

微生物製劑蘇力菌以色列變種對鶉鶉口服之安全性

*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 台中縣

摘要 以純化的微生物製劑蘇力菌以色列變種 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 對本土性的 16 日齡鶉鶉 (Japanese quail; *Coturnix coturnix*) 進行口服安全試驗評估, 以瞭解其對鳥類的毒性、感染性及在體內分佈、停留之情形。檢查內容包括糞材及組織臟器之回收培養、每週飼料消耗量、鶉鶉的體重變化、血液、血清生化及病理檢查等。蘇力菌孢子懸浮液連續以胃管方式投於 5 天後, 於第 35 天解剖。結果發現蘇力菌孢子大部份由消化道途徑排出, 投於後之前 5 天為清除高峰期, 其後漸減, 唯可持續越 35 天。臟器塗抹培養結果未發現孢子的分佈。飼料消耗量、動物的體重、血液學; ALT (GPT)、AST (GOT)、BUN、glucose 及 total protein 等血清生化檢驗及病理病變, 試驗組與對照組無明顯差異。此結果顯示國內製造之蘇力菌以色列變種對鳥類無明顯的毒性、感染性及致病性, 本試驗結果為提供微生物製劑對鳥類安全評估重要模式。[*蔡三福、廖俊旺、王順成。微生物製劑蘇力菌以色列變種對鶉鶉口服之安全性。中華獸醫誌 22(5): 340-347, 1996。*聯絡人 TEL: 04-330 2101, FAX: 04-332 3073]

關鍵詞: 蘇力菌, 鶉鶉, 安全性

緒言

近年來微生物製劑在國內外正大量被開發於生物防治之應用, 以控制或減低各種環境中的廢棄物或病媒蚊之孳生, 其中以 *Bacillus* 屬種類最多[3]。目前申請上市之各類微生物製劑日益增加, 加上各種微生物之變種或亞種菌株或品系不同, 對標的害蟲具有不同程度的致病性、毒效及分解作用[6, 8], 因此微生物製劑對動物安全性需進行不同方向之評估, 以加強微生物製劑對環境生態及人體安全保護。世界各國均非常重視環境用藥對於自然環境影響之評估, 而野生動物鳥禽類的安全評估為其中重要一環, 例如巴拉松 (有機磷殺蟲劑; Parathion)、巴拉刈 (殺草劑; Paraquat) 的不當使用, 可能導至環境中鳥禽類死亡或產蛋率下降及胚胎畸形的發生[5], 而影響自然環境中鳥禽類族群及生

態; 目前有關微生物製劑對環境中的鳥禽類影響之研究報告甚少。1980 年 Wasti 等[13] 以黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*) 對鶉鶉進行之毒理評估, 是微生物製劑對鳥類安全評估研究報告先驅。1992 年 Kallapur 等[3] 以鶉鶉進行蘇力菌孢子之結晶蛋白 (crystalline polypeptides) 毒性測試, 包括口服、皮下、靜脈、鼻腔及腹腔接種試驗, 蘇力菌孢子之結晶蛋白由腹腔接種途徑對鳥類深具毒性, 此為近年來研究蘇力菌對鳥類安全性之另一重要文獻。由於不同之微生物之生長發育及形態上差異大, 且多數微生物製劑含有微生物之活體可自行生長繁殖, 因此對其具有之潛在感染性、致病性及毒性安全評估自不容忽視。本研究之目的, 以經胃管接種蘇力菌以色列變種菌株於本土性的鳥類鶉鶉, 以瞭解蘇力菌製劑對鶉鶉的毒性、感染性及在體內分佈、停留之情形, 以建立微生物製

劑對本土性鳥類的安全評估模式。

材料與方法

試驗動物 一日齡大的鶺鴒 (Japanese quail; Coturnix 品系) 購自彰化縣之鶺鴒農場，於本所動物飼育室觀察 2 週後，取外觀正常鶺鴒供試驗用，其初體重雌雄鶺鴒各為 25.4 ± 1.2 及 28.8 ± 2.0 g。供試鶺鴒於處理前後 2 小時禁食，每籠關 1 隻，給予充足之飼料及飲水。動物飼育室維持溫度在前 2 週為 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 之後漸減維持在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ；相對濕度維持在 50-60 %；光照前 2 週維持連續的光照時間，之後維持 12 小時光 / 12 小時暗之光照週期。

