

Sammenfattende artikel

Bakterier anvendt til biologisk insektbekæmpelse – Kan de give diarré?

Bakterier med insektdræbende egenskaber anvendes i Danmark til plantebeskyttelse, og er et miljøvenligt alternativ til kemiske pesticider. Det er imidlertid kendt, at bakterierne har evnen til at danne toksiner, som kan give diarré hos mennesker. Et projekt med titlen 'Mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidlers skæbne i mave-tarm kanalen' har haft til formål at belyse potentielle risici ved anvendelsen af bakterier som plantebeskyttelse. Resultaterne udelukker ikke, at plantebeskyttelsesmidlerne kan forårsage kortvarig diarré hos mennesker, men peger heller ikke på at det er sandsynligt. Projektforløbet har givet vigtig information der sætter spørgsmålstegn ved anvendeligheden af rotteforsøg til risikovurdering af mikroorganismer.

Baggrund og formål:

Kan biologisk insektbekæmpelse give diarré?

Bakterien *Bacillus thuringiensis* (populært kaldet Bt) er den mikroorganisme, som er mest anvendt til insektbekæmpelse både på verdensplan og i Danmark, hvor den især anvendes til behandling af pryddplanter, tomater og agurker i væksthuse, samt til kål på friland. Bt har evnen til at danne toksiner, der kan fremkalde diarré hos mennesker. Dette er dog kun en risiko, når den er i det vegetative stadie, hvor den kan dele sig og danne nye bakterieceller. Plantebeskyttelsesmidler baseret på Bt indeholder ikke vegetative bakterier, men udelukkende sporer, som er en inaktiv og meget modstandsdygtig form af Bt. Sporerne spirer og danner vegetative celler i tarmen på insekter. Der har været en del diskussion i den videnskabelige litteratur om hvorvidt sporerne også kan spire i tarmen på pattedyr og mennesker efter indtagelse. Hvis sporerne spirer i mave-tarmkanalen, kan det medføre en risiko for diarré dels hos forbrugere, der spiser grøntsager behandlet med Bt produkter, og dels hos de væksthusearbejdere, der arbejder med produkterne. Hovedformålet med projektet var derfor at belyse risikoen for at sporerne spirer i tarmkanalen. Her ud over blev det undersøgt 1) om varmebehandling af Bt sporer, som er relevant når man tilbereder sprøjtede grøntsager, øger sporerne evne til at spire i tarmen efter indtagelse, 2) om Bt bakterierne havde nogen effekt på sammensætningen af de naturligt tilstedeværende bakterier i tarmen, 3) om de kunne danne diarré-toksiner i tarmen, og 4) om de overførte nogle af deres gener til andre tarmbakterier.

Undersøgelsen:

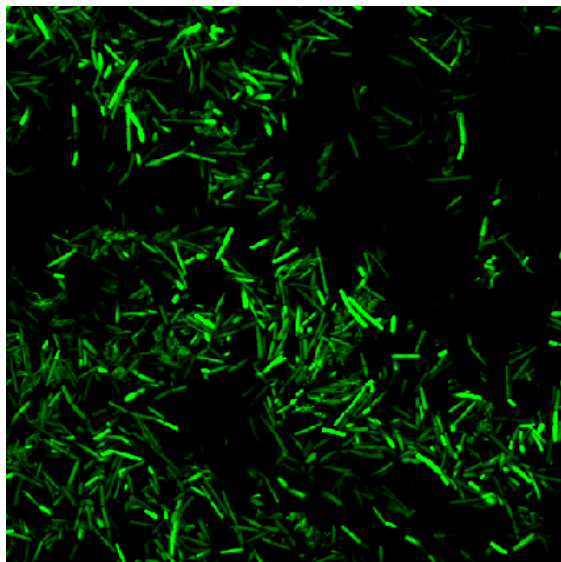
Et samarbejdsprojekt mellem tre danske forskningsinstitutioner

Bt sporer blev fodret til specielle rotter, hvis tarm er koloniseret med en menneskelig bakterieflora. På Danmarks Fødevarerforskningscenter undersøgte Andrea Wilcks, Bodil Madsen og Tine R. Licht, om sporerne spirede i tarmen, om de forårsagede ændringer af rotternes tarmflora, og om de overførte bestemte gener til andre bakterier i tarmen. På Danmarks Miljøundersøgelser undersøgte Bjarne Munk Hansen, Tina Thane og Niels Bohse Hendriksen, om Bt bakterierne havde dannet diarré-toksiner i rotternes tarm. Bt bakterier, som lyser grønt, og som blev brugt i de andre forsøg, blev fremstillet hos Lasse Smidt og Lars Andrup på Arbejdsmiljøinstituttet.

Projektresultater:

Grøntfluorescerende bakterier afslører at sporerne er spiret

Den traditionelle måde at afgøre, om bakteriesporer er spiret eller ej, er at trække kimtallet i en varmebehandlet prøve fra kimtallet i en ubehandlet prøve. Da varmebehandlingen dræber de vegetative bakterier, men ikke sporerne, kan dette tal bruges som et udtryk for mængden af vegetative celler i prøven. Problemet er, at hvis andelen af vegetative celler i prøven er meget lille, vil der være stor usikkerhed på denne måde at opgøre det på – Det er svært at se forskel på om der er få eller slet ingen vegetative bakterier. I projektet blev dette problem løst ved at mærke Bt cellerne med et grøntfluorescerende protein kaldet GFP (Figur 1). Herefter kunne rotterne fodres med GFP-mærkede sporer, som ikke lyser grønt, idet de ikke udtrykker proteinet før de er spiret. Med et flowcytometer (et apparat, der kan tælle lysende partikler) kunne det derefter tælles hvor mange grøntlysende bakterier, der var i tarmprøverne. Resultaterne viste, at Bt sporerne spirede i tyndtarmen, men at mange af dem omdannedes til sporer igen inden de kom ud med fæces.



