

比較大鼠氣管灌注蘇力菌及黑殭菌孢子之清除及影響

* 蔡三福 廖俊旺 王順成

臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系

收稿日期：86 年 7 月 23 日

接受日期：86 年 8 月 18 日

Clearance and effects of intratracheal instillation to spores of *Bacillus thuringiensis* or *Metarhizium anisopliae* in rats

* San-Fu TSAI, Jiunn-Wang LIAO and Shun-Cheng WANG

Department of Applied Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substance Research Institute, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC

Received: July 23, 1997.

Accepted: August 18, 1997.

抽印自中華民國獸醫學會雜誌第23卷第6期

中華民國86年12月

Reprinted from Journal of the Chinese Society of Veterinary Science

Taipei, Taiwan, ROC

Vol. 23 No. 6, December 1997

比較大鼠氣管灌注蘇力菌及黑殭菌孢子之清除及影響

*蔡三福 廖俊旺 王順成

臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系

收稿日期：86 年 7 月 23 日

接受日期：86 年 8 月 18 日

摘要 以純化的微生物製劑之蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 或黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*) 1×10^8 個活孢子對大鼠進行單一氣管內灌注，評估其在哺乳類動物肺臟內之清除及其影響情形。結果灌注孢子之處理大鼠增重較對照組下降，白血球及紅血球總數、紅血球濃度、血容比均增加。蘇力菌或黑殭菌之孢子肺臟回收培養試驗中，其總菌落數少於接種之孢子數，蘇力菌處理組其孢子分佈於肺、肝、脾、腎及腸系膜淋巴組織，且孢子在組織中存活之時間超過 21 天，而黑殭菌孢子只分佈於接種部位之肺臟組織，孢子在組織中存活時間不足 14 天。組織病理可見在白鼠氣管內灌注不同的孢子懸浮液後，均造成支氣管周圍及肺泡細胞大量的炎症細胞浸潤，黑殭菌孢子所造成的病變比蘇力菌孢子顯著，並形成肥大的泡沫狀細胞，而蘇力菌孢子主要形成肉芽腫組織病變。對大鼠進行單一氣管內灌注的試驗過程中，雖未發現兩種孢子於組織中產生感染增殖的跡象，唯當暴露於高劑量下，仍需再進一步詳細評估其對人類健康潛在的風險性。[*蔡三福、廖俊旺、王順成。比較大鼠氣管灌注蘇力菌及黑殭菌孢子之清除及影響。中華獸醫誌 23(6): 515-522, 1997。*聯絡人 TEL: 04-330 2101 轉 508, FAX: 04-332 3073]

關鍵詞：蘇力菌，黑殭菌，鼠，氣管灌注

緒言

生物製劑開發以替代部份化學性農藥之使用，是近年國際植物保護的新趨勢。目前生物技術應用於生物防治中，以細菌類的蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 及真菌類的黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*) 最為顯著[10, 11, 12, 13]，已知其所寄生的昆蟲種類達 200 多種[23]，顯著的控制或減低田間作物病蟲害之發生。唯此類微生物製劑對哺乳類動物的安全性評估，國內外相關之報告甚少。由於大多數微生物製劑均含有微生物活體，能自行生長繁殖，並對標的害物具感染性，往昔研究者已指出蘇力菌可長期存活於實驗動物體內長達 7 週，尚具發育繁殖之活力[8,

18, 19]微生物對溫血動物之安全風險似值得注意。由於微生物製劑的安全測試研究不同於化學性藥物，化學藥物可依劑量與生物效應進行安全評估，而微生物製劑因其生物的本質，對動物安全測試體系考量層面自是不同。1988 美國環保署[21]訂定微生物製劑安全性評估管理辦法時，即針對不同的菌（病毒）株對標的物，具有不同程度的致病性和毒殺作用之特性，加以探討，管理辦法中最重要者乃提出微生物製劑應給予較高或最高的菌（病毒）量數及不同的毒理授予途徑以為安全評估依據，如氣管灌注，腹腔注射等授予方式，目的在增加瞭解微生物是否具感染性或致病性，甚至考慮增加顱內注射方式授予[17, 18]，以增加安全性評估，目的在