蘇力菌孢子純化 取供試微生物製劑蘇力菌以色列變種原體粉末 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*；本所生物製劑系提供)，加入 PBS (phosphate buffered saline) 緩衝液 (pH 7.2；0.15 M)，振盪混合 10 分鐘後，以 $4000 \times g$ 離心 10 分鐘，取下層液，重複清洗 3 次，以取得純化之孢子懸浮液。將孢子懸浮液以 PBS 緩衝液行 10 倍稀釋，再以 TSA (tryptic soy agar) 培養基經 48 小時培養 (30°C) 後，計算其菌落數，以瞭解每 mL 含有多少個菌落形成單位 (colony forming unit, cfu)。

實驗設計 試驗動物分組及劑量選擇，依據美國環境保護署 (US.E.P.A) 頒佈之禽類口服生物製劑致病性及感染性毒性評估測試指引進行 [11, 12]。分處理組 3 組及對照組 2 組共 5 組，每組 10 隻，雌雄各半，供試鶺鴒，依體重以胃管法連續 5 天經口投予 100 mL/kg (1.7×10^9 cfu/mL) 之蘇力菌孢子懸浮液。開始投予的當天，視為試驗的第 0 天，對照組分別給予同等劑量的生理食鹽水及經高壓滅菌之蘇力菌懸浮液。每週稱鶺鴒的各別體重及飼料消耗量，其中處理組 2 組在接種後第 7 天及第 14 天解剖雌雄鶺鴒各 5 隻，進行血液及組織臟器之塗抹培養，其餘

在第 35 天進行解剖，解剖前以二氧化碳麻醉後用 23G, $1 \frac{1}{4}$ 針頭採集心臟血液，以含肝素抗凝血劑裝 1 mL 全血，於血球計數儀 (Sysmec-150) 檢測血液相；另以血球血清分離管裝 2 mL 血液，置於離心機 $775 \times g$ 離心 15 分鐘，取血清於半自動血清生化儀 (Vitalab 100S) 檢測血液生化值。並採腦、肺、肝、腎、脾及腸繫膜淋巴組織及消化道系統之胃、小腸、盲腸，將上述各部份器官置於 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，最後以蘇木紫及伊紅 (H&E) 染色，進行組織病理學檢查。

試驗檢查及分析 蘇力菌之鑑定乃依接種用蘇力菌之孢子懸浮液，進行 TSA 培養基上生長之菌落形態、革蘭氏染色反應及相位差 (phase contrast) 鏡檢等觀察，並對此菌特有的內生孢子、結晶蛋白及其菌體形態等特徵加以確認 [1, 2]。試驗中對於糞材、血液及各組織在 TSA 培養基上生長之菌落，依前述程序鑑定之。接種後不同時間收集處理組雌雄鶺鴒各 5 隻的糞材，在無菌操作台下取 0.5 g 濕重的糞材與 9 倍滅菌 PBS 緩衝液混合均勻後於 65°C 中水浴 30 分鐘，重覆 10 倍稀釋後，各取 1 mL 加入 45 mL 融熔之 TSA 中振盪均勻後，分裝於 3 個培養皿內，置於 30°C 之培養箱中培養 48 小時，計算蘇力菌之總菌落數。血液則直接取 0.1 mL 之血液塗抹於 TSA 培養基上，依上述方法進行培養。腦、肺、肝、腎、脾及腸系膜淋巴組織等器官，則以滅菌之剪刀或刀片切割一新的切面後塗抹於 TSA 培養基上，置於 30°C 培養箱中培養 48 小時後，挑取可疑菌落鏡檢鑑定之。

結果分析 各試驗組所得值以 one way analysis of variance (ANOVA) 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

本試驗中，處理組每隻鵪鶉口服接種蘇力菌孢子 4.1×10^8 cfu 以上，其每週平均飼料消耗量及解剖時的體重變化與對照組並無明顯差異（表 1）存在，且所有鵪鶉並未發現任何明顯臨床症狀，組織病變或死亡，其中每週平均飼料消耗量雄鵪鶉於 14-15 g，雌鵪鶉於 12-13 g。

血液相及血清生化值之影響 檢測項目包括血液相的 red blood cell (RBC)、hematocrit (Hct)、mean corpuscular volume (MCV)、Hemoglobin (Hb)；檢測的血液生化值項目有 alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST)、blood urea nitrogen (BUN) 及 total protein (TP)，其中 ALT 在處理組的雌鵪鶉為 18.80 ± 5.25 (表 3) 有顯著性下降現象 ($P < 0.05$)，唯上述之結果屬正常生理範圍內。

