

Mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidlers skæbne i mave-tarm kanalen

Studier af *Bacillus thuringiensis*

Andrea Wilcks og Tine Rask Licht
Danmarks Fødevareforskning

Bjarne Munk Hansen og Niels Bohse Hendriksen
Danmarks Miljøundersøgelser

Lasse Smidt og Lars Andrup,
Arbejdsmiljøinstituttet

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

INDHOLD	3
FORORD	5
SAMMENFATNING	7
SUMMARY	11
1 INDLEDNING	15
1.1 BAGGRUND	15
1.2 FORMÅL MED PROJEKTET	16
1.3 FREMGANGSMÅDE	17
1.4 RAPPORTENS OPBYGNING	17
2 MATERIALER OG METODER	19
2.1 ANVENDTE <i>BACILLUS CEREUS</i> OG <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> STAMMER	19
2.1.1 <i>Fremstilling af antibiotika-resistente stammer</i>	19
2.2 MÆRKNING AF BAKTERIER MED FLUORESCENS	20
2.3 DYREFORSØG	21
2.3.1 <i>Kimfri rotter</i>	21
2.3.2 <i>Human Flora Associerede (HFA) rotter</i>	21
2.3.3 <i>Udførte dyreforsøg</i>	21
2.4 UNDERSØGELSER AF EFFEKTER PÅ OMKRINGLIGGENDE FLORA	24
2.4.1 <i>Kimtællinger af fæces- og tarmprøver</i>	24
2.4.2 <i>Molekylær metode</i>	24
2.5 ENTEROTOKSIN ASSAYS	25
2.5.1 <i>Immunologisk detektion af HBL</i>	25
2.5.2 <i>Vero-celle assay</i>	25
2.5.3 <i>Bestemmelse af detektionsgrænsen i Vero-celle assay</i>	26
2.5.4 <i>Effekt af vækstbetingelser på Vero-toksiske substanser</i>	26
2.5.5 <i>Betydningen af sterilfiltrering for indholdet af Vero-toksiske substanser</i>	27
2.5.6 <i>Ekstraktion af potentielle Vero-toksiske substanser fra tarmprøver</i>	29
2.5.7 <i>Indflydelse af fæces på genfindelse af Vero-toksiske substanser</i>	29
3 RESULTATER	31
3.1 OVERLEVELSE OG SPIRING AF <i>BT</i> OG <i>B. CEREUS</i> CELLER I TARMEN	31
3.1.1 <i>Resultater fra HFA dyr</i>	31
3.1.2 <i>Overlevelse af sporer og vegetative celler i simuleret mavevæske</i>	36
3.1.3 <i>Bt subsp. israelensis i kimpfri dyr</i>	37
3.1.4 <i>Opsummering</i>	39
3.2 ÆNDRINGER AF DEN NORMALE TARMFLORA	39
3.2.1 <i>Kimtællinger af bakteriegrupper</i>	40
3.2.2 <i>Ændringer af tarmflora studeret vha. DGGE</i>	40
3.2.3 <i>Opsummering</i>	43

3.3	ENTEROTOKSINER I TARMEN	43
3.3.1	<i>Vero-toksiciteten af forskellige bakterier</i>	43
3.3.2	<i>Detektion af Vero-toksisk aktivitet i tarmprøver fra rotter</i>	44
3.3.3	<i>Opsummering</i>	45
3.4	OVERFØRSEL AF DNA MELLEM TO <i>BT</i> STAMMER I KIMFRI ROTTER	45
3.4.1	<i>Dyreforsøg med kimfri dyr</i>	45
3.4.2	<i>Opsummering</i>	47
4	DISKUSSION	49
4.1	OVERLEVELSE OG SPIRING I TARMEN	49
4.2	PÅVIRKNING AF DEN EKSISTERENDE BAKTERIEPOPULATION	50
4.3	DANNELSE AF ENTEROTOKSINER I TARMEN	51
4.4	OVERFØRSEL AF DNA I TARMEN	51
5	PERSPEKTIVER	53
5.1	ANBEFALINGER TIL MILJØSTYRELSEN VEDR. RISIKOVURDERING AF <i>BT</i> MIDLER	53
5.2	ANBEFALINGER TIL FREMTIDIG FORSKNINGSINDSAT	53
6	KONKLUSION	55
	REFERENCER	57

Bilag A

Forord

Denne rapport beskriver resultaterne opnået under projektet 'Mikrobiologiske Plantebeskyttelsesmidlers skæbne i mave-tarm kanalen', som er gennemført i perioden december 2003 til februar 2006. Projektet blev finansieret af Miljøstyrelsens program for bekæmpelsesmiddelforskning og havde til formål at undersøge bakterien *Bacillus thuringiensis* skæbne og effekt i en rottetarm som model for situationen i en menneskelig mave-tarm kanal.

Resultaterne er fremkommet ved et samarbejde mellem Danmarks Miljøundersøgelser (Bjarne Munk Hansen, Niels Bohse Hendriksen), Arbejdsmiljøinstituttet (Lasse Smidt, Lars Andrup) og Danmarks Fødevareforskning (Andrea Wilcks, Hanne Rosenquist, Tine Rask Licht).

Til projektet har der desuden været tilknyttet en følgegruppe, som takkes for gode råd og interesse gennem projektforløbet. Følgegruppen var sammensat af følgende personer: Jørn Kirkegaard, Anita Fjelsted, Marianne Serritzlev (alle tre Miljøstyrelsen), Jørgen Ejlenberg (Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole), Thomas Schneider (Arbejdsmiljøinstituttet), Jesper Lund-Larsen (Fagligt Fælles Forbund 3F), Kirsten Friis (Dansk Landbrugsrådgivning), Henrik Sivertsen (Dansk Erhvervsgartnerforening), Jesper Bælum (Odense Universitetshospital), Pia Sjelborg og Annie Enkegaard (begge Danmarks Jordbrugsforskning).

Udkast af rapporten har været gennemlæst af følgende referees: Anita Fjelsted, Gert Bolander, Jesper Bælum, Jesper Lund-Larsen og Jørgen Ejlenberg, som takkes for gode konstruktive kommentarer.

Sammenfatning

Plantebeskyttelsesmidler baseret på bakterien *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bruges i Danmark ved produktion af bl.a. tomater, agurker og potteplanter. Bakteriens toksiske effekt overfor insekter skyldes dannelsen af såkaldte δ -endotoksiner, som er giftige for visse insekter, men ufarlige for mennesker. Imidlertid producerer bakterien også enterotoksiner, som man kender fra madforgiftningsbakterien *Bacillus cereus*, og som kan give mennesker diarré.

Produkter baseret på *Bt* har været anvendt i flere årtier verden over uden at give erkendte problemer. Men da der er et øget krav til at reducere brugen af kemiske midler og da der er en stigende tendens til at spise rå eller let tilberedte grøntsager kan man forestille sig at der vil ske en større eksponering af forbrugerne for *Bt*, og dermed en øget risiko for eventuelle utilsigtede effekter af *Bt*.

Plantebeskyttelsesmidler baseret på *Bt* indeholder bakterien i form af sporer, som er en inaktiv (hvilende) og modstandsdygtig form af bakterien. Sporerne spirer til aktive celler i tarmen på de insekter de skal bekæmpe. Der har været en del diskussion om hvorvidt sporerne også er i stand til at spire i tarmen på pattedyr og mennesker efter indtagelse. Spore spiring og efterfølgende produktion af enterotoksiner vil kunne medføre en risiko for diarré hos forbrugere, der spiser grøntsager behandlet med *Bt* produkter. Hovedformålet med projektet var at afklare dette spørgsmål i en dyremodel. Dette formål blev undersøgt ved at teste følgende: 1) øger varmebehandling af *Bt* sporer deres evne til at spire i tarmen, 2) har *Bt* en effekt på sammensætningen af den omkringliggende tarmflora, 3) kan *Bt* danne enterotoksiner i tarmen, og 4) kan *Bt* overføre DNA til andre bakterier i tarmen?

Til at undersøge dette blev der brugt rotter med en tarmflora der ligner menneskers. Der blev lavet forsøg med en *B. cereus* stamme og to *Bt* stammer, der ligner de to *Bt* underarter, subsp. *kurstaki* og subsp. *israelensis*, der er tilladt på det danske marked. Endvidere blev der lavet forsøg med rotter uden tarmflora (kimfri rotter), der blev fodret med sporer af en *Bt* stamme, som fluorescerer grønt når cellerne er i vegetativ vækstfase. Forsøgene viste klart at *Bt* er i stand til at spire og gro i tarmen på kimfri rotter uden tilstedeværelse af en konkurrerende tarmflora. Også i rotter koloniseret med en mennesketarmflora blev der observeret spiring og vækst i nogle af dyrene. Varmebehandling af sporer før fodring til rotterne øgede i dette forsøg ikke spiring. Dette indikerer at varmebehandling (f.eks. ved tilberedning) af grøntsager sprøjtet med *Bt* produkter ikke øger risikoen for at sporerne spirer i tarmen på forbrugerne.

Selvom der blev observeret spiring i rotterne med en mennesketarmflora var bakterien forsvundet fra de fleste dyr to uger efter sidste fodring med bakterien. Der var dog ét dyr ud af seks doseret med *Bt* subsp. *kurstaki*, hvor stammen koloniserede tarmen, og i dette dyr sås også passage over mave-tarm barrieren til milten. Yderligere forskning er nødvendig for at klarlægge hvor stor risikoen er for at *Bt* invaderer via tarmen, og om dette kan ske hos mennesker.

En eventuel påvirkning af den omkringliggende tarmflora pga. fodring med *Bt* blev undersøgt både ved traditionel mikrobiologisk tælling på selektive plader og ved en molekylærbiologisk metode (denaturerende gradient gel elektroforese). Denne metode er baseret på analyse af et bestemt område af bakteriers kromosom, som vides at variere fra art til art. Disse variationer kan anvendes til at afgøre hvilke bakteriearter der er til stede. Dermed kan man lave en slags ”fingeraftryk” af bakteriepopulationen, som efterfølgende kan sammenlignes vha. computer analyse. Resultaterne viste, at fodring af rotterne med *Bt* sporer ikke medførte markante ændringer af tarmfloraen, og at de få ændringer der blev fundet ikke var permanente.

Ved brug af kimfri rotter fodret med sporer af to forskellige *Bt* stammer, blev der observeret udveksling af DNA mellem *Bt* stammerne i tarmen. Den ene stamme (donoren) indeholdt et såkaldt konjugativt plasmid, som blev overført til den anden *Bt* stamme (recipienten). Dette understøtter de førnævnte resultater vedr. spiring af sporer i mave-tarm kanalen. En sådan overførsel af et plasmid kan nemlig ikke ske mellem sporer, men kun mellem vegetative celler.

Udveksling af genetisk materiale mellem arter af *B. cereus* familien er velkendt i laboratoriet og er også observeret i tarmen på insekter, men det er første gang at en sådan udveksling er observeret i en mave-tarm kanal på et pattedyr. Ved sekventering af et *Bt* plasmid har man fundet stor lighed med andre plasmider fra *B. cereus* gruppen, samt plasmider fra andre Gram-positive bakterier, bl.a. bakterier naturligt forekommende i den menneskelige tarm. Denne lighed tyder på at der er sket udveksling af DNA i naturen, og et af miljøerne kunne være tarmen.

Desuden er en stammes evne til at overføre genetisk information til andre bakterier en vigtig faktor ved risikovurderingen af *Bt* midler. Hvis bakterien f.eks. er resistent overfor antibiotika, er det vigtigt at vide, hvorvidt denne resistens kan spredes til andre bakterier.

Toksinindholdet i prøverne blev målt ved at se på prøvernes evne til at dræbe dyrkede nyreceller fra en abe (Vero-celler). Ved at se på prøver af den væske, som de enkelte bakterier havde vokset i, var det klart at de *Bt* stammer, som bruges på spiselige afgrøder, producerede mindre toksin end de *Bt* stammer, der anvendes på potteplanter. Desuden lavede disse stammer en mindre mængde toksiner end en *B. cereus* stamme, der har været årsag til fødevareforgiftning.