避免人類及環境暴露於高數量微生物製劑時其可能受到危險之衝擊。截至目前有關國外微生物製劑對溫血動物的肺臟影響之正式研究報告，大部份沿用化學性藥物的安全評估方法，如以吸入性口鼻式暴露法進行研究，雖均證實蘇力菌及黑殭菌孢子對肺臟並不造成明顯的毒性、致病性或明顯的組織病變[7, 18]，唯近來研究以氣管灌注法證實黑殭菌孢子對鼠肺臟造成異物性的肺炎[1]，說明微生物製劑安全評估需有不同考量，尤其應針對其生物本質的特殊性加以探討。由於微生物製劑實際應用的時間尚短，此方面之研究資料仍十分不足，其安全性有待深入探討。目前上市微生物製劑產品以粉末狀為主，易進入動物及人體呼吸系統，且部份研究者亦指出蘇力菌孢子以不同的途徑投予，均可能分佈於實驗動物的脾臟組織中[8, 19]。因此本研究之目的，乃針對已應用於生物防治最具潛力的本土性蘇力菌及黑殭菌的孢子，進行氣管灌注投予法，期建立基本微生物製劑對肺臟安全評估模式，並進一步瞭解及比較蘇力菌及黑殭菌的孢子在動物肺臟分佈、停留、清除及對動物相關器官可能產生的影響，進而提供政府對微生物製劑安全管理之參考資料。

材料與方法

試驗動物 四週齡 Wistar 品系大鼠 (*Rattus norvegicus*) 購自國科會動物中心，在本所動物飼育室觀察二週後，取體重相近之健康成鼠進行試驗。試驗前取同批鼠 8 隻進行細菌、病毒及寄生蟲之微生物檢疫監測[2, 3, 5]，以確定試驗所使用之鼠隻未受特定病原之感染。供試白鼠於處理前 4 小時禁食，每籠關一隻，給予充足之飼料 (Rodent Laboratory Chow^(R) 5001, USA) 及一次蒸餾水飲用。動物飼育室維持溫度在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ；相對濕度維持在 40-70%；光照維持明暗各 12 小時。

孢子純化及品質監測 蘇力菌或黑殭菌的孢

子純化方法[1, 4, 8]，乃取蘇力菌以色列變種原體粉末 (*B. thuringiensis* var. *israelensis*；生物技術中心提供)，加入 phosphate buffered saline (PBS) 緩衝液 (pH 7.2；0.15M)，振盪混合 10 分鐘後，以 $4000 \times g$ 離心 10 分鐘，取下層液，重覆清洗 3 次；黑殭菌 (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) 孢子分離自紅胸葉蟲 (*Brontispa longissima* Gestro；本所生物製劑系提供)，取經米粒培養 10-14 天後保存於 4°C 之黑殭菌孢子加入 PBS 緩衝液，振盪混合 10 分鐘，經 80、150、200、325 網目 (mesh) 之金屬網過濾後，同上述之離心及清洗，以取得純化之孢子懸浮液。將孢子懸浮液重覆 10 倍稀釋後，各取 1 毫升進行培養，分裝於三個培養皿內，培養於 30°C 之以 Tryptic soy agar (TSA) 培養基，經 2 天培養，及以 Potato dextrose agar (PDA) 培養基，經 8 天培養 (26°C) 後，計算其菌落數 (colony forming unit, cfu)，測得每 mL 孢子懸浮液含有 8.7×10^{11} cfu 蘇力菌菌落或 9.2×10^9 cfu 黑殭菌菌落。以 PBS 緩衝液稀釋調整接種的孢子數，使處理組每隻白鼠氣管內灌注約 10^8 cfu 的活孢子。另孢子懸浮液亦進行其他雜菌培養，以證明未受到其他微生物之污染。