糞材及組織臟器回收培養 鵪鶉經口服接種蘇力菌孢子懸浮液後，於不同的時間以 TSA 培養基所進行糞材回收培養，可瞭解蘇力菌孢子在鵪鶉體內的清除情形，結果第 1 天至第 5 天檢出蘇力菌菌落數平均值大於

10^7 cfu/g，第 9 天檢出蘇力菌之菌落數明顯減少，其平均值約 10^5 cfu/g，第 27 天培養的糞材部份未檢出蘇力菌之菌落，第 35 天培養的糞材大部份未檢出蘇力菌之菌落（圖 1）。對照組的糞材、血液、組織臟器及處理組的血液、組織臟器培養並未檢出蘇力菌之菌落。

討論

為符合自然野生鳥禽類的攝食狀況，本試驗以本土性的鳥類鵪鶉連續以最大的劑量口服方式接種 5 天[11]；至於蘇力菌以色列變種對防治標的昆蟲之毒性，主要針對蚊子幼蟲攝食含蘇力菌孢子懸浮液後，其孢子中的結晶蛋白於昆蟲鹼性腸道受酵素激活後分解成毒蛋白，毒蛋白與腸上皮發生作用，造成蚊子腸上皮細胞的溶解[6, 7]，使得蚊子幼蟲腸道滲透壓的不平衡，最後可能因幼蟲攝入過多含毒蛋白的孢子導致蟲體麻痺而死[4]，此為蘇力菌以色列變種對蚊子幼蟲毒性的作用機制。本菌株對鳥類鵪鶉毒性作用由表 1 的每週平均飼料消耗量及解剖時的終體重之變化，施以 10^8 cfu 最高劑量，並未造成處理組鵪鶉有任何明顯的影響，顯示此菌株的毒性對鵪鶉不具影響，此菌株對動物間毒

表 1 口服蘇力菌 35 天後對鵪鶉飼料消耗量及體重之影響

組別	飼料消耗量 (g) ^a	體重 (g) ^b
雄鵪鶉		
Bti ^c	14.79 ± 0.66	108.39 ± 5.28
Heat-treated Bti ^c	14.77 ± 0.59	111.48 ± 5.68
Saline ^d	14.62 ± 0.44	109.78 ± 5.29
雌鵪鶉		
Bti	12.90 ± 0.69	91.04 ± 7.82
Heat-treated Bti	12.83 ± 0.78	91.72 ± 8.38
Saline	12.78 ± 0.58	91.64 ± 6.73

^a 每週平均飼料消耗量，鵪鶉隻數雌雄各 5 隻；^b 解剖時之平均體重

^c 每隻鵪鶉連續 5 天由胃管投予 10 mL/kg (1.7×10^9 cfu/mL) 之蘇力菌 (Bti) 懸浮液。

^d 每隻鵪鶉連續 5 天由胃管投予 10 mL/kg 之生理食鹽水。

表 2 口服蘇力菌後對鵝鶉血液值之影響

測試 項目	組 別					
	雄鵝鶉			雌鵝鶉		
	Bti ^a	Heat-treated Bti ^a	Saline ^b	Bti	Heat-treated Bti	Saline
RBC (10 ⁶)	3.99 ^c (0.48)	4.24 (0.53)	3.93 (0.48)	3.90 (0.45)	3.99 (0.68)	3.68 (0.38)
HCT (%)	55.54 (5.75)	56.20 (6.98)	54.48 (8.18)	53.28 (6.64)	49.06 (8.32)	48.06 (4.39)
MCV (fl)	139.50 (8.53)	132.4 (4.04)	138.2 (5.76)	136.90 (6.40)	123.2 (7.69)	130.6 (6.27)
Hb (g/dL)	16.00 (1.90)	17.3 (1.58)	17.0 (2.45)	16.72 (2.61)	16.6 (3.21)	14.9 (1.15)

^a 每隻鵝鶉連續 5 天由胃管投予 10 mL/kg (1.7 × 10⁹ cfu/mL) 之蘇力菌 (Bti) 懸浮液。

^b 每隻鵝鶉連續 5 天由胃管投予 10 mL/kg 之生理食鹽水。

^c 鵝鶉隻數雌雄各 5 隻；() 標準偏差 (SD)，RBC: red blood cell; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; Hb: hemoglobin