Da de ydre omgivelser kan have stor indflydelse på, hvor meget toksin der produceres, blev toksinindholdet i tarmprøverne også undersøgt. Der kunne kun måles toksiner i et ud af seks kimfri dyr fodret med *Bt* subsp. *israelensis* (i lille mængde), mens der i prøver fra rotter med en menneskelig tarmflora fodret med *Bt* ikke kunne detekteres toksiner overhovedet. I undersøgelsen blev *Bt* sammenlignet med *B. cereus*, og heller ikke i dyr fodret med denne bakterie kunne der detekteres Vero-toksiske substanser eller observeres diarré hos rotterne. Forsøg med rotter er i øjeblikket det primære redskab til at teste sikkerheden ved nye biologiske bekæmpelsesmidler både i Danmark og i EU, men vores og andres resultater viser at dyreforsøg ikke altid er den bedste metode til at afsløre sygdomsfremkaldende egenskaber hos bakterier. Man kan

ved at basere risikovurderingen på andre metoder dels opnå en bedre forbrugersikkerhed, dels spare nogle dyreliv.

Ved risikovurdering af *Bt* baserede insekticider fremover anbefales det at man lægger større vægt på undersøgelser af toksicitet i *in vitro* assays (f.eks. PCR analyser for virulensgener, celle-assays), og mindre vægt på rotteforsøg. Denne undersøgelse viser dog at dyreforsøg er anvendelige til at undersøge bl.a. bakteriens evne til at kolonisere tarmen, påvirkning af den omkringliggende tarmflora og udveksling af DNA med andre bakterier.

Da stammer af samme art kan være helt forskellige, anbefales det at der anvendes en case-by-case vurdering af hver enkelt stamme, og understreges at det er vigtigt at tage hensyn til brugen af det endelige produkt – f.eks. sprøjtning af enten grøntsager eller pryddplanter. Denne undersøgelse viste f.eks. at *Bt* subsp. *israelensis* har høj cytotoxisk effekt, men da stammen i Danmark kun anvendes i forbindelse med produktion af potteplanter, er det næppe et problem for den almindelige forbruger, men kan være et arbejdsmiljø-problem.

Generelt giver denne undersøgelse ikke grund til øget bekymring omkring de midler, der er på markedet i dag. Selvom *Bt* subsp. *kurstaki* (som anvendes på grøntsager) kan spire i tarmen, danner stammen ikke høje koncentrationer af celle-dræbende toksiner. Dog kræver den observerede passage til milten flere studier af netop denne stamme for at klarlægge om en sådan passage også kan ske i mennesker.

Udover at almindelige forbrugere, kan gartneriarbejdere der sprøjter med *Bt*, også blive eksponeret for *Bt*. Selvom mange af resultaterne selvfølgelig også gælder for de ansatte har vi ikke specifikt kigget på evt. arbejdsmiljøproblemer. Denne problematik har været undersøgt i et tidligere projekt støttet af bl.a. Arbejdstilsynet [Jensen et al., 2001].

Summary

The bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is contained in plant protection products used in Denmark for e.g. the production of tomatoes, cucumbers and pot plants. *Bt* is toxic to insects due to the production of so-called δ -endotoxins that are harmless for humans. However, the bacterium also produces enterotoxins known from the food poisoning bacterium *Bacillus cereus*, a causative agent of diarrhoea.

Products based on *Bt* have been used worldwide for decades without resulting in identified problems. However, there is an increasing demand for substituting chemical insecticides with more environmental friendly ones, and at the same time there is an increasing tendency that vegetables are consumed raw or only briefly heat-treated. It is therefore likely that consumers will experience an increased exposure to *Bt* in the future.

Plant protection products based on *Bt* contain the spore-form of these bacteria, which is an inactive and very resistant form of the bacterium. The spores germinate to active cells in the gut of the insects, but it is unknown whether the spores also germinate in the human gastrointestinal tract. Germination of spores within the gastrointestinal tract could cause a risk of diarrhoea in consumers eating vegetables treated with *Bt* products. The main objective of this project was to clarify this question in an animal model. This objective was met by answering the following questions: 1) does heat treatment of *Bt* spores prior to ingestion increase their ability to germinate in the intestine, 2) can *Bt* cells effect the composition of the indigenous intestinal microbial population, 3) can *Bt* cells in the intestine produce enterotoxins, and 4) can *Bt* cells transfer genetic information to other bacteria in the intestine.

To answer these questions, rats with an intestinal microbiota derived from a human source were used. Animal experiments were performed with one *B. cereus* strain and two *Bt* strains, subsp. *kurstaki* and subsp. *israelensis*, both used on the Danish market. Additionally experiments were made with rats without an intestinal microflora (germ free rats) that were fed with spores of a *Bt* strain, which in vegetative phase was green fluorescent. The study showed clearly that spores germinate and grow in the intestine of germ free rats without the presence of an indigenous microbiota. Also in rats with a human microflora germination and growth was observed in some animals. Heat treatment of spores prior to feeding to the rats did not increase their tendency for germination. This may indicate that heat treatment (e.g. by cooking) of vegetables sprayed with *Bt* does not increase the risk for germination of the bacteria in the gut of the consumer.

Even though germination was observed in the rats with a human microflora, two weeks after last dosing with *Bt* most of the rats did not harbour any *Bt* cells in their intestines. However, there was one animal fed with *Bt* subsp. *Kurstaki* in which the strain colonised the gastrointestinal tract, and in this animal penetration of the gastrointestinal barrier was observed, and the strain

was recovered from the spleen. Further research is needed to clarify the risk for humans of *Bt* to reach other organs.

A possible effect on the indigenous bacterial population in the gut by *Bt* was studied using both traditional selective cultivation and a molecular biology method (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE). DGGE is based on variations in a certain region of the chromosome of bacteria. Those variations can be used to determine which bacteria are present in a population. Specific “fingerprints” can be obtained from each population and compared by computer analysis. The study showed that feeding of rats with *Bt* spores did not result in major changes in the composition of the microflora, and that the minor effects observed were merely transient.

Transfer of DNA between two isogenic *Bt* strains was observed using germ free rats fed with spores of the two strains. The donor strain harboured a so-called conjugative plasmid that was transferred to the recipient. This transfer supports the abovementioned results regarding germination of spores in the gastro-intestinal tract, since transfer can occur only between vegetative cells, and not between spores.

Exchange of DNA between members of the *B. cereus* family is a common phenomenon observed under laboratory conditions and also in the gut of insects. However, this is the first time that such transfer has been studied and observed in a mammalian gastrointestinal tract. The sequence of a *Bt* plasmid has shown high similarity to other plasmids from the *B. cereus* group and to plasmids from other Gram-positive bacteria, e.g. bacteria naturally present in a human gastrointestinal tract. This similarity indicates that exchange of DNA has happened in nature, and that one of the environments may be the gut.

Furthermore, the ability of a strain to transfer genetic information is relevant in risk assessment of products based on *Bt*. When dealing e.g. with a bacterium resistant to an antibiotic, it is important to know whether the resistance is intrinsic and non-transferable or acquired and transferable.

The production of cytotoxic agents (including enterotoxins) was measured by the ability of the samples to kill monkey kidney-cells (Vero cells). By testing the supernatant that the bacteria had grown in, it was clear that *Bt* subsp. *kurstaki* used on eatable crops produced less toxin than *Bt* subsp. *israelensis* used on pot plants. Furthermore subsp. *kurstaki* produced less toxin than a *B. cereus* strain that has been involved in a food poisoning case.

Intestinal samples from the animals fed with either *B. cereus* or one of the two *Bt* strains were also tested for the presence of enterotoxins. Enterotoxins were only detected in one animal out of six germ free rats fed spores of *Bt* subsp. *israelensis*, and only in small amounts. In the samples from the rats with a human derived microflora no cytotoxic effect could be detected. Not even in the animals fed the *B. cereus* strain previously involved in an outbreak of food poisoning. Experiments with rats are currently the number one tool when testing the human safety of new biological plant protection agents in Denmark as well as in the EU. However our results (and those of others) show that rat exposure is not the best method to reveal human relevant pathogenic traits in bacteria, and there is currently a debate in the EU for new risk assessment procedures of bacteria. By basing the risk assessment on other methods it is

possible to get a better safety for the consumer as well as to spare a number of rats.

In risk assessment of plant protection products based on *Bt* in the future it is recommended to place more impact on the toxicity of the strains in *in vitro* assays (e.g. PCR analysis against toxin-genes, cell-assays), and less impact on animal experiments. Nevertheless this study shows that animal experiments are useful when studying e.g. the ability of a strain to colonise the gastrointestinal tract, the effect of a strain on the indigenous microflora, and the capacity of a strain to transfer DNA to other bacteria in the gut.

By risk assessment of *Bt* based products it is recommended to use a case-by-case approach, since strains of the same species can be very different, and with emphasis on the application of the products into consideration – e.g. whether they are used for vegetables or pot plants. This study showed e.g. that *Bt* subsp. *israelensis* had high cytotoxic effects in the Vero-celle assay, however since products based on this strain are only used in Denmark on pot plants, this is not a concern for the consumer – but could however be an occupational health problem.

On the whole, this study does not give rise to increased concern about the products currently on the Danish market. Even though *Bt* subsp. *kurstaki* (used on vegetables) can germinate in the gastro-intestinal tract, the strain does not have high cytotoxic effects. However the observed passage to the spleen of this strain warrants further studies of this subspecies.

Besides the consumer, also greenhouse workers spraying with *Bt*, could be exposed to *Bt*. Many of the results in this project also applies for those worker, although this project has not specific dealt with occupational health problems. This issue was investigated in an earlier study financed by Arbejdstilsynet [Jensen et al., 2001]

1 Indledning

1.1 Baggrund

Bakterien *Bacillus thuringiensis* (i det følgende kaldet *Bt*) er den aktive bakterie i mange produkter til biologisk bekæmpelse af insekter. Bakterien anvendes bl.a. til bekæmpelse af malariamyg og i Danmark i plantebeskyttelsesmidler til produktion af bl.a. tomater, agurker og potteplanter. Bakterien indgår i ca. 50 % af sådanne produkter på det danske marked, og udgør ca. 90% af alle produkter til mikrobiel bekæmpelse af skadedyr på verdensplan [Hansen et al., 1996; Hendriksen and Binnerup, 1997]. Desuden er insekticider baseret på nye underarter af *Bt* med andre anvendelsesmuligheder under konstant udvikling verden over [Feitelson et al., 1992].

Bt er giftig for visse insektlarver, fordi den danner specifikke, insektdræbende toksiner (såkaldte δ -endotoksiner eller krystal-toksiner) [Hofte and Whiteley, 1989], som anses for at være uskadelige for mennesker. Bortset fra denne egenskab er *Bt* ikke til at skelne fra den fødevarebårne sygdomsfremkaldende bakterie *Bacillus cereus*. Bakterien *B. cereus* kan give anledning til fødevareforgiftning ved at bakterien indtages i sporeform med maden og efterfølgende spirer og vokser i tyndtarm, hvor der dannes såkaldte enterotoksiner, som kan give diarre [Granum and Lund, 1997]. Det har vist sig at *Bt* kan danne de samme enterotoksiner som *B. cereus*, og dette gælder også for de stammer der anvendes i kommercielle plantebeskyttelsesmidler. Da der ved sygdomstilfælde med *B. cereus* lignende organismer ikke skelnes mellem *Bt* og *B. cereus* kan det således ikke udelukkes at en del af de infektioner der tilskrives *B. cereus*, kan skyldes *Bt*.

Tre enterotoksiner er beskrevet i litteraturen: det hæmolytiske enterotoksin hæmolysin BL (HBL), det ikke-hæmolytiske enterotoxin (NHE) og cytolysin K (CytK). De stammer af *Bt*, som er undersøgt i projektet, har alle generne for disse toksiner, og for HBL og NHE vides det endvidere at de udtrykkes under laboratorieforhold. Ekspressionen af generne (dvs. produktionen af toksin) kan imidlertid være reguleret af mange faktorer i bakteriernes omgivelser, og man ved ikke, om *Bt* stammerne danner disse toksiner i tarmen hos dyr og mennesker, eller i givet fald hvor store mængder, de er i stand til at lave.

Bakterier i slægten *Bacillus* danner som et led i deres overlevelsesstrategi sporer, som er inaktive og meget overlevelsesdygtige enheder, der indeholder bakteriens genetiske information, og derudover det minimum af komponenter, som er nødvendigt for at sporen kan spire – dvs. gendanne en ny bakterie. Plantebeskyttelsesmidler der indeholder *Bt* er baseret på sporer af disse bakterier, der som hovedregel ikke vil spire på plantens overflade, men først udvikle vegetative bakterier i tarmen på de insekter, de skal bekæmpe. Mennesker, der spiser planteafgrøder behandlet med disse midler vil derfor først og fremmest indtage *Bt* sporer, og ikke vegetative celler. Da det er kendt, at opvarmning inducerer spiring af *Bacillus* sporer, kan man forestille sig at

varmebehandling (under tilberedning) af mad, der indeholder *Bt* sporer, vil øge sandsynligheden for at sporerne spirer i den humane mave-tarm kanal.

