial pest control agents

Tsai, S. F. and S. C. Wang

Applied Toxicology Department, Taiwan Agriculture
Chemical and Toxic Substance Research Institute

ABSTRACT

Unlike chemical pesticides, microbial pest control agent may survive and reproduce in the environment, and may infect or cause disease in living organism. Thus the basic test procedure and management are designed specifically to evaluate for these characteristics. This paper emphasizes the different exposures in various tests, including the oral toxicity/pathogenicity, pulmonary toxicity/pathogenicity, intravenous toxicity/pathogenicity in rats and avian oral toxicity/pathogenicity. The current research status of microbial pest control agent on mammals by special technique is well elucidated, too. These studies are also set a battery data to evaluate the potential toxicity, infectivity and pathogenicity of microbial pest control agent. In the mean time, it is considered as a basis reference for the management and safety evaluation of microbial pest control agent using in Taiwan.