表 3 口服蘇力菌後對鵝鶉血清生化值之影響

測試 項目	組 別					
	雄鵝鶉			雌鵝鶉		
	Bti ^a	Heat-treated Bti ^a	Saline ^b	Bti	Heat-treated Bti	Saline
ALT (u/L)	21.06 (9.08)	32.80 (5.07)	35.20 (8.81)	18.80 ^c (5.25)	27.20 (9.28)	30.60 (6.54)
AST (u/L)	329.50 (73.67)	378.20 (36.89)	389.8 (79.73)	307.40 (62.92)	311.20 (83.82)	361.00 (67.93)
BUN (mg/dL)	2.80 (1.40)	3.00 (0.71)	2.80 (0.45)	2.60 (1.17)	3.00 (1.00)	3.20 (1.30)
GLU (mg/dL)	323.30 (36.61)	321.40 (39.78)	338.20 (45.04)	289.30 (65.53)	303.40 (5.32)	319.20 (29.05)
TP (g/dL)	2.10 (0.57)	2.20 (0.45)	2.20 (0.84)	2.40 (0.52)	1.80 (0.45)	2.00 (0.71)

^a 每隻鵝鶉連續 5 天由胃管投予 10 mL/kg (1.7 × 10⁹ cfu/mL) 之蘇力菌 (Bti) 懸浮液。

^b 每隻鵝鶉連續 5 天由胃管投予 10 mL/kg 之生理食鹽水。

^c 處理組與對照組具顯著性差異 ($P < 0.05$); 鵝鶉隻數雌雄各 5 隻；() 標準偏差 (SD) 值，ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen; TP: total protein.

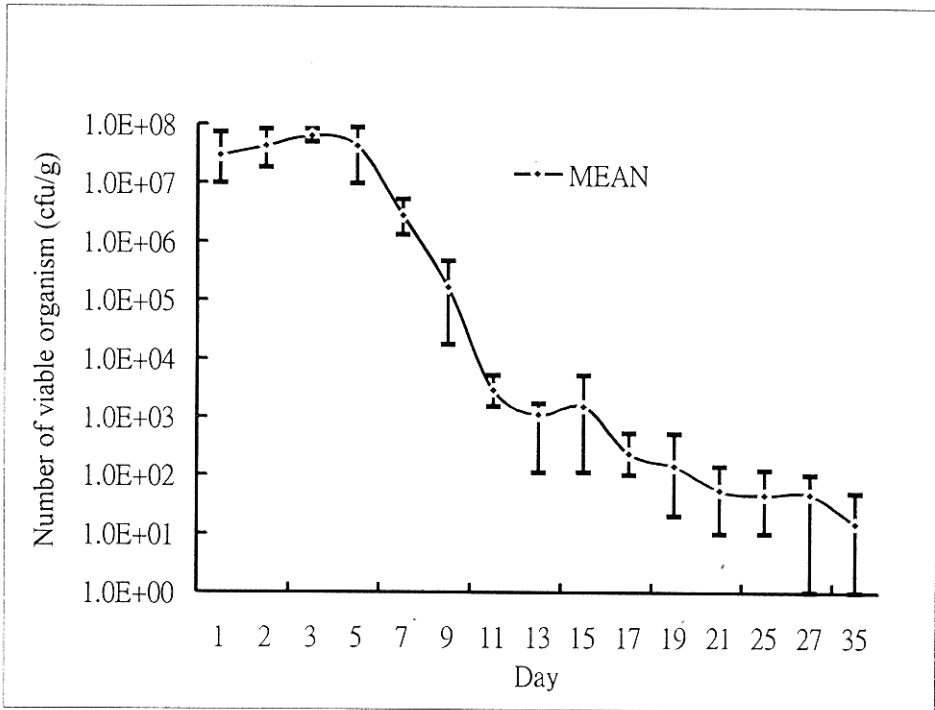


圖 1 鵝鶉糞材檢出蘇力菌之菌落消長情形

性具選擇性及專一性 (specific)。

對血液及血清生化值的影響 由表 2 及表 3 的血液及血清生化值得知，處理組鵝鶉與對照組無明顯的影響，此菌株對鵝鶉除不具口服急毒性，對鵝鶉血液及血清生化值並無作用。本實驗血液相及血清生化值對提供微生物對本土性鳥類鵝鶉試驗之基本資料深具參考價值。分析已收集血液學方面資料顯示，目前已有報告中僅報導血容比一項[13]，資料來源為鵝雞目稚科週齡相近的鵝鶉，Hct 值分別為 54.48 ± 8.18 及 $48.06 \pm 4.39\%$ 較 Wasti 等[13]之報告 39-40 及 43-44% 為高。由於鵝鶉血液中的白血球大小與紅血球相近或較小，其成熟紅血球含細胞核，因此一般無法求得較正確的紅、白血球總數。尤其對白血球計數易被大量的紅血球影響，計算不易。本實驗於血清生化值，ALT 為 35.20 ± 8.81 及 $30.60 \pm 6.54 \mu\text{L}$ ，BUN 為 2.80 ± 0.45 及 $3.20 \pm 1.30 \text{ mg/dL}$ ，TP 為 2.20