Den naturlige tarmflora hos mennesker spiller en vigtig rolle både i beskyttelsen mod infektioner, og i omsætning af næringsstoffer. Det er derfor af stor vigtighed for en sundhedsmæssig risikovurdering at undersøge, om indtagelsen af *Bt* sporer påvirker sammensætningen af den øvrige tarmflora. En sandsynlig forudsætning for en sådan påvirkning, og en absolut forudsætning for at *Bt* kan danne enterotoksiner i menneskets tarm er, at sporerne spirer efter indtagelse. Der er imidlertid modstridende opfattelser af, om dette er tilfældet. Nogle studier indikerer, at *B. cereus* sporer passerer uændrede gennem mave-tarmkanalen hos mus [Spinosa et al., 2000], medens andre viser, at bestemte underarter af *B. cereus* undergår både spiring og ny sporulering i tarmindehold fra kyllinger og smågrise [Adamus et al., 2001].

I fremtiden kan man forestille sig en øget eksponering af befolkningen af *Bt* da 1) der er et øget krav til at reducere brugen af kemiske midler, 2) markedet for økologiske grøntsager, hvor brugen af *Bt* tilladt i særlige tilfælde (<http://www.plantedir.dk/>), er i vækst, 3) import af store mængder frugt og grønt produceret i lande hvor *Bt* produkter anvendes og 4) der er en stigende tendens til at grøntsager konsumeres rå eller kun let tilberedte. Så selvom *Bt* midler har en "long history of safe use" kan man forestille sig at den øgede eksponering øger risikoen for en evt. negativ effekt af netop disse midler. Det er derfor nødvendigt at øge opmærksomheden omkring den sundhedsmæssige effekt af *Bt* baserede insekticider efter oral indtagelse. Vigtige parametre i vurderingen af den sundhedsmæssige effekt af mikroorganismer, som indtages af mennesker, er organismernes evne til at overleve/kolonisere i mave-tarmkanalen, deres evne til at danne sygdomsfremkaldende toksiner i tarmen og deres eventuelle effekt på den øvrige mikrobielle flora i tarmen.

I projektet har vi valgt at kigge nærmere på to stammer af *Bt*, som er tilladte på det danske marked. *Bt* subsp. *kurstaki*, som er aktiv overfor insekter af slægten *Lepidoptera*, og bl.a. anvendes til produktion af væksthushavregroder såsom tomater, agurker og peberfrugter. *Bt* subsp. *israelensis* er virksom overfor insekter af slægten *Diptera*, og er i Danmark kun tilladt til produktion af potteplanter (<http://www.mst.dk>).

1.2 Formål med projektet

Projektets formål var at eftervise følgende hypoteser, der alle vedrører den sundhedsmæssige effekt ved oral indtagelse af mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler baseret på *Bt* subsp. *israelensis* og subsp. *kurstaki*.

- Sporer af *Bt* spirer under passagen gennem mave-tarm kanalen, og kan efterfølgende etableres i tarmen
- Varmerbehandling af sporerne før indtagelse øger evnen til spiring i tarmen
- *Bt* celler i tarmen kan påvirke sammensætningen af den omkringliggende mikrobielle tarmpopulation
- *Bt* celler i tarmen kan producere sygdomsfremkaldende enterotoksiner

- *Bt* celler kan overføre genetisk information til andre bakterier i tarmen

1.3 Fremgangsmåde

Det er kendetegnende for *Bacillus*, at der er meget stor variation både mellem arterne, og mellem subspecies (underarter) af den enkelte art. Observationer vedrørende en enkelt underart kan derfor ikke nødvendigvis generaliseres til at gælde for hele arten. De plantebeskyttelsesmidler, der p.t. forhandles på det danske marked er imidlertid baseret på kun to forskellige subspecies af *Bacillus thuringiensis*. Produkterne Vectobac® og Bactimos® indeholder *Bt* subsp. *israelensis*, medens produktet Dipel® er baseret på *Bt* subsp. *kurstaki*. Derfor er det disse to subspecies, vi har valgt at undersøge i projektet. Derudover har vi brugt en *B. cereus* stamme, der har været årsag til fødevareforgiftning, som ”positiv kontrol” på enterotoksinproduktion.

Som model for den humane tarm har vi valgt human-flora-associerede (HFA) rotter, som er så tæt på forholdene i en menneskelig mavetarmkanal som det er muligt at opnå i en dyremodel [Hirayama and Itoh, 2005]. Ved at bruge denne model har vi undersøgt hvad der sker efter dosering med *Bt* enten indgivet som (i) ubehandlede sporer, (ii) varme-behandlede sporer og (iii) vegetative celler. Derudover har vi anvendt kimfri rotter, dvs. rotter uden tarmflora, til at undersøge spiring, overførsel af DNA og enterotoksinproduktion. Dette er en ”worst-case” model, hvor det er muligt at undersøge enkelte bakterier i højere koncentration end det ofte er tilfældet i en tarm med en etableret tarmflora.

1.4 Rapportens opbygning

Materiale- og metodeafsnit indeholder en overordnet gennemgang af de anvendte materialer og metoder. En mere udførlig og teknisk gennemgang af materialer og metoder kan findes i bilag A. Resultatafsnittet består af fire afsnit, som på tværs af de anvendte bakteriestammer giver resultaterne af 1) overlevelse og spiring af stammerne i tarmen hos både HFA og kimfri rotter, 2) effekt på øvrig bakterieflora i tarmen, 3) produktion af enterotoksiner, samt et afsnit om 4) overførsel af DNA fra *Bt* til andre bakterier i tarmen. Der er blevet udført en del indledende forsøg med optimering af enterotoksin assays. Resultaterne herfra er indgående beskrevet i kapitlet Materialer og Metoder, hvorimod resultater med brug af assayet på bestemte bakteriestammer samt tarmprøver er givet i resultatafsnittet. Ligeledes er selve fremstillingen af en ”grøn” *Bt* stamme beskrevet i Materialer og Metoder, mens resultater fra dyreforsøget med stammen er refereret i resultatafsnittet. Til rapporten hører bilag A, som udover de førnævnte bilag (materialer og metoder), indeholder mere udførlige data, samt en liste over formidling relateret til projektet og den ene videnskabelige artikel, der indtil videre er publiceret i projektet.

2 Materialer og metoder

I det følgende er der en overordnet gennemgang af de valgte materialer og metoder. En mere udførlig fagteknisk beskrivelse kan findes i bilag A.

2.1 Anvendte *Bacillus cereus* og *Bacillus thuringiensis* stammer

Til dyreforsøgene har vi arbejdet med tre forskellige stammer fra *Bacillus cereus* gruppen, en *B. cereus* og to *Bt* stammer, derudover er yderligere tre stammer blevet testet i Vero-celle assay (Tabel 1). *B. cereus* F4433/73 blev udvalgt som positiv kontrol for enterotoksinproduktion. Denne stamme er isoleret fra et udbrud af fødevareforgiftning [Melling et al., 1976] og producerer enterotoksiner i store mængder [Damgaard, 1995; Granum et al., 1993]. De to *Bt* stammer er identiske med de kommercielle stammer i produkterne Dipel[®], Bactimos[®], og Vectobac[®]. Alle tre produkter er lovligt at bruge i Danmark som plantebeskyttelsesmidler (<http://www.mst.dk/>). *Bt* subsp. *kurstaki* DMU67R er blevet isoleret fra miljøet [Pedersen et al., 1995], og kan ved forskellige molekylære teknikker ikke skelnes fra den *Bt* subsp. *kurstaki* HD1 stamme som anvendes i plantebeskyttelsesmidlet Dipel[®]. Ligeledes er den anvendte *Bt* subsp. *israelensis* HD567 identisk med de stammer der findes i de kommercielle produkter Bactimos[®] og Vectobac[®].

Tabel 1. Oversigt over anvendte *Bt* stammer.

Stamme	Karakteristika
<i>B. cereus</i> F4433/73	Har været årsag til fødevareforgiftning
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> DMU67	Identisk med HD1, som er til stede i produktet Dipel [®] . Toksisk overfor insekter af slægten <i>Lepidoptera</i> .
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> HD567	Identisk med de kommercielle stammer i Bactimos [®] og Vectobac [®] . Toksisk overfor insekter af slægten <i>Diptera</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD1	Kommerciel stamme
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> NB125	Kommerciel stamme, toksisk overfor insekter af slægten <i>Coleoptera</i> . Ikke tilladt i Danmark
<i>B. cereus</i> BCIP 5832	Probiotisk stamme

2.1.1 Fremstilling af antibiotika-resistente stammer

For at kunne genfinde de anvendte stammer mellem de øvrige bakterier i tarmen, var det nødvendigt at bruge stammer der var resistente overfor antibiotika. Der blev opnået spontane rifampicin resistente mutanter af *B. cereus* F4433/73 og *Bt* subsp. *kurstaki* DMU67. Rifampicin resistens er sjælden blandt bakterier fra en normal tarmflora og derfor velegnet til at skelne de tilsatte *B. cereus* og *Bt* bakterier fra resten af floraen. Det var ikke muligt at gøre *Bt* subsp. *israelensis* HD567 stammen resistent overfor rifampicin da

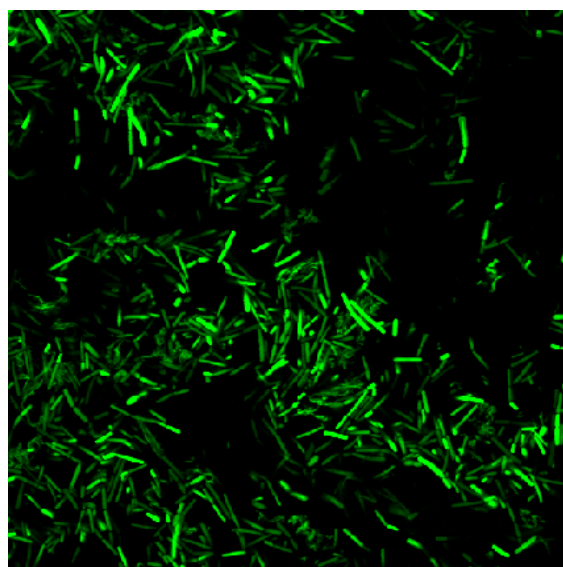
dette ødelagde stammens sporuleringsevne, så denne stamme var derfor streptomycin-resistent.

2.2 Mærkning af bakterier med fluorescens

Gener, der koder for fluorescerende proteiner, eksempelvis Green Fluorescent Protein (GFP) fra goblen *Aequorea victoria* er stærke redskaber til at visualisere bakterier og/eller plasmidoverførsel mellem bakterier [Christensen et al., 1998; Normander et al., 1998].

I projektet har vi udnyttet dette til fremstilling af grøn-fluorescerende bakterier (se Figur 1). Bakterierne blev gjort grønne ved at indsætte et plasmid (et cirkulært stykke DNA), som indeholder et *gfp* gen. Genet udtrykker GFP proteinet, som bliver konstant udtrykt under vækst, altså når cellerne er vegetative. Derimod vil sporerne ikke lyse, da de er ”i dvale”. To forskellige plasmider (pAD43-25 og pAD44-12) konstrueret af amerikanske forskere [Dunn and Handelsman, 1999] er blevet brugt. Skelettet (plasmid pAD123) af disse to plasmider kan ses i Bilag A og består af to replikons, så plasmidet er i stand til at blive opretholdt i både en Gram-negativ vært (f.eks. *Escherichia coli*) og en Gram-positiv vært (f.eks. *Bacillus*). Derudover indeholder plasmidet et gen der giver resistens overfor ampicillin og som virker i *E. coli* og et gen der giver resistens overfor kloramfenikol, som kan bruges som markør i *Bacillus*. Endelig indeholder pAD123 genet kodende for GFP, som dog kun bliver udtrykt såfremt der er en promotor foran genet, som det er tilfældet i de to anvendte plasmider pAD43-25 og pAD44-12. De to plasmider blev indsat i både *Bt* subsp. *kurstaki* og subsp. *israelensis* og testet under fluorescensmikroskopi. Den kombination der gav det bedste signal var *Bt* subsp. *israelensis* indeholdende plasmid pAD44-12 (Figur 1), og denne konstruktion blev derfor udvalgt til dyreforsøget med kimplerter.