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肺急毒性、致病性及感染性毒性評估測試指引進行[21, 22]。以單一氣管接種針 (tracheal tube；內徑 1.1 mm 長 110 mm) 透過耳鏡經喉頭進入氣管各灌注單一劑量 (1.2 mL/kg ；約 10^8 個 cfu 孢子) 之蘇力菌或黑殭菌孢子懸浮液，於處理後第 1、3、7、14 天解剖雌雄各 4 隻，第 21 天雌雄各 10 隻。對照組 (9 雌、9 雄) 則給予 PBS 緩衝液，處理後第 1、14 及 21 天各解剖 2、2 及 5 隻。各組解剖時於後大動脈收集 2 mL 之血液，於血球計數儀 (Sysmec-150) 檢測血液相，並採腦、肺、肝、腎、脾及腸繫膜淋巴器官進行臟器孢子之發育回收培養

(recovery culture) 及組織病理學檢查。

試驗檢查及分析 蘇力菌或黑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、菌落顏色、革蘭氏染色反應、相位差 (phase contrast) 鏡檢，並挑取可疑的菌落測量孢子的大小，對此菌特有的菌體形態及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 [1, 4, 14, 20]。臟器孢子之發育回收培養，取 0.5 克濕重的肺臟組織加入 9 倍量之 PBS 溶液後，以均質機打碎做成 10% 之懸浮液，重覆 10 倍稀釋後，各取 1 毫升分裝於三個培養皿內，進行培養與鑑定，並計算總菌落數。取腦、肝、腎、脾及腸繫淋巴組織，以滅菌剪刀或刀片切割新切面；將新切面塗抹於培養基上。另取 0.1 mL 的心臟血液塗抹於培養基上。組織病理學檢查，解剖後採集各臟器組織置於 10% (V/V) 中性福馬林溶液中固定 48 小時以上，而後經石蠟包埋等過程製成切片，以蘇木紫及伊紅 (H & E)、Periodic Acid-Schiff's (PAS)、Masson 氏 Trichrome 及 Mac Callum-Goodpasture 氏染色，於光學顯微鏡下觀察組織病理變化。

結果分析 各試驗組所得值以 One way analysis of variance 與對照組比較，倘 F-ratio 小於 0.05，進一步以 Duncan's test, $P < 0.05$ ，作為統計上顯著性差異分析依據。

結果

臨床症狀觀察 以氣管灌注兩種菌之 10^8 個孢子懸浮液後，在 3 小時期間內白鼠均產生明顯的呼吸音 (水泡音) 症狀後恢復正常，其中灌注黑殭菌孢子懸浮液過程一隻雌性白鼠立刻死亡，其原因與灌注速度太快及麻醉深度有關，最後引起呼吸困難而死，本實驗立即補足雌性大鼠。有關大鼠增重情形處理組均較對照組明顯的減少 (表 1)。

血液學變化 處理組可見紅血球總數、白血

球總數、血球容積比及血色素較對照組增加 (表 1)。

微生物學 臟器孢子之發育回收培養結果，由肺臟組織培養前 14 天檢出蘇力菌菌落數平均值大於 10^6 cfu/g (圖 1)，脾臟、肝臟、腎臟及腸繫膜淋巴結等組織塗抹培養亦檢出蘇力菌菌落。黑殭菌平均菌落數在肺臟第 3 天即明顯減少為 10^3 cfu/g，第 7 天菌落數平均值在 10^0 - 10^1 cfu/g，第 14 天後各組織臟器則未鑑定出黑殭菌的菌落。

