

農用微生物製劑之 安全評估技術

■ 農業藥物毒物試驗所
蔡三福

一. 前言

微生物農藥是植物保護上積極開發的產品，其主要來源為一活體的生物，傳統的化學藥物可依劑量與生物效應進行安全評估，而微生物製劑因具生物的本質，對動物安全測試體系考量層面與技術自是不同。目前國內外有關農用微生物製劑登記的生物品種種類至少有38種，包括細菌類12種、真菌類19種、病毒類5種及酵母菌與原蟲類各1種。以農藥種類區分，有殺蟲劑15種、殺菌劑21種，以及殺草劑與植物調節劑各1種，若以不同的血清型或不同菌株區分，則可達200多種。生物活體經由人為大量培養、分離及開發應用，是否會造成人類健康上的風險，另外應用生物技術轉殖的基因改造(genetically modified, GM)之生物，如基改微生物、

植物保護類基轉植物(plant-incorporated-protectants, PIPs)或稱基因改造植物等，常見利用具有殺蟲能力的昆蟲特異性之毒性基因(aait)嵌插於桿狀病毒基因體中，以提高病毒對害蟲之致病能力，或如蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)之內毒素(結晶蛋白)基因，轉殖至其他易表現蛋白的菌體或轉殖至玉米、棉花等植物，以製造大量殺蟲蛋白或使植物體本身即具有殺蟲效果，這些來自轉入的基因所大量表現的蛋白，亦是研發微生物製劑過程中不可忽視的安全評估項目。

病毒類微生物製劑與基因改造生物之實際應用是否具潛在之危險性，應審慎評估其生物安全性，並依微生物的特質將微生物製劑之安全評估技術，分為細菌類與真菌類，以及病毒類與基因改造類的安全

評估技術二大方面，以闡明農用微生物製劑對人類健康上的風險。

二. 細菌類與真菌類微生物製劑安全評估技術

細菌類與真菌類的安全評估關鍵，在於追蹤孢子或菌體在組織發育及分布情形，技術上可應用模擬的人工胃液(simulated gastric fluid, SGF)、動物體內微生物的回收培養、組織病理判讀及組織特殊染色等，可明顯的比較不同的微生物菌株間潛在的風險。例如，黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)孢子在模擬的胃液中存活最久，可達5天，其次為白殭菌(*Beauveria bassiana*)孢子，可存活至24小時，而綠殭菌(*Nomurea rileyi*)孢子則完全不具活性，顯然的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，這與動物體內試驗可見綠殭菌孢子經口進入體內，幾乎在1天內完全喪失發育能力相同，確認綠殭菌孢子對哺乳類動物較不具潛在的風險性。

由回收培養顯示口服途徑之菌體於動物體內被清除時，主要經由消化道排出，且集中於投予後1天內，其排出數量並隨時間遞減。此外，在大鼠肺臟、脾臟、肝臟及腸繫膜淋巴結中可能檢出部分菌體，需採取進一步進行病理組織切片檢查。脾臟組織是所有組織臟器中檢出率最高器官組織，且停留時間最長，顯現微生物製劑的標的器官與一般化學藥劑在肝臟代謝不

盡相同，更說明微生物製劑安全評估的特殊性，不能套用化學藥劑的毒理安全評估體系。

三. 病毒類與基因改造類微生物製劑安全評估技術

本類的微生物製劑可增加運用免疫組織化學法、原位雜交反應法、病毒顆粒染色法與PCR等技術，追蹤病毒體在組織分布情形。以核多角體病毒(Nuclear polyhedrosis virus)為例，利用35與36之病毒引子(primer)，增幅核多角體病毒

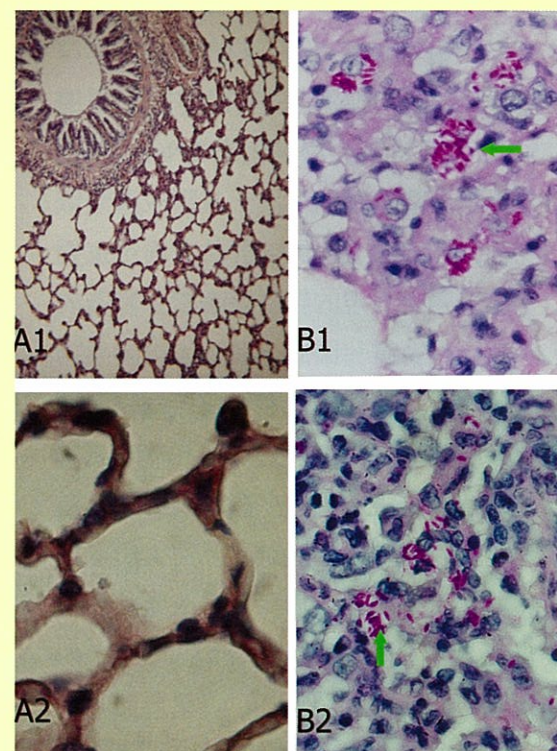


圖1 大鼠氣管灌注真菌類微生物製劑孢子後的肺臟組織病理變化。(A)正常肺臟組織(100或1,000X, H&E stain); (B)投予後第1天肺臟組織以特殊染色，可見被染成紅色且完整的孢子(箭頭)及肺泡腔大量滲出液浸潤(1,000X, PAS stain)



圖2 西方墨點法(Western blot)技術檢測過敏蛋白。利用過敏患者血清抗體結合試驗，偵測目標蛋白之過敏活性，第1行粗純化的目標蛋白(箭頭)，第2-5行不同尖峰的純化目標蛋白樣品

約 680 bp 的多角體蛋白基因片段，經由 (35/36) 引子檢測臟器純化之 DNA，以證實是否存在病毒基因片段。基因改造類微生物對人類健康上的風險評估方面，主要以基因轉殖所表現的物質是否對人體造成過敏反應的特質。因此，農委會農業藥物毒物試驗所積極運用生物科技，建立國際間關心的基改產品潛在過敏性評估測試體系，包括外源表現蛋白序列比對、消化穩定性、動物體內過敏性試驗及與人體過敏抗體結合試驗，以作為評估基改產品外源表現蛋白可能的潛在過敏性和毒性。如利用小鼠皮膚被動免疫(PCA)呈色反應試驗，成功的建立檢測具產生特異性過敏抗體(IgE)之表現蛋白的技術，進一步利用西方墨點法(Western blot)以過敏患者之血清 IgE 抗體，亦完成表現蛋白具強烈的過

敏活性反應的檢測技術的建立，以膠體粉末填充管柱進行樣品收集及偵測。

四. 結語

綜合上述有關微生物製劑對哺乳類動物感染性、致病性或過敏性之安全評估技術。可知目前有關生物性農藥產品其微生物本身(細菌、真菌及病毒)對哺乳類動物均有較高的安全性，加上對環境低污染性，使得農用微生物製劑在全球有機產業中被廣泛的接受及使用。惟應強化部分含代謝產物與基因改造類之本土性微生物製劑進行安全性評估技術，以確保生物性農藥對人體的安全性，除可消除消費者對基改產品應用的虞慮及保障消費者健康安全外，亦可提升國內生技產品的競爭力。 🌱