Til detektion af grønne vegetative celler i tarmen på rotterne har vi benyttet flow-cytometri, som er en meget følsom metode til at detektere og tælle fluorescerende bakterier. Flowcytometri af prøverne er blevet udført på Københavns Universitet af phd.-studerende Martin Iain Bahl.



Figur 1. *Bt* bakterier mærket med GFP (grønfluorescerende protein).

2.3 Dyreforsøg

2.3.1 Kimfri rotter

DFVF har mange års erfaring med avl og håndtering af kinfri rotter, som ikke har en tarmflora. Dyrene købes fra Taconic i USA og holdes i specielle sterile isolatorer, hvor luften der indblæses til dyrene også er steril. Ind- og udsugning af prøver foregår sterilt via en sluse, og dyrene går på steril strøelse og får sterilt foder og vand. Disse dyr er velegnede til at teste enkelte bakterier da det ofte er muligt at kolonisere tarmen på dyrene med høje koncentrationer af den bakterie man vil undersøge.

Ulempen ved at anvende kinfri rotter er at man ikke kan undersøge effekten af og på den omkringliggende flora. Derudover er der andre fysiologiske forskelle mellem kinfri og konventionelle dyr, der kan have en indflydelse på de bakterier man undersøger.

2.3.2 Human Flora Associerede (HFA) rotter

HFA rotter er dyr, som oprindeligt er kinfri, og som derefter oralt indgives en opløsning af human fæces, sådan at de humane tarmbakterier etableres i rotternes tarm. Dyrene holdes i hele forsøgsperioden sterile på samme måde som de kinfri dyr. HFA dyr er det tætteste man kan komme på en menneskelig tarmfloramodel.

2.3.3 Udførte dyreforsøg

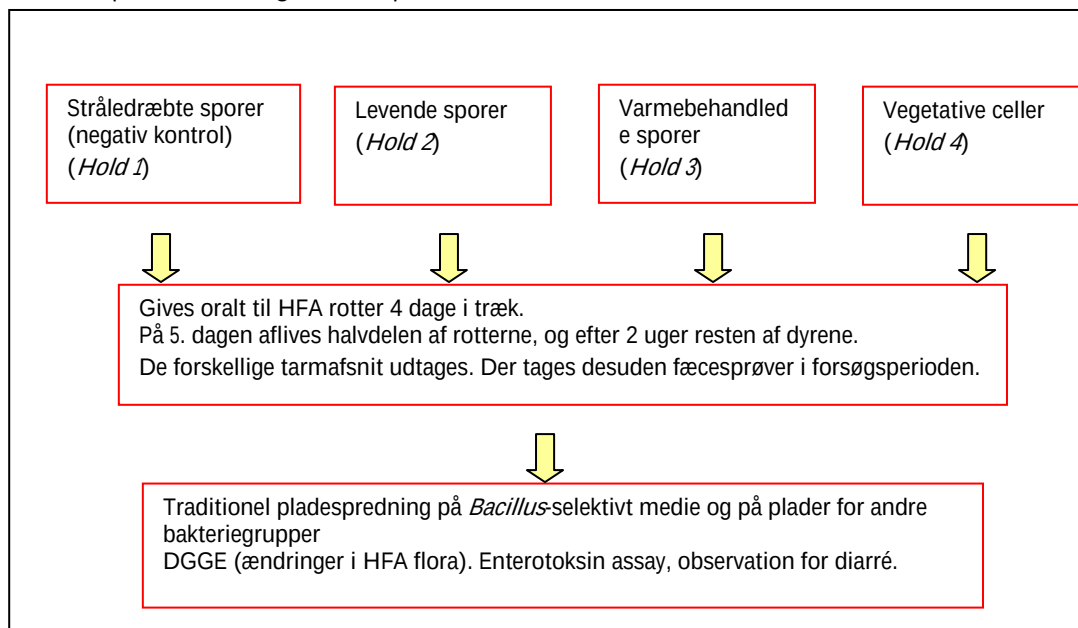
Projektet omfatter to større dyreforsøg, kaldet A og B, beskrevet i flowdiagrammerne nedenfor. Forsøg A blev udført som tre delforsøg (A1, A2 og A3) med HFA rotter med en *B. cereus* stamme og to stammer af *Bt*. Dyreforsøg B blev udført med kinfri rotter og *Bt* subsp. *israelensis* mærket med et grøn-fluorescerende protein.

DYREFORSØG A (2004):

Forsøget blev udført som tre separate forsøg med hver sin stamme A1: *B. cereus* F4433/73, A2: *Bt subsp. kurstaki* og A3: *Bt subsp. israelensis*). Dyrene blev inddelt i fire hold, som blev doseret (dvs. fodret) med henholdsvis: 1) stråledræbte sporer, 2) ubehandlede sporer, 3) varmebehandlede sporer (80°C, 15 min) og 4) vegetative celler (Figur 2). Fremstillingen af de enkelte bakteriesuspensioner kan findes i Bilag A. Formålet med forsøgene var at:

1. undersøge overlevelse og spiring af sporer i tarmen
2. undersøge om der er forskel på ubehandlede og varmebehandlede sporer mht. til overlevelse og spiring
3. undersøge en evt. forskel i overlevelse af sporer og vegetative celler i tarmen
4. undersøge hvorvidt dosering med *B. cereus* og *Bt* kan ændre sammensætningen af den omkringliggende tarmflora
5. undersøge hvorvidt der kan detekteres enterotoksiner i tarmen

Figur 2. Dyreforsøg A blev udført som tre separate forsøg med *B. cereus*, *Bt* subsp. *kurstaki* og *Bt* subsp. *israelensis*.



DYREFORSØG B (2005):

Dyreforsøg B blev udført med kimfri rotter, da resultater fra dyreforsøg A viste, at *Bt* koloniserer tarmen på HFA rotter til et niveau af ca. 10^6 bakterier pr. gram fæces. Dette lave niveau ville gøre det svært at detektere spirede grøn-fluorescerende bakterier, enterotoksinproduktion og en eventuel genoverførsel fra *Bt* (donorcelle) til en udvalgt recipientstamme, hvilket var formålet med dette forsøg.

Ved at anvende kimfri dyr opnås følgende fordele:

- En forventet højere kolonisering af *Bt* i tarmen med en deraf følgende forventet højere mængde transkonjuganter (recipientceller der har modtaget DNA fra donor cellen) og/eller spirede bakterier som derfor bliver lettere at detektere.
- Fravær af den omgivende flora vil i sig selv forenkle detektion og nedsætte detektionsgrænsen, idet kun de bakterier, der er relevante for forsøget, er til stede i prøverne.

Ulempen ved at anvende kimfri dyr i stedet for HFA dyr er, at en eventuel effekt af den omgivende mikrobielle flora på spiring og/eller enterotoksinproduktion og/eller genoverførsel ikke vil fremgå af forsøget.

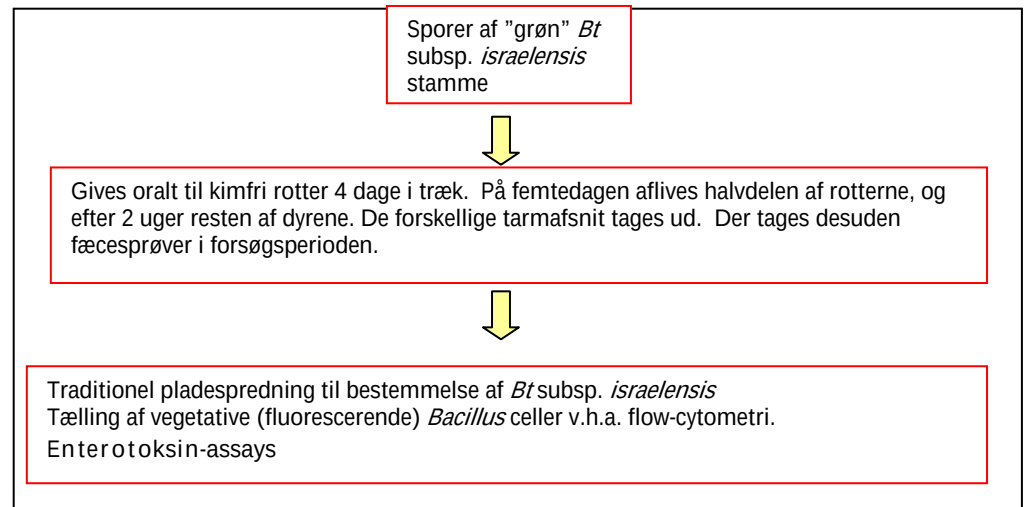
Dyreforsøg B blev udført som to delforsøg. I delforsøg B1 (Figur 3) anvendte vi den grøn-fluorescerende stamme af *Bt* subsp. *israelensis*. Dyrene blev kun doseret med ubehandlede sporer af stammen, da dyreforsøg A viste at varmebehandling af sporerne inden dosering ingen indflydelse har på overlevelse og spiring. I delforsøg B2 (Figur 4) blev dyrene først doseret med en recipientstamme, der er isogen med donor-stammen og som i reagensglas har vist sig at være i stand til at modtage det overførbare plasmid pXO16. Efter en uge blev der doseret med donor-stammen, indeholdende pXO16,

som er et naturligt forekommende overførbart plasmid fra *Bt* subsp. *israelensis*. For at være i stand til at detektere overførsel af plasmidet til recipient-stammen benyttede vi en variant af pXO16 som var mærket med et tetracyklinresistensgen.

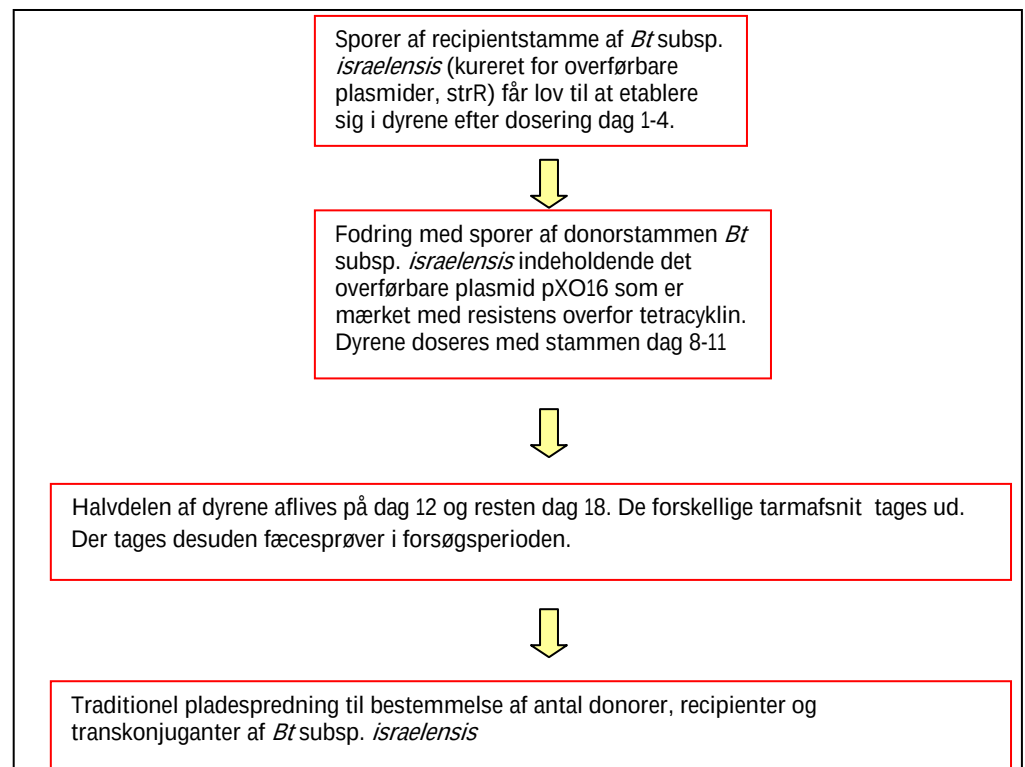
Formålet med forsøget var at:

1. undersøge spiring af sporerne v.h.a. GFP og flow-cytometri
2. undersøge om eventuelle vegetative celler danner detektbare enterotoksiner
3. undersøge hvorvidt *Bt* er i stand til at overføre genetisk materiale i tarmen, hvilket i sig selv er en indikation på at sporerne har spiret

Figur 3. Dyreforsøg B1.



Figur 4. Dyreforsøg B2.