組織病理學變化 所有大鼠以氣管灌注蘇力菌或黑殭菌的孢子懸浮液第 14 天後，肺臟均可見明顯的病變，其餘臟器並無明顯的肉眼及組織學上的病變，肉眼下可見全面性肺臟潮紅腫脹，其表面有局部或多發局部性肺炎的紅色肝變期病變區，在處理後第 21 天其肺臟病變區域擴大漸成紫灰色之灰色肝變期病變。黑殭菌孢子所造成的肺炎的病變區比蘇力菌孢子顯著。組織切片中，可見兩者均造成細支氣管、終末支氣管周圍及肺泡內聚集大量的炎症細胞浸潤 (圖 2)，高倍下於接種蘇力菌孢子病變區出現的細胞主要為淋巴球、伴發少量的漿細胞、嗜中性球及多核巨噬細胞，周圍並有明顯結締組織包圍，形成多發性肉芽腫病變，以 Masson 氏 trichrome 染色，膠原物質呈藍色反應 (圖 3)。而黑殭菌孢子產生病變區的炎症細胞為少量淋巴球、大量的漿細胞及巨噬細胞聚集並形成泡沫狀細胞 (foamy cell)，但肉芽腫組織病變數量則較蘇力菌為少。

討論

本研究以氣管灌注法為實驗動物模式，配合微生物製劑之生物本質特性，將 10^8 cfu [1, 21] 的蘇力菌或黑殭菌的孢子直接灌注於肺臟中以探討其安全性。大鼠氣管灌注孢子後，其中白血球總數較對照組明顯增加，而處理黑殭菌孢子則更為顯著，顯見孢子存在肺臟組織會引起供試鼠隻激烈的炎症反應，終導

表 1. 鼠氣管灌注蘇力菌或黑殭菌孢子後第 21 天對大鼠增重及血液值之影響

測試項目	組 別 ^a					
	雄鼠 ^b			雌鼠		
	Bt	Ma	PBS	Bt	Ma	PBS
增重	62.5 ^c	60.5 ^c	65.5	36.5 ^c	35.5 ^c	41.5
(g)	(1.56)	(3.25)	(2.52)	(3.13)	(2.03)	(3.25)
RBC	8.18	8.48	8.16	8.63	8.65	8.56
(106)	(0.42)	(0.17)	(0.12)	(0.72)	(0.62)	(0.95)
Hct	47.8	48.8	47.4	46.6	46.3	45.9
(%)	(1.65)	(0.25)	(0.7)	(0.57)	(4.2)	(1.8)
MCV	59.8	57.5	56.5	53.5	53.3	52.5
(fL)	(2.5)	(0.5)	(1.5)	(2.1)	(1.5)	(3.5)
WBC	9.7 ^c	11.8 ^c	5.9	9.25 ^c	11.4 ^c	5.8
(103)	(1.1)	(0.6)	(0.6)	(1.6)	(2.3)	(1.2)
Hb	17.4	17.2	17.05	16.05	16.1	15.1
(g/dL)	(1.1)	(0.6)	(0.35)	(0.68)	(0.75)	(1.3)

^a 每隻大鼠單一氣管灌注 1.2 mL/kg (1 × 10⁸ 個活孢子或 PBS 緩衝液)。

^b 大鼠隻數雌雄各 5 隻。

^c 處理組與對照組具顯著性差異 ($P < 0.05$) ; () 標準偏差 (SD) 值。

Ma : *Metarhizium anisopliae*; Bt: *Bacillus thuringiensis* ; PBS: phosphate buffered saline; RBC: red blood cell; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; WBC: white blood cell; Hb: hemoglobin.