± 0.84 及 $2.00 \pm 0.71 \text{ g/dL}$ ，均低於 Kallapur 等[3]所提報告之平均值；GLU 為 338.20 ± 45.04 及 $319.20 \pm 29.05 \text{ mg/dL}$ ，平均值則高於 Kallapur 等之報告，推測此等差異可能與週齡有關於 Kallapur 的實驗中其使用鵝鶉僅為一週齡[3]。

對鵝鶉的感染性及致病性 蘇力菌菌株在自然狀況下，其對防治昆蟲之毒效中部份因孢子營養體於蚊子幼蟲體內感染、增殖，使防治幼蟲體內因蘇力菌大量繁殖而發病[7]，此點的特性與一般化學藥劑防治方式不同，一般化學藥劑對防治生物通常具有劑量與效應 (dose-response) 之反應，而微生物製劑則著重生物會被感染與增殖現象，而導致致病性產生，因此微生物製劑對動物安全評估上此為評估的重點。本實驗蘇力菌經口服處理於鵝鶉後由糞材回收 (圖 1) 培養與鑑定，發現蘇力菌糞材排出主要集中於連續投予的 5 天內，當停止投予後則明顯減少，接種後

第 35 天所收集之糞材，經培養則大部份未檢出蘇力菌之菌落，由於本實驗之糞材懸浮液之培養均經水浴加溫法，除可去大部份雜菌外，並確認回收培養之菌落屬蘇力菌之孢子所發育生長[9, 10]，實驗顯示蘇力菌以口服方式投予鵪鶉後，清除途徑主要經消化道系統排出，由實驗結果知蘇力菌是以孢子方式排出，而數量隨時間遞減，並無明顯增加。另組織病理學觀察結果亦未見蘇力菌感染或增殖跡象，此等證據均顯示蘇力菌並未在鵪鶉體內增殖發育。而蘇力菌孢子由鵪鶉糞材排出可持續至第 35 天，此與作者等[1]往昔研究大鼠口服蘇力菌孢子試驗排出的期間不同，推測鵪鶉連續投予 5 天，其總孢子數較高外，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鵪鶉的消化道較白鼠消化道停留較長的時間。另由血液、組織臟器塗抹培養與鑑定，亦未檢出蘇力菌菌落，此結果顯示蘇力菌在鵪鶉體內之分佈情形，並未涉及其它器官，此與蔡等[1]及 Hadley 等[3]，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，尤其當蘇力菌孢子經口服分佈於血液及組織器官，其可能引起的免疫系統反應，可能是微生物製劑安全評估研究上，另一重要課題。

誌謝 本文承蒙農委會 85 科技 -1.19-糧 -14(20) 計畫經費，張麗煌、張淑滿小姐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、王順成。鼠口服蘇力菌之清除及分佈探討。植保會刊。37: 265-270, 1995
- 2 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
- 3 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
- 4 Margalit J, Zaritsky A. Bti for mosquito control. pp.34 In the pacific rim conference on biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its impact to the environmental. Taipei Taiwan ROC, 1994
- 5 Martin PA. Effects of carbofuran, chlorpyrifos and deltamethrin on hatchability, deformity, chick size and incubation time of Japanese quail eggs. *Environ Toxicol Chemist* 9: 529-534, 1990
- 6 McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic Sci* 45: 95-105, 1995
- 7 Mulla MS. Ecological and environmental impact of the microbial agent *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. pp.58 In the pacific rim conference on biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its impact to the environmental. Taipei Taiwan ROC, 1994
- 8 Ohba M, Aizawa K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan. *J Invert Pathol* 47: 12-20, 1986
- 9 Siegel JP, Shadduck JA. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mam-

- mals. J Econ Entomol 83: 347-355, 1990
- 10 Snarski VM. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, under laboratory conditions. Appl Environ Microbiol 56: 2618-2622, 1990
 - 11 U.S. Environmental Protection Agency. 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., 1988
 - 12 U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances Washington D. C. Toxic Substances. Health Effects Test Guidelines. EPA 56016-82-001, 1982
 - 13 Wasti SS, Hartmann GC, Rousseau AJ. Gypsy moth mycoses by two species of entomogenous fungi and an assessment of thier avain toxicity. Parasitol 80: 419-424, 1980