2.4 Undersøgelser af effekter på omkringliggende flora

2.4.1 Kimtællinger af fæces- og tarmprøver

Fæces- og tarmprøver fra dyreforsøg A blev fortyndet i fysiologisk saltvand og udpladet på forskellige selektive næringsmedier for at tælle antallet af bakterier i de største bakteriegrupper i den omkringliggende tarmflora, samt de doserede bakterier (*B. cereus* og *Bt*), som beskrevet i Tabel 2.

For at kunne skelne de tilsatte *B. cereus* og *Bt* fra den omkringliggende flora blev der anvendt et kommercielt Bacillus Cereus Selektivt Agar (Oxoid) tilsat det antibiotikum som stammen er resistent overfor. Forsøg viste at den anvendte humane fæces-flora ikke indeholdt andre *B. cereus* -lignende bakterier end dem der blev givet til dyrene.

Tabel 2. Medier til tælling af de forskellige undersøgte bakteriegrupper.

Bakterie gruppe	Medium	Inkubering
<i>B. cereus</i>	Bacillus Cereus Selective Agar (BCSA)* (Oxoid)	30°C, aerobt, 24 timer
<i>B. cereus</i> F4433/73 <i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> DMU67R	Do. Indeholdende 50 µg/ml rifampicin	
<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i>	BCSA + 100 µg/ml streptomycin	
Total aerobe bakterier	Reinforced Clostridial Agar (Oxoid)	37°C, aerobt, 72 timer
Total anaerobe bakterier		37°C, anaerobt, 72 timer
Laktobaciller	Rogosa agar (Oxoid)	
Koliforme	MacConkey Agar no. 3 (Oxoid)	37°C, aerobt, 24 timer
Enterokokker	Slanetz & Bartley Medium (Oxoid)	37°C, aerobt, 48 timer

*Bacillus Cereus Selective Agar Base tilsat Bacillus Cereus Selective Supplement (Oxoid) og Egg Yolk Emulsion (Oxoid).

2.4.2 Molekylær metode

Da størstedelen af bakterierne i tarmen ikke kan dyrkes konventionelt, har vi anvendt *Denaturing Gradient Gel Elektroforese* (DGGE), som er en forholdsvis ny metode til monitorering af ændringer i komplekse, mikrobielle økosystemer uden forudgående dyrkning [Muyzer and Smalla, 1998].

DNA fra fæces/tarmindhold blev oprenset, hvorefter det blev opformeret ved PCR (Polymerase Chain Reaction), en udførlig beskrivelse af metoden kan findes i Bilag A. Primerne til PCR er rettet mod generne for 16S ribosomalt RNA, og man kan vælge enten specifikke PCR-primere, der opformerer en given taksonomisk gruppe af bakterier, eller generelle primere, der opformerer rRNA fra den totale bakterie-population. I projektet er der blevet benyttet både generelle primere og specifikke primere til at kigge på ændringer i flg. bakteriepopulationer: laktobaciller, bifidobakterier og bacteroides sp. (Bilag A).

PCR produkterne blev separeret på en denaturerende, elektroforetisk gradient gel (Bilag A). Gelen indeholdt en lineært stigende gradient af en blanding af urinstof og formamid. DNA molekyler med forskellige sekvenser vil "smelte" (dele sig i to strenge) ved forskellige koncentrationer af urinstof og formamid. Idet der er en aftagende elektroforetisk bevægelighed af delvist smeltede DNA molekyler, vil DNA med forskellige sekvenser standse deres vandring ved forskellige positioner i gradient-gelen. Selv ganske små forskelle i sekvens vil give anledning til ændringer på gelen.

Gelmønstret giver en slags 'fingeraftryk' af bakteriepopulationens sammensætning, som vil ændres, hvis der sker større ændringer i populationen. Mønstrene blev efterfølgende analyseret ved hjælp af specialiseret software (BioNumerics). Endvidere var det muligt at identificere de bakterie-grupper der giver anledning til de forskellige bånd på gradient-gelen ved at skære båndene ud af gelen, oprense DNA herfra, bestemme dets sekvens og sammenligne med kendte sekvenser i forskellige databaser (Bilag A).

2.5 Enterotoksin assays

Bakterier i *B. cereus* gruppen kan producere det hæmolytiske enterotoksin hæmolysin BL (BHL), det non-hæmolytiske enterotoksin (NHE), cytolsin K (CytK), samt en række andre produkter og enzymer, som alle kan være medvirkende til at fremkalde sygdom hos mennesker. De stammer af *Bt*, som blev undersøgt i projektet, har generne for disse produkter, og det vides at de udtrykkes under optimale betingelser i laboratoriet. Ekspressionen af generne (dvs. produktionen af toksin) kan imidlertid være reguleret af mange faktorer i bakteriernes omgivelser, og man ved ikke, om *Bt* stammerne danner disse toksiner i tarmen hos dyr og mennesker, eller i givet fald hvor store mængder, de er i stand til at lave. Produktion af enterotoksin blev undersøgt både vha. et kommercielt kit og vha. celle-assay.

2.5.1 Immunologisk detektion af HBL

Det kommercielle BCET-RPLA kit fra Oxoid blev brugt til at detektere enterotoksin HBL. Kittet detekterer L2 komponenten fra HBL, og har en meget lav detektionsgrænse på 2 ng toksin per ml. Enterotoksinet HBL består, ligesom enterotoksinet NHE, af tre komponenter som alle tre skal udtrykkes for at toksinet er fuldt virulent. Derfor er det ikke nok at benytte dette kit til bestemmelse af en *Bt* stammes virulens, og af den grund har vi også brugt celle-assay som beskrevet i næste afsnit.

2.5.2 Vero-celle assay

Udover de kendte toksiner, som *Bt* producerer, er der sandsynligvis også nogle, som vi endnu ikke kender og som kan være giftige for mennesker. Desuden kan man forestille sig at toksiciteten overfor mennesker ikke skyldes enkeltprodukter, men blandinger af forskellige produkter. Til detektion af en eventuel toksisk effekt af sådanne produkter på mennesker er det en fordel at anvende et test-system som ligner de menneskelige forhold så meget som muligt. Her har vi valgt at anvende en såkaldt Vero-cellelinie (dyrkede nyreceller fra grøn afrikansk abe, som vides at være følsomme overfor diverse

enterotoksiner) til påvisning af cytotoxisk aktivitet i tarmindehold og/eller fæcesprøver fra HFA rotter, som har indtaget *Bt*.

Der laves en række fortyndinger af prøverne, som skal undersøges for toksinindhold, og disse sættes på en Elisa plade, som indeholder de levende Vero-celler. Efter en inkubationsperiode tilsættes et rødt tetrazolium salt, som af levende Vero-celler omdannes til et gult formazan salt. Mængden af gult salt, der dannes over en given periode er derfor et mål for antallet af levende Vero-celler. Jo mere cytotoxisk aktivitet, der er i prøverne, jo færre levende Vero-celler vil der være tilbage og jo mindre gul vil farven i brøndene i Elisa pladen være. Konkret defineres cytotoxiciteten af prøven som den laveste fortyndingsfaktor, der resulterer i mere end 50% overlevelse af Vero-cellerne. Vero-cellernes 50% aktivitet bestemmes ved at inkludere en gradient med et forskelligt antal Vero-celler på alle Elisa pladerne.

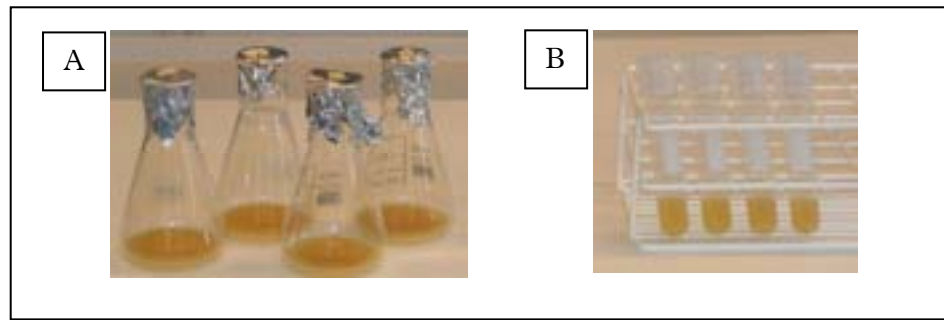
2.5.3 Bestemmelse af detektionsgrænsen i Vero-celle assay

Antallet af bakterier i en 6 timers kultur blev bestemt og forskellige fortyndingsrækker blev fremstillet. Detektionsgrænsen blev bestemt som antallet af bakterier i den fortyndingsrække som tillod mere end 50% af Vero-cellerne at overleve. Antallet af *B. cereus* F4433/73 i en 6 timers kultur, som havde en Vero-toksisk aktivitet på 160 (dvs. kulturen skulle fortyndes 160 gange for at få mere end 50% overlevelse af Vero-cellerne), var $1,8 \times 10^7$ bakterier per ml kultur. Da den laveste realistiske fortyndingsfaktor er en 10 gange fortynding, som er 16 gange lavere den observerede fortyndingsfaktor for *B. cereus* F4433/73, kan detektionsgrænsen for Vero-toksisk aktivitet blive bestemt til 10^6 bakterier per ml kultur. Dette er dog et groft skøn idet produktionen af Vero-toksiske substanser afhænger af forskellige faktorer såsom alderen af kulturen og vækstraten. Toksiciteten studeret i kultur-alder eksperimentet (se nedenfor) viste at unge kulturer kan producere store mængder af Vero-toksiske substanser.

2.5.4 Effekt af vækstbetingelser på Vero-toksiske substanser

Tidligere undersøgelser har indikeret at bakteriernes vækstbetingelser kan have indflydelse på bakteriens Vero-toksicitet. Aktiviteten af en ung og en gammel kultur var reduceret i forhold til en "midaldrende" kultur og (vækstmedie volumen/kolbe volumen) ratioen havde også en betydning for Vero-toksiciteten. To vækstbetingelser blev undersøgt for at bestemme effekten af "volumen ratio". *B. cereus* F4433/73R blev dyrket i 20 ml medium enten i 250 ml kolbe eller i 2 ml medium i 14 ml rør.

Når *B. cereus* F4433/73 blev dyrket i 20 ml BHIG i 250 ml kolbe ved 32°C og 271 rpm (rounds per minute) i seks timer, var Vero-toksiciteten kun 20, mens toksiciteten var 160 når bakterien blev dyrket i 2 ml BHIG i et 14 ml rør (se Figur 5). Alle dyrkninger blev herefter udført i 14 ml rør med 2 ml BHIG.



Figur 5. A: 250 ml kolber med 20 ml BHIG. B: 14 ml rør med 2 ml BHIG.

Ved at tage prøver ud til forskellige tidspunkter viste det sig at *B. cereus* F4433/73 ikke producerede detekterbare Vero-toksiske substanser i de første 2 timer efter ompodning af en udvokset kultur. Vero-toksiciteten var 80 efter 3, 4 og 5 timers inkubering. Toksiciteten nåede 160 efter 6 timer og dette niveau holdt sig også efter 8 timers inkubering. Baseret på dette, blev alle kulturer herefter høstet efter 6 timer.