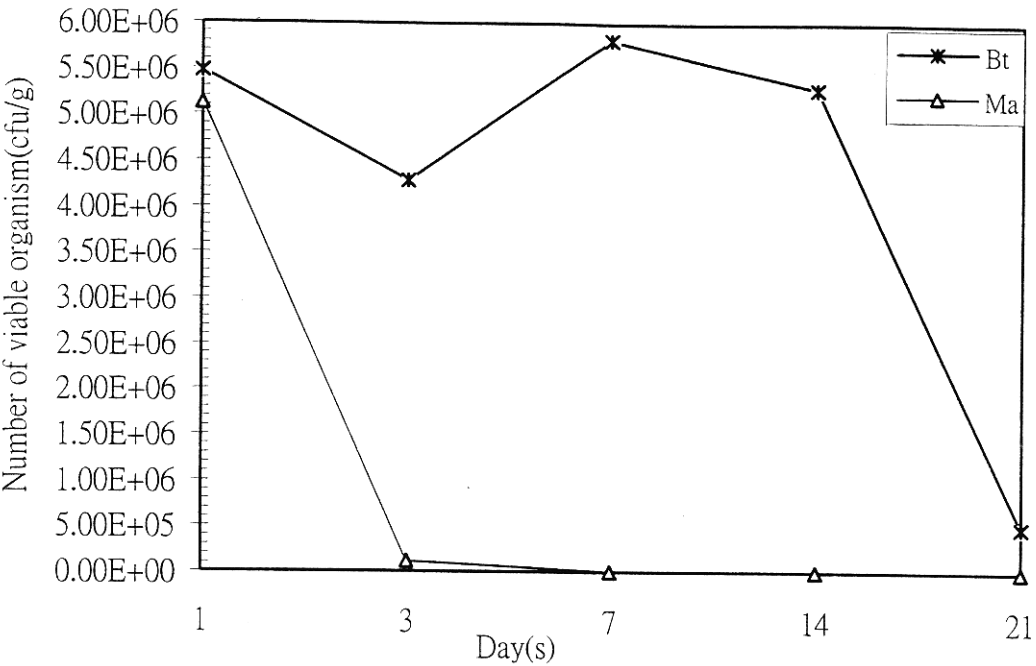


圖 1 處理組鼠肺臟組織中蘇力菌 (Bt) 或黑殭菌 (Ma) 之平均菌落消長情形。

致處理組大鼠體重之增重明顯的降低。

Shadduck 等曾對黑殭菌、蘇力菌及圓形芽孢桿菌 (*Bacillus sphaericus*) 等多種具生物防治效果的微生物，以不同途徑接種於溫血動物進行安全評估，並藉由回收培養的總菌落數、菌落數下降曲線或接種後一段時間內進行臟器培養，均未鑑定出該菌落 [16, 17, 18]，而推斷孢子的消失與巨噬細胞吞噬作用有關。至於蘇力菌孢子以口鼻暴露方式進入肺臟後，結果孢子並未分佈至其它臟器，推論因口鼻暴露微生物進入肺組織量少而肺內大量巨噬細胞發揮作用，使孢子無法移行 [18]。至於本實驗之蘇力菌孢子能透過血液或淋巴系統，分佈至脾、肝、腎臟及腸系膜淋巴組織等器官與上述報告顯然不同，其機制如何尚待進一步研究。本試驗中脾臟是除了接種部位外所有組織臟器中檢出蘇力菌菌落數最多之器官組織，顯示脾臟組織有如一過濾器讓大部份蘇力菌孢子停留在此，由於脾臟含大量吞噬細胞，是否於此具有清除蘇力菌孢子功能，目前本實驗室正進行測試中。文獻中亦以不同投予途徑試驗，如 Siegel 等 [18] 以腹腔方式 (IP) 投予小鼠，Hadley 等 [8] 長期於飼料中添加蘇力菌餵食綿羊亦發現脾組織含大量蘇力菌之孢子，推測此結果除與接種方式和孢子的數量有關外，因本試驗中同等數量的黑殭菌或蘇力菌的孢子進入肺臟組織後，黑殭菌的孢子並未能分佈至其它臟器，而黑殭菌孢子大小約 $8 \times 2 \mu\text{m}$ 為蘇力菌孢子的 4-5 倍 [20]，推測黑殭菌孢子之大小，是使孢子無法移行的因素之一。本試驗進一步探討發現，由肺臟組織回收培養得知，黑殭菌的孢子喪失存活能力，無論在數量或時間上均比蘇力菌多且快，在試驗第 14 後即未再鑑定出黑殭菌的菌落。除此之外黑殭菌的孢子是否易受動物體的影響，有關文獻指出與溫濕度的關係，Daoust 等 [6] 對保存在不同溫度與濕度下的黑殭菌孢子進行活力試驗，在 37°C 相對濕度為 96% 儲存一個月後，在 26°C 培養下仍有 83% 之孢子具發育繁殖能力。本試驗大白鼠的體溫為 $35.9\text{--}37.5^\circ\text{C}$ [9]，其肺臟組織孢子培養未見發育的