Figur 1: Bacillus thuringiensis bakterier mærket med Grøntfluorescerende Protein (GFP).

Dette blev underbygget af en række andre observationer.

Genet for det fluorescerende protein var indeholdt i bakterierne på et plasmid, som er et cirkulært, 'ekstra' stykke DNA. Alle sporer, som rotterne blev fodret med, indeholdt dette plasmid, men mange af dem, der kom ud med fæces havde tabt det. Det betyder, at disse sporer har dannet vegetative celler på deres vej gennem tarmen, idet plasmidtab sker under deling af vegetative celler. Også den traditionelle sammenligning mellem kimtal i varmebehandlede og ubehandlede tarmprøver viste, at andelen af vegetative celler var højest i tyndtarmen, og blev mindre ned gennem tyktarmen. Endelig blev det vist, at Bt var i stand til at overføre DNA til andre bakterier i tarmen. Da sådan en overførsel ikke kan ske fra en spore, men kun fra en vegetativ celle, underbygger dette endnu en gang, at sporerne spirede på deres vej gennem tarmen.

'Fingeraftryk' af tarmfloraens sammensætning ændres ikke efter fodring med plantebeskyttelses-bakterier

Det er en kompliceret opgave at afsløre og opgøre ændringer i sammensætningen af tarmens bakterieflora, dels fordi floraen indeholder mere end 500 forskellige bakteriearter, og dels fordi langt over halvdelen af disse ikke kan dyrkes med traditionelle mikrobiologiske metoder. Derfor blev der i projektet benyttet en molekylærbiologisk metode (Denaturerende Gradient Gel Elektroforese), som baserer sig på at et bestemt område af bakteriers kromosom varierer fra art til art. Dermed kan man lave en slags 'fingeraftryk' af, hvilke arter, der er til stede. Fingeraftrykkene kan efterfølgende sammenlignes ved hjælp af et computerprogram. Resultaterne viste, at fodring af rotterne med Bt sporer ikke medførte nævneværdige ændringer i deres tarmflora.

Diarré-toksiner kunne ikke måles i tarmen

Toksinindholdet i prøverne blev målt ved at se på prøvens evne til at slå dyrkede celler fra en abe (*Veroceller*) ihjel. Ved at se på prøver af den væske, som de rene bakterier havde vokset i, var det klart at de Bt celler, som bruges på spiselige afgrøder lavede mindre diarré-toksin end dem, der anvendes på pryddplanter, og mindre end *B. cereus*, som kan give kortvarig diarré hos mennesker. Da de ydre omgivelser kan have stor indflydelse på, hvor meget toksin der produceres, blev toksin indholdet i tarmprøverne også undersøgt. Det var dog så lavt, at toksinerne slet ikke kunne måles.

Hovedkonklusioner:

Bt sporer fra plantebeskyttelsesmidler spirer i mave-tarmkanalen

Resultaterne viser, at en del af Bt sporerne, som anvendes i plantebeskyttelsesmidler, uden tvivl spirer og danner vegetative bakterier i rotternes mave-tarmsystem. Varmebehandling øger ikke spiringen. Tilstedeværelsen af vegetative celler betyder at der er en risiko for at Bt fra plantebeskyttelsesmidler kan give diarré. Heldigvis viste resultaterne også, at der dannes mindre diarré-toksin fra de typer af Bt, som anvendes til bekæmpelse af insektlarver på spiselige afgrøder, end fra dem, som i Danmark kun bruges på pryddplanter. Faktisk var toksinmængden så lav, at den ikke kunne måles i tarmen. Det så heller ikke ud til, at Bt cellerne medførte væsentlige ændringer i sammensætningen af den omgivende tarmflora.

Samlet set betyder disse resultater, at det ikke kan udelukkes at plantebeskyttelsesmidler baseret på Bt kan forårsage diarré hos forbrugerne, og at det er vigtigt at undersøge mængden af toksindannelse, før man godkender nye Bt-baserede midler. Det kan også tages med i en samlet vurdering, at man ved at bruge Bt-midlerne sandsynligvis sparer natur og mennesker for de kemiske pesticider, som udgør alternativet.

I undersøgelserne blev Bt sammenlignet med den nært beslægtede bakterie *Bacillus cereus*, som ofte er årsag til madforgiftning. Denne bakterie gav ikke diarré hos rotterne, og det var ikke muligt at måle dannelse af diarré-toksin i prøver fra tarmen. Forsøg med rotter er i øjeblikket det primære redskab til at teste sikkerheden ved nye biologiske bekæmpelsesmidler, både i Danmark og i EU. Vores og andres resultater viser imidlertid at rotteforsøg ikke er den bedste metode til at afsløre sygdomsfremkaldende egenskaber hos en bakterie, og der foregår da også pt. overvejelser vedrørende dette i EU's organ til varetagelse af fødevarer sikkerhed (European Food Safety Authority). Man kan ved at basere risikovurderingen på andre metoder dels opnå en bedre forbrugersikkerhed, og dels spare nogle rotteliv.