2.5.5 Betydningen af sterilfiltrering for indholdet af Vero-toksiske substanser

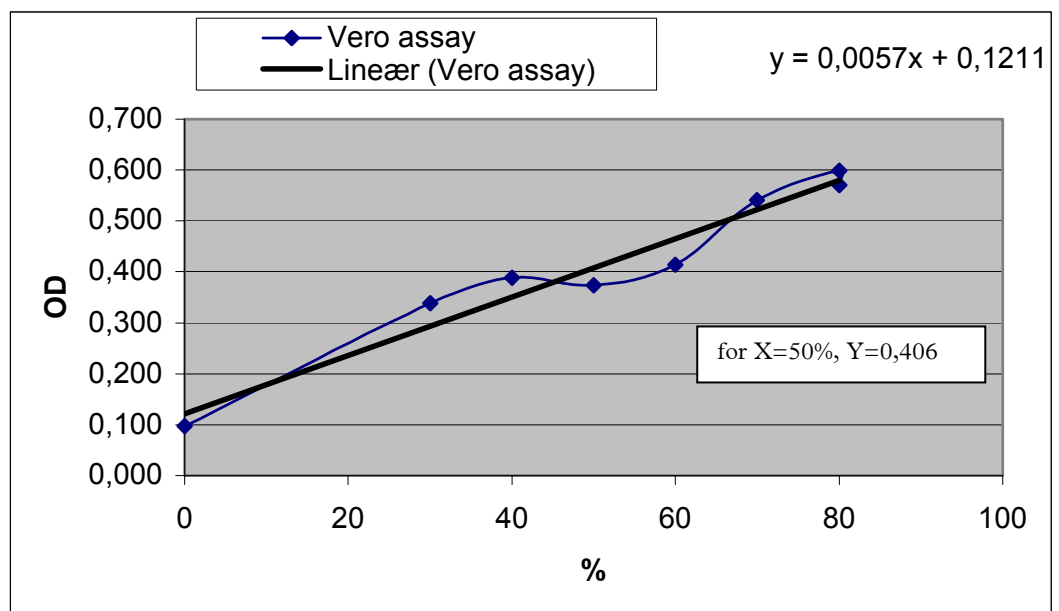
For at være sikker på at steril-filtrering af fæces- og tarmprøver med "low protein binding" filtre ikke binder store mængder af enterotoksiner under filtrering blev fortyndinger af *B. cereus* F4433/73 med og uden sterilfiltrering sammenlignet i et Vero-celle assay. Resultaterne viste at steril-filtrering ikke havde indflydelse på Vero-celle assayet (Figur 6). Forsøget viste endvidere at der ikke skete forurening af Vero-celle assayet selvom prøverne ikke blev sterilfiltreret. Dette betyder at en centrifugering ved 20.000 g var nok til at fjerne mikroorganismer, og at antibiotika tilsat Vero-celle vækstmediet er nok til at hæmme evt. tilbageværende mikroorganismer. Konsekvensen af denne observation, blev at sterilfiltrering kunne udelades i forsøgene, hvilket betød at sensitiviteten blev fordoblet, siden kun 1 ml 0,85% NaCl per gram tarmprøve var nødvendig og tab af ekstrakt under sterilfiltrering blev undgået.

A

	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Bc F4433 /73	Vero- celle gradi- ent	Vero- celle gradi- ent	Bt 407 δP _{IC} R
	Positi v kontr ol*	Uforty ndet	Uforty ndet	Fortyn det 10X	Fortyn det 10X	Fortyn det 20X	Fortyn det 20X	Fortyn det 40X	Fortyn det 40X			Negat iv kontro l*
		Filtrer et		Filtrer et		Filtrer et		Filtrer et		80 til 0%	80 til 0%	
2x	0,240	0,172	0,195	0,194	0,162	0,210	0,189	0,493	0,636	0,643	0,498	0,639
4x	0,214	0,203	0,200	0,136	0,141	0,486	0,425	0,696	0,765	0,620	0,577	0,682
8x	0,156	0,216	0,172	0,324	0,311	0,477	0,524	0,664	0,735	0,598	0,483	0,751
16x	0,182	0,156	0,130	0,392	0,366	0,493	0,551	0,536	0,670	0,427	0,401	0,766
32x	0,532	0,193	0,207	0,736	0,776	0,864	0,899	0,807	0,707	0,361	0,387	0,782
64x	0,652	0,518	0,485	0,814	0,787	0,860	0,812	0,779	0,801	0,474	0,302	0,738
128x	0,730	0,588	0,562	0,782	0,778	0,741	0,749	0,767	0,740	0,358	0,319	0,764
256x	0,717	0,684	0,605	0,685	0,637	0,700	0,663	0,715	0,662	0,089	0,106	0,764

* De to kontrolekstrakter blev fortyndet 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 og 1280 gange (modsat testprøverne som blev fortyndet 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 og 256 gange).

B



Figur 6. Vero-celle assay til undersøgelse af effekten af sterilfiltrering. A: Datafilen viser OD (optical density) værdien ved 200 min fratrullet værdien ved tiden 0 min. Det røde område indikerer fortyndinger hvor mere end 50% af cellerne er dræbt af *B. cereus* F4433/73 toksin. B: Udregning af OD værdi svarende til 50% overlevelse af Vero-celler, som i denne plade blev beregnet til 0,406.

2.5.6 Ekstraktion af potentielle Vero-toksiske substanser fra tarmprøver

Siden prøverne fra tarmprøverne skulle analyseres både vha. celle-assay og det immunologiske RPLA-BCET assay, skulle ekstraktionsproceduren være anvendelig til begge protokoller. I RPLA metoden ekstraheres toksinet med 0,85% NaCl opløsning, og denne ekstraktionsmetode blev benyttet. Efter at tarmprøverne blev taget fra dyrene blev de holdt koldt (-80°C) indtil analyse. Der blev tilsat 1 ml 0,85% NaCl per gram tarmprøve, og alle ekstraktionsprocedurer blev udført ved 0-4°C. Tørre fæcesprøver blev rehydreret i 2 timer inden ekstraktion. Alle prøver blev homogeniseret i Eppendorfrør efterfulgt af 10 min centrifugering ved 15.000 x g, og opbevaret ved -80°C inden analyse.

2.5.7 Indflydelse af fæces på genfindelse af Vero-toksiske substanser

Tarmen indeholder en del hydrolytisk aktivitet, som kan inaktivere *B. cereus* toksinerne. For at undersøge denne aktivitet blev fæces fra kimfri rotter blandet med Vero-toksisk kulturekstrakt. Desuden blev effekten af fæces og 0,85% NaCl på den Vero-toksiske aktivitet testet i ni forskellige kombinationer (Tabel 3). Fæces fra kimfri dyr havde i sig selv ingen toksisk effekt på Vero-celler, og ligeledes havde fæces ingen negativ effekt på detektion af Vero-toksisk effekt af kulturekstrakter fra *B. cereus* F4433/73.

Tabel 3. Kombinationer af fæces, NaCl, BHIG og kulturekstrakt for at undersøge effekten af forskellige faktorer på den Vero-toksiske aktivitet.

Kombinationer	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fæces opløst i 0,85% NaCl	+	+		+		+			
0,85% NaCl	+		+		+		+		
BHIG		+	+						
Kulturekstrakt fra <i>B. cereus</i> F4433/73				+	+			+	
Kulturekstrakt fra <i>Bt</i> 407 δ PlcR						+	+		+

3 Resultater

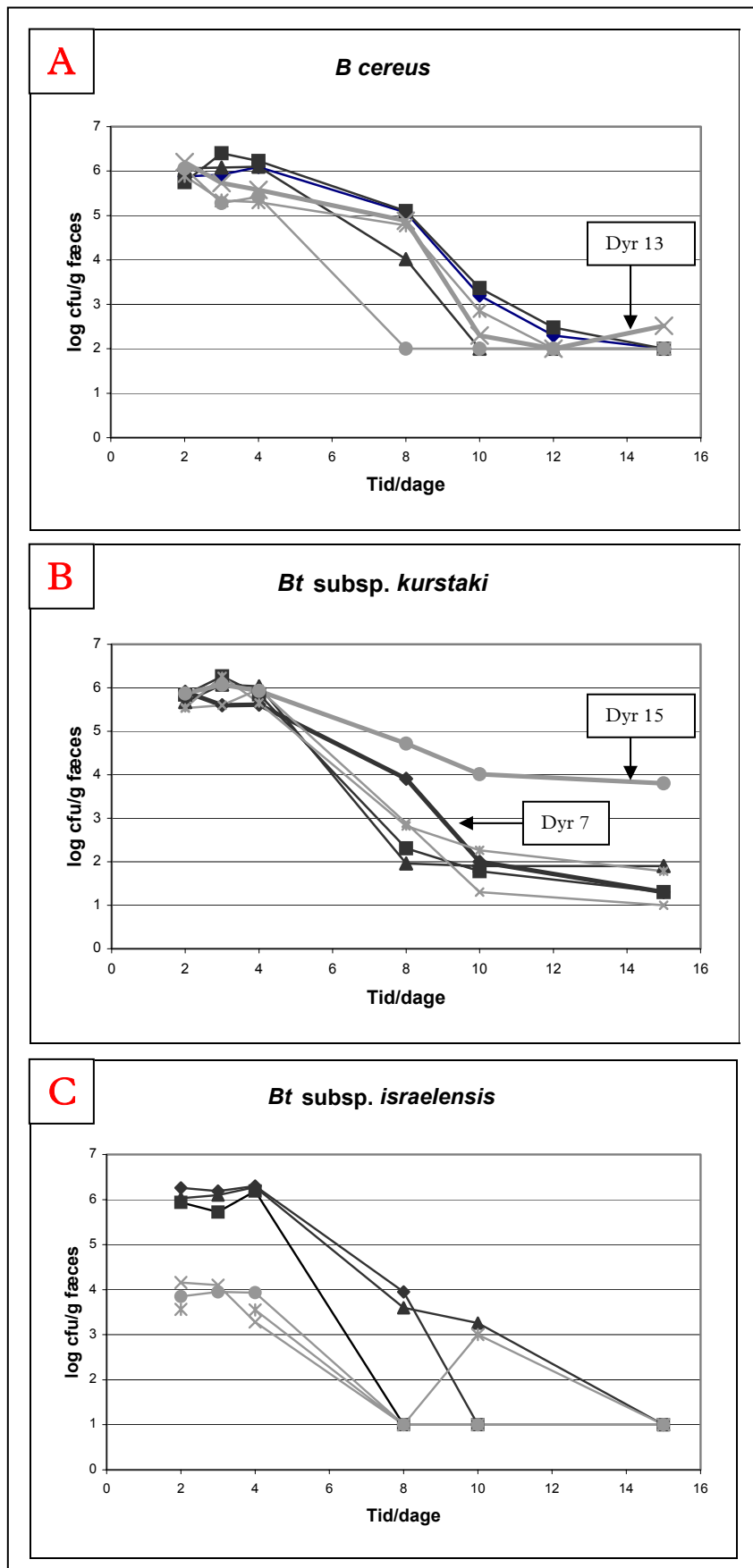
3.1 Overlevelse og spiring af *Bt* og *B. cereus* celler i tarmen

3.1.1 Resultater fra HFA dyr

Kimfri rotter blev først fodret med en human fæces-opslæmning, som fik lov til at etablere sig i rotterne i tre uger, hvorefter dyrene blev fodret med enten *B. cereus*, *Bt* subsp. *kurstaki* eller *Bt* subsp. *israelensis* i tre separate forsøg. I hvert forsøg blev dyrene inddelt i fire hold som fik hhv. stråledræbte sporer (*Hold 1*), ubehandlede sporer (*Hold 2*), varme-aktiverede sporer (*Hold 3*) og vegetative celler (*Hold 4*), se også Figur 2. Dyrene blev fodret med de enkelte bakteriesuspensioner fire dage i træk, halvdelen af dyrene blev aflivet på femtedagen og resten af dyrene to uger efter. Fæces- og tarmprøver blev undersøgt for indholdet af *Bt* og *B. cereus* ved at udplade på selektive plader.

3.1.1.1 Genfindelse af *Bt* og *B. cereus* i fæces

Som forventet, blev der i ingen af de dyr der blev fodret med stråledræbte sporer (negativ kontrol) detekteret *B. cereus* lignende bakterier i fæces- eller tarmprøver. I de dyr der fik vegetative celler genfindes ingen eller kun få *B. cereus* lignende bakterier, dette skyldes formodentlig at de vegetative celler inaktiveres i mavesyren (se afsnit 4.1.2). Nedenstående figurer (Figur 7) viser antallet af de tre undersøgte stammer i fæces i de dyr, der fik levende sporer (*Hold 2* og *Hold 3*). Som det ses af figurerne er der ingen forskel på ubehandlede (*Hold 2*) og varmebehandlede (*Hold 3*) sporer mht. genfindelse af stammerne i fæces. Forskellen mellem holdene som ses i de dyr der blev fodret med *Bt* subsp. *israelensis* skyldes en forskel i doseringen mellem holdene. *Hold 3* blev fodret med ca. 10^6 varmebehandlede sporer, mens *Hold 2* fik ca. 10^8 ubehandlede sporer. Dyrene i de to andre forsøg (*B. cereus* og *Bt* subsp. *kurstaki*) fik ligeledes ca. 10^8 bakterier i både *Hold 2* og *Hold 3*. Dyrene blev doseret dag 1-4 (begge dage inkl.) og man ser tydeligt at antallet af *B. cereus* lignende bakterier er størst i den første uge (ca. 10^6 cfu/g fæces). Derefter falder antallet, dog med meget stor variation mellem dyrene. I forsøget med *B. cereus* F4433/73 er der et dyr hvor bakterien kan genfindes to uger efter sidste dosering, mens det gælder for fem ud af seks dyr i forsøget med *Bt* subsp. *kurstaki*, denne forskel kan skyldes forskel i detektionsgrænse mellem de to forsøg (100 hhv. 10 cfu/g fæces) (Figur 7). I et af dyrene fodret med *Bt* subsp. *kurstaki* (dyr 15) er koncentrationen af stammen meget højere end de andre dyr i fæces 2 uger efter sidste dosering (Figur 7). I forsøget med *Bt* subsp. *israelensis* kunne bakterien ikke detekteres i dyrenes fæces to uger efter sidste dosering.