菌落，推論似非受動物體溫之影響，而應與不同的孢子種類與構造有關。本研究為進一步證實黑殭菌比蘇力菌的孢子在較短時間內喪失其培養發育繁殖之能力，曾進行 PAS [1] 及 Mac Callum-Goodpasture 氏特殊染色，結果證實接種後第 14 及 21 天的肺臟組織中有很多被染成紅色的黑殭菌孢子 (圖 4) 及被染成藍紫色的蘇力菌孢子 (圖 5)，孢子的形態不但完整，且未發現兩種孢子在大鼠的肺臟組織中發育，其中黑殭菌孢子更不具培養發育繁殖之活力，此結果說明接種的兩種孢子對哺乳類動物不具感染性及致病性。

Shadduck 等 (1982)、El-Kadi 等 (1983) 及 Siegel 等 (1987) 以頭鼻暴露方式對小鼠 (mice)、天竺鼠及大鼠進行黑殭菌或蘇力菌孢子的相關研究，報告中均未造成肺臟組織明顯的病變 [7, 15, 18]，依 Siegel 等的報告，每克肺臟中回收培養蘇力菌孢子數為 10^3cfu/g ，與吾等回收在 10^6cfu/g 差距 1000 倍，且回收高峰期限長達 14 天，顯然孢子進入肺臟量是決定吸引大量淋巴球、漿細胞、嗜中性球及多核巨噬細胞等出現的主要因素，類似的細胞浸潤肺臟組織亦出現於氣管灌注黑殭菌孢子，由於大量的外來孢子使組織產生炎症反應，進而吸引吞噬細胞，以進行吞噬及清除的工作，此現象於不同的接種部位，如腹腔及皮下，亦形成節結的肉芽腫病變，並以單核球及淋巴球浸潤形成於接種部位並包圍孢子 [7, 16]。本研究中由同為經氣管灌注蘇力菌或黑殭菌第 21 天的肺臟組織病變反應得知，許多單核球細胞及肺巨噬細胞聚集可吞噬黑殭菌孢子，形成肥大泡沫狀細胞，而對蘇力菌孢子則為明顯結締組織包圍，形成慢性的多發性肉芽腫病變。這種吞噬及清除情形的不同，歸因於不同種類的孢子對動物組織產生不同程度的細胞反應或是因為孢子本質較易被吞噬及清除，則有待進一步探討，但黑殭菌孢子易使肺巨噬細胞聚集及白血球總數增加 (表 1) 則為事實。