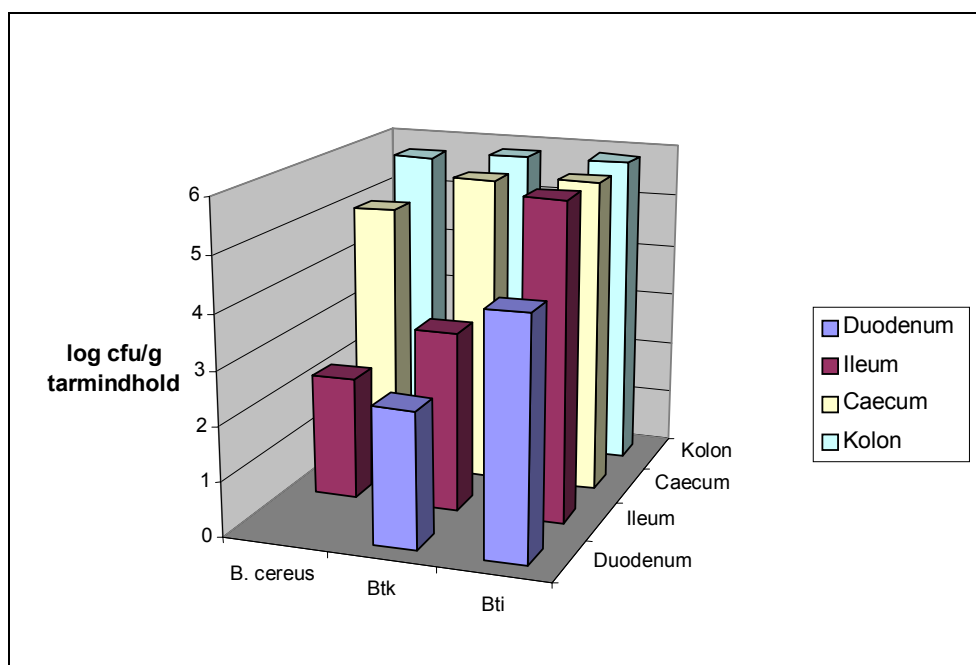


Figur 7. Genfindelse af hhv. *B. cereus* (A), *Bt subsp. kurstaki* (B) og *Bt subsp. israelensis* (C) i fæces fra individuelle dyr doseret dag 1-4 med ubehandlede sporer (sort, *Hold 2*) og varmebehandlede sporer (grå, *Hold 3*). Der blev udført tre separate forsøg, et med hver af de tre førnævnte stammer.

3.1.1.2 Genfindelse af stammer i tarmprøver og organer

Halvdelen af dyrene fra hvert hold blev aflivet på femtedagen efter at have fået enten *B. cereus*, *Bt* subsp. *kurstaki* eller *Bt* subsp. *israelensis* fire dage i træk. De resterende dyr blev aflivet to uger efter sidste dosering. Prøver blev taget ud fra følgende tarmafsnit: duodenum (øvre tyndtarm), ileum (nedre tyndtarm), caecum (blindtarm) og kolon (tyktarm).

Antallet af genfundne bakterier af de tre stammer fra dyr der blev fodret med ca. 10^8 ubehandlede sporer (*Hold 2*) ved den første aflivning kan ses i Figur 8 (se også mere udførlige data i Tabel 4). Antallet af de tre stammer i caecum og kolon er ens, hvorimod der er stor forskel på genfindelse af de tre stammer i tyndtarmsprøverne. Dyrene der blev doseret med sporer af *Bt* subsp. *israelensis* skiller sig ud ved at have en langt højere koncentration af bakterier i tyndtarmen. Det samme gælder hvis man kigger på dyr fra *Hold 3*, fodret med varmebehandlede sporer (Tabel 4). På trods af at dyr fodret med *Bt* subsp. *israelensis* blev fodret med 100 gange færre sporer end dyr der fik *B. cereus* og *Bt* subsp. *kurstaki*, havde dyrene en højere koncentration i ileum (Tabel 4).



Figur 8. Samlet figur der viser antallet af hhv. *B. cereus*, *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk*) og *Bt* subsp. *israelensis* (*Bti*) i de tre forsøg. Tallene stammer fra de dyr der blev doseret med ubehandlede sporer (*Hold 2*). Detektionsgrænsen var 10^2 cfu/g tarmindhold for *B. cereus* og *Btk*, og 10^3 cfu/g tarmindhold for *Bti*.

Ved aflivning af dyr to uger efter sidste dosering genfandtes kun få eller ingen af de tilsatte stammer i tarmprøverne fra dyrene. I dyr fodret med *B. cereus* fandtes stammen kun i kolon fra et dyr doseret med varmebehandlede sporer og overraskende i de nedre tarmafsnit fra et dyr fodret med vegetative celler (Tabel 5).

I dyr fodret med levende sporer af *Bt* subsp. *kurstaki* genfandtes stammen i flere tarmafsnit to uger efter sidste dosering. Og ligesom dyr 15 havde en meget højere koncentration af stammen i fæces (Figur 7B), ligeledes havde dette dyr en meget højere koncentration af *Bt* subsp. *kurstaki* end de andre dyr (Figur 9).

Vi fandt ingen *Bt* subsp. *israelensis* stammer i de dyr der blev doseret med denne stamme, og dette er i overensstemmelse med resultaterne fra fæcesprøverne.

Tabel 4. Genfindelse af *B. cereus* og de to anvendte *Bt* stammer i de forskellige tarmafsnit ved aflivning på Dag 5.

Tarmafsnit	Koncentration af <i>B. cereus</i> og <i>Bt</i> (log cfu/g tarmindehold)								
	<i>B. cereus</i>			<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i>			<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i>		
	Hold 2	Hold 3	Hold 4	Hold 2	Hold 3	Hold 4	Hold 2	Hold 3	Hold 4
Duodenum	<*	2,00 (1/3)	<	2,49±0,47	2,64 (1/3)	<	4,36±0,34	1,60 (1/3)	<
Ileum	2,30 (1/3) ^a	1,98±0,45	<	3,32±0,25	2,60±0,96	<	5,85±0,27	2,96±0,59	<
Caecum	5,02±0,18	5,14±0,49	<	5,70±0,12	5,31±0,14	1,30 (1/3)	5,79±0,06	3,47±0,51	<
Kolon	5,70±0,09	5,45±0,06	<	5,82±0,13	5,73±0,17	1,43±0,38	5,84±0,07	3,44±0,60	<

* < Indikerer at antallet af bakterier er under detektionsgrænsen (10 cfu/g tarmindehold).

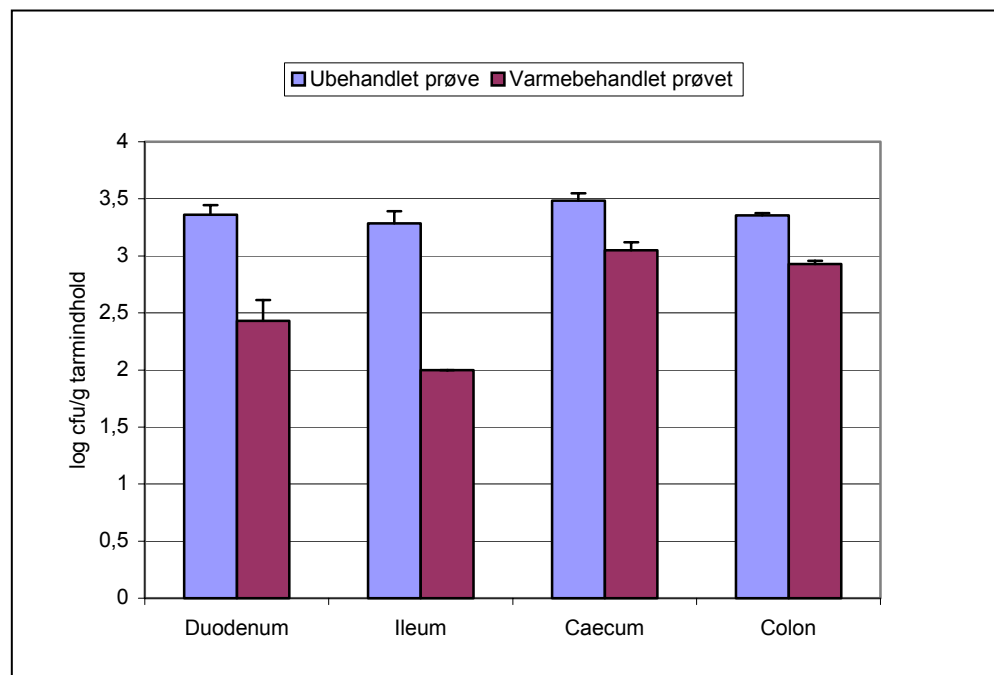
^a Tallet i parentes viser hvor mange dyr der var positive ud af tre, hvis dette afviger fra tre.

Tabel 5. Antallet af *B. cereus* og *Bt* subsp. *kurstaki* i tarmprøver fra HFA rotter doseret med hhv. ubehandlede sporer, varmebehandlede sporer og vegetative celler ved sidste aflivning (Dag 18).

Tarmprøve	Koncentration af <i>B. cereus</i> og <i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> (log cfu g ⁻¹ tarmindehold)					
	<i>B. cereus</i>			<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i>		
	Ubehandlede sporer (Hold 2)	Varmebehandlede sporer (Hold 3)	Vegetative celler (Hold 4)	Ubehandlede sporer (Hold 2)	Varmebehandlede sporer (Hold 3)	Vegetative celler (Hold 4)
Duodenum	<	<	<	<	2,53±1,31 (2/3)	<
Ileum	<	<	<	<	3,39 (1/3)	<
Caecum	<	<	1,36 (1/3)	1,30 (1/3)	2,11±1,15	<
Kolon	<	2,83 (1/3)	1,85 (1/3)	1,43±0,38	2,64±0,91 (2/3)	<

* < Indikerer at antallet af celler er under detektionsgrænsen (10 cfu/g tarmindehold)

[†] Tallet i parentes viser hvor mange dyr der var positive ud af tre.



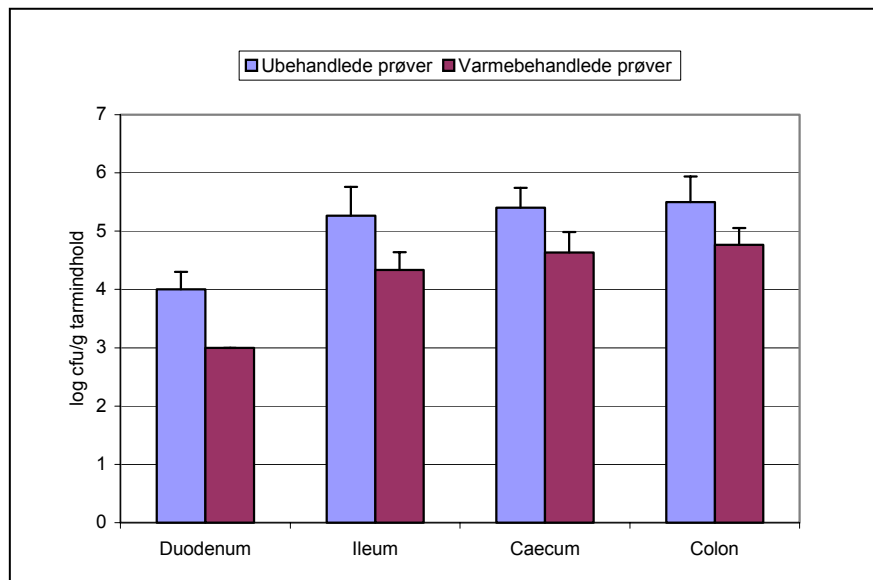
Figur 9. Antallet af *Bt* subsp. *kurstaki* i dyr 15 doseret med varmebehandlede sporer af stammen. Derudover ses effekten af varmebehandling af tarmprøverne på antallet af bakterier. Varmebehandling dræber de vegetative celler, så det der tælles i prøven efter varmebehandling, er antallet af sporer. Hvorimod tælling af prøven uden varmebehandling angiver det totale antal bakterier, både sporer og vegetative celler. Forsøget blev udført to gange.