另探討兩菌對人體安全風險性，由本研究的回收培養孢子的發育繁殖能力的試驗中，

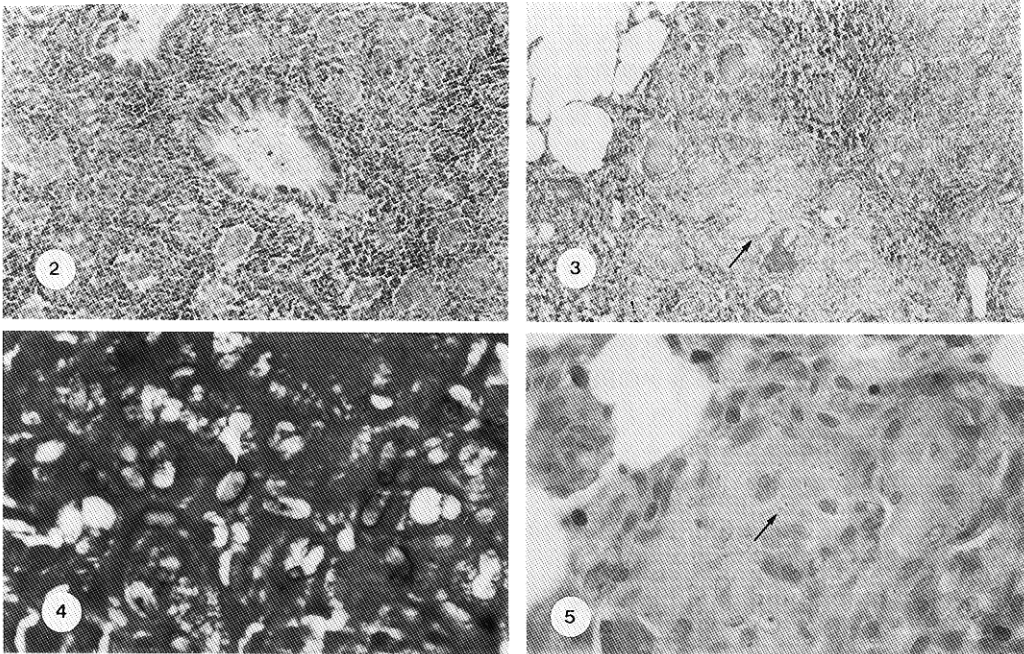


圖 2 肺臟支氣管周圍及肺泡細胞大量的炎症細胞浸潤，H&E stain, $\times 100$ 。

圖 3 肺臟纖維化區域局部膠原物資染色成藍色反應，Trichrome stain, $\times 100$ 。

圖 4 肺臟組織中黑殭菌孢子染成紅色的形態，PAS stain, $\times 1000$ 。

圖 5 肺臟組織中蘇力菌孢子染成藍紫色的形態 (箭頭)，Mac Callum-Goodpasture 氏 stain, $\times 1000$ 。

蘇力菌較黑殭菌的孢子存活時間長，且孢子可分佈至體內其它組織器官而言，推斷蘇力菌孢子對哺乳類動物潛在的風險性比真菌類的黑殭菌孢子高。總體而言，雖二者的總菌落數少於接種之孢子數，且組織切片的觀察並未發現孢子在大鼠體內發育，孢子對哺乳類動物似不具感染性及致病性，因此兩菌在正常狀況下似無安全顧忌。唯對常大量接觸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不易分解與排除，如本試驗蘇力菌孢子，推斷可能對人體的肺臟組織造成類似的多發性肉芽腫病變，或可分佈至體內其它組織部位，則微生物製劑對人類健康有其潛在的風險性。

誌謝 本文承蒙農委會 86 科技 -1.6-糧 -12 (3)計畫經費，洪慶和先生協助動物房管理、張淑滿小姐、林清山先生協助進行微生物培

養及湯秀枝小姐協助組織切片製作，謹此誌謝。

參考文獻

- 1 蔡三福、廖俊旺、洪文凱、王順成。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, 1994
- 2 蔡三福、廖俊旺、王順成。藥試所毒理研究之 SPF 動物及相關設施之微生物監測系統：I. 細菌監測系統。藥試所專題報導 36: 5-17, 1995
- 3 蔡三福、廖俊旺、王順成。藥試所毒理研究之 SPF 動物房微生物監測系統：II. 黴漿菌及病毒監測系統。藥試所專題報導 43: 9-17, 1996
- 4 蔡三福、廖俊旺、王順成。微生物製劑蘇力菌以色列變種對鵪鶉口服之安全性。中華獸醫誌 22: 340-347, 1996

- 5 蔡三福、廖俊旺、王順成。藥試所毒理研究之 SPF 動物房微生物監測系統：Ⅲ．寄生蟲監測系統。藥試所專題報導 46: 1-8, 1997
- 6 Daoust RA, Roberts DW. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J Invertebr Pathol 41: 143-150, 1983
- 7 El-Kadi MK, Xara LS, De Matos PF, Da Rocha JVN, De Oliveira P. Effect of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice. Environ Entomol 12: 37-42, 1983
- 8 Hadley WM, Burchiel SW, DeMowell TD, Thilsted JP, Hibbs CM, Whorton JA, Days PW, Friedman MB, Stoll RE. Five-Month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. Fundam Appl Toxicol 8: 236-242, 1987
- 9 Harkness JE, Wanger JE. The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents, p.43-52. Lea & Febiger, Philadelphia, 1983
- 10 Kallapur VL, Mayes ME, Edens FW, Held GA, Dauterman WC, Kawanishi CY, Roe RM. Toxicity of the crystalline polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Japanese quail. Pestic Biochem Physiol 44: 208-216, 1992
- 11 Latch GCM. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. Entomophaga 21: 31-38, 1976
- 12 McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic Sci 45: 95-105, 1995
- 13 Ohba M, Aizawa K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan. J Invert Pathol 47: 12-20, 1986
- 14 Samson RA. Identification of entomopathogenic deuteromycetes, in Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. (H.D.Burges ed.), p.93-101, Academic Press Inc., London, 1981
- 15 Schaerffenberg B. Untersuchungen über die Wirkung der Insektentötenden Pilze *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. und *Metarrhizium anisopliae*. Entomophaga 13: 175-182, 1968 (In German with English summary)
- 16 Shadduck JA, Roberts DW and LaSalle S. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: Preliminary results. Environ Entomol 11: 189-192, 1982
- 17 Shadduck JA, Singer S and LaSalle S. Lack of mammalian pathogenicity of entomocidal isolates of *Bacillus sphaericus*. Environ Entomol 9: 403-407, 1980
- 18 Siegel JP, Shadduck JA Szabo J. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis* for mammals. J Entomol 80: 717-723, 1987
- 19 Siegel JP, Shadduck JA. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. J Econ Entomol 83: 347-355, 1990
- 20 Tulloch M. The genus *metarhizium*. Trans Br Mycol Soc 66: 409-411, 1976
- 21 U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Program. Pesticide Assessment Guidelines. FIFRA Subdivision M: Microbial and Biochemical Pest Control Agents, Subsection

- 154A-16. Washington, D. C. 192 pp., 1988
- 22 U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances. Health Effects Test Guidelines. EPA 56016-82-001, Washington D. C., 1982
- 23 Zimmermann G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pestic Sci 37: 375-379, 1993

Clearance and effects of intratracheal instillation to spores of *Bacillus thuringiensis* or *Metarhizium anisopliae* in rats

* San-Fu TSAI, Jiunn-Wang LIAO and Shun-Cheng WANG

Department of Applied Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substance Research Institute, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC

Received: July 23, 1997.

Accepted: August 18, 1997.

SUMMARY This work investigated the clearance and effects of spores of *B. thuringiensis* (Bt) and *M. anisopliae* (Ma) in rats after single intratracheal administrations of 1×10^8 spores in phosphate-buffered saline. In rats injected with spores, the body weight gain was decreased and leucocyte and erythrocyte counts, hemoglobin concentration, and hematocrit were increased, the recovery culture examination and histological studies revealed that the microbial of total number of colony forming unit recovered less than the initiated inoculation. The distribution of Bt spores were found not only in the lung but also in liver, spleen, kidney and mesenteric lymph nodes. However, but Ma spores presented only in the lung. The spore of Bt survived in tissue up to 21 day, and Ma 14 days only after administration of the dose. The rats receiving spores of Ma intranasally developed severe inflammatory changes within both bronchioles and alveoli, subsequently forming foamy cells in the lungs. The rats receiving spores of Bt also developed inflammatory changes in the lung, but the foamy cells were less than those receiving spores of Ma, and formed focal or multifocal granulomatous pneumonitis. No spore-germination was found in the rat receiving 1×10^8 spores of Bt or Ma. Nevertheless, our findings confirm that exposure to highly dosage spores of Bt or Ma can be a health risk. [* Tsai SF, Liao JW and Wang SC. Clearance and effects of intratracheal instillation to spores of *Bacillus thuringiensis* or *Metarhizium anisopliae* in rats. J Chin Soc Vet Sci 23(6): 515-522, 1997. * Corresponding author TEL: 04-330 2101 ext 508, FAX: 04-332 3073]

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, Rats, Intratracheal, Instillation