I forsøgene med de to *Bt* stammer blev der endvidere udtaget milt og lever fra dyrene og undersøgt for indhold af de tilsatte *Bt* stammer. Der blev kun fundet en positiv prøve, nemlig dyr 15 fra forsøget med *Bt* subsp. *kurstaki*. Dette dyr havde højere koncentration af stammen i både fæces og tarm (se forrige afsnit) og der blev fundet *Bt* subsp. *kurstaki* celler i milten.

3.1.1.3 Spirer sporerne i tarmen på HFA rotter?

I enkelte dyr viste udpladninger fra fæces (Figur 7) at sporerne må have spiret i tarmen. F.eks. dyr 13 doseret med varmebehandlede *B. cereus* sporer viste i slutningen af forsøgsperioden en stigning i antallet af bakterier i dyret, tydende på at der er sket spiring og vækst i mave-tarm kanalen på dette dyr. Et andet meget tydeligt eksempel er dyr 15 (fodret med varmebehandlede *Bt* subsp. *kurstaki* sporer), hvor der var en meget højere koncentration af bakterierne i både fæces og tarm end de andre dyr. Desuden viste varmebehandling (som dræber de vegetative celler) af tarmprøver fra dette dyr, at i tyndtarm var ca. 90% af bakterierne i vegetativ fase (Figur 9), mens de længere nede i tarmen igen havde sporuleret og dannet sporer. Dvs. at i dette dyr har *Bt* subsp. *kurstaki* haft en hel vækstcyklus fra spiring af sporen til vegetative celler, vækst af vegetative celler og igen sporulering af de vegetative celler til sporer.

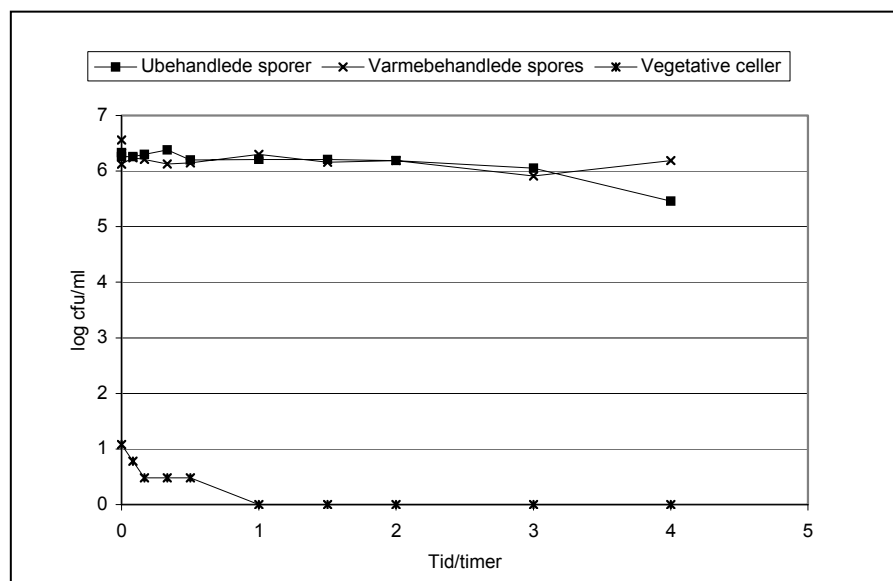
Varmebehandling af tarmprøver fra første aflivning af dyr fodret med ubehandlede sporer af *Bt* subsp. *israelensis* viste også at sporerne var spiret i tarmen (Figur 10), da antallet af bakterier bliver reduceret efter varmebehandling, dvs. der er vegetative celler til stede i prøverne, der bliver dræbt under varmebehandlingen.



Figur 10. Tarmprøver fra dyr doseret med *Bt* subsp. *israelensis* sporer blev talt både før og efter varmebehandling. Tallet (log cfu/g tarmindhold) før varmebehandling giver det totale antal bakterier, sporer og vegetative celler, mens tallet efter varmebehandling angiver antallet af sporer i prøven, da de vegetative celler bliver dræbt af varmebehandlingen.

3.1.2 Overlevelse af sporer og vegetative celler i simuleret mavevæske

Da forsøgene viste at i dyr doseret med vegetative celler kunne de doserede stammer ikke genfindes, blev der lavet forsøg med overlevelse af bakterierne i simuleret mavevæske (SGF, *simulated gastric fluid*). Figur 11 viser at de vegetative celler hurtigt bliver inaktiveret i SGF, hvorimod både ubehandlede og varmebehandlede sporer har en god overlevelse. Dette understøtter resultaterne fra dyreforsøget med HFA rotter hvor ingen eller kun få bakterier kunne genfindes efter dosering med vegetative celler.



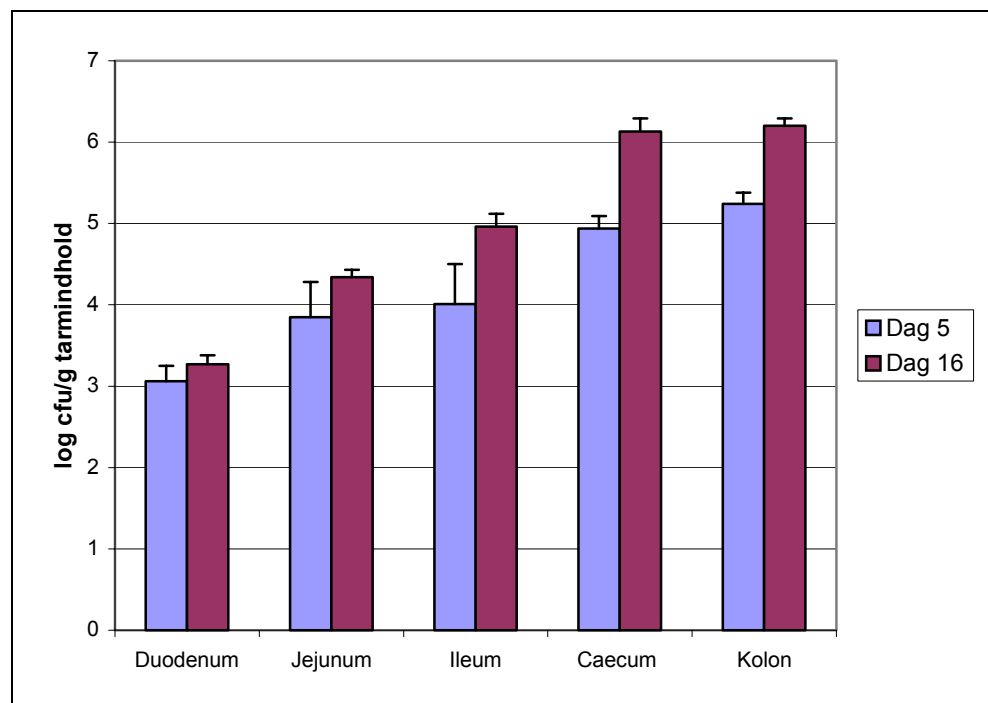
Figur 11. Stabilitet af sporer og vegetative celler af *B. cereus* F4433/73 i simuleret mavevæske ved pH 1.5.

3.1.3 *Bt* subsp. *israelensis* i kimfri dyr

Kimfri dyr blev fodret med en *Bt* subsp. *israelensis* stamme, som havde fået indsat et plasmid med et *gfp* gen, som får bakterien til at lyse grønt i vegetativ fase. Dyrene blev kun doseret med ubehandlede sporer, da de forrige forsøg viste at vegetative celler ikke overlever i mavesyren og der ikke var forskel på ubehandlede og varmebehandlede sporer.

Dyrene blev doseret fire dage i træk med ca. 10^7 sporer af *Bt* subsp. *israelensis*, dagen efter blev halvdelen af dyrene aflivet og de resterende dyr efter to uger.

Bt subsp. *israelensis* blev opretholdt stabilt i dyrene i hele forsøgsperioden på ca. 10^6 cfu/g fæces, og der sås ingen nedgang i antallet af bakterier som i forsøgene med HFA dyrene, så *Bt* klarer sig bedre i kimfri rotter uden en naturlig tarmflora (data ikke vist). Også tarmprøverne (Figur 12) viste at *Bt* subsp. *israelensis* har etableret sig i dyrene.



Figur 12. Antallet af *Bt* subsp. *israelensis* i tarmen fra kimfri dyr efter aflivning på hhv. dag 5 og dag 16.

3.1.3.1 Spirer sporerne i tarmen på kimfri rotter?

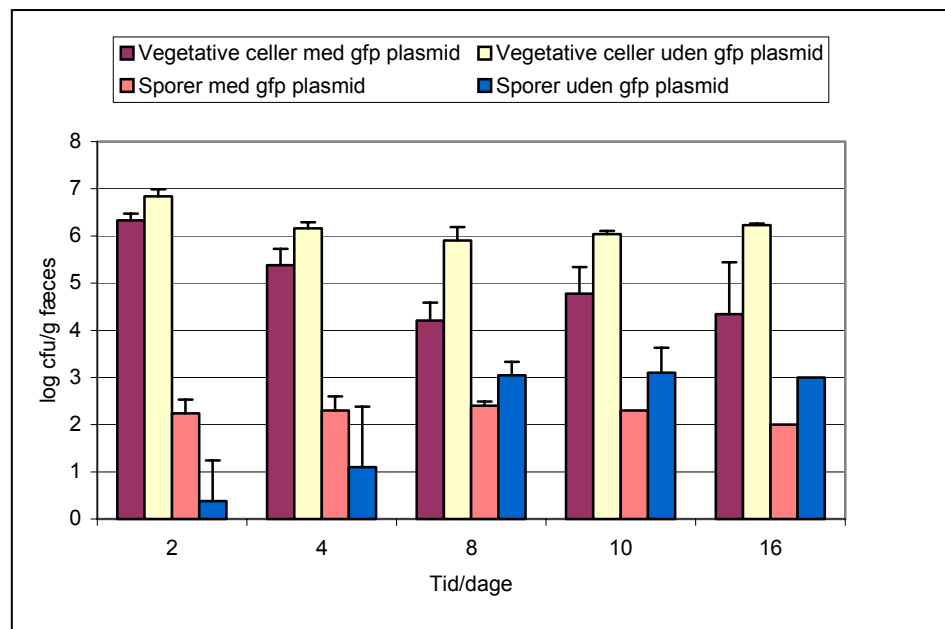
Flowcytometri (KU, phd studerende Martin Bahl) viste at grønne bakterier, dvs. vegetative celler kunne detekteres i alle tarmafsnit ved aflivning på dag 5 (Tabel 6) dvs. at sporerne var spiret og havde dannet aktive vegetative celler. Endvidere viste varmebehandling af prøverne fra tarm og fæces at der kom sporer ud med fæces som havde tabt *gfp*-plasmidet, dvs. at bakterien havde undergået en hel livscyklus i tarmen: sporerne var spiret til vegetative celler, som så igen havde sporuleret til sporer.

Varmebehandling (80 °C, 15 min) viste endvidere at de indgivne sporer havde spiret i tyndtarmen og selv i fæces fandtes størstedelen af bakterierne som vegetative celler.

Tabel 6. Resultater af flowcytometri og varmebehandling på prøver fra første aflivning af dyr fodret med sporer af *Bt* subsp. *israelensis*.

Dyr	Prøve	Antal grønne bakterier = vegetative celler (log cfu/g tarmindehold) bestemt vha. flowcytometri	Antallet af vegetative celler (log cfu/g tarmindehold) bestemt vha. varmebehandling af tarmprøver
3	Duodenum	<	i.b.
	Jejunum	<	i.b.
	Ileum	<	3,07
	Caecum	3,60	4,62
	Kolon	4,47	5,03
4	Duodenum	<	i.b.
	Jejunum	2,45	i.b.
	Ileum	2,45	i.b.
	Caecum	4,07	4,50
	Kolon	4,46	4,77
5	Duodenum	<	i.b.
	Jejunum	3,23	3,61
	Ileum	3,23	3,48
	Caecum	4,73	4,37
	Kolon	4,62	4,39

Endvidere ses ved varmebehandling og udpladning på selektive plader, at der i løbet af forsøget udskilles sporer uden plasmid, og da celler kun taber plasmider ved deling betyder det at sporerne har spiret til vegetative celler, som har groet og så igen sporuleret (Figur 13).



Figur 13. *Bt* subsp. *israelensis* i kimfri rotter. Antallet af sporer og vegetative celler udtrykt i cfu/g i fæces med og uden gfp plasmidet pAD44-12.

3.1.4 Opsummering

De tre dyreforsøg med HFA rotter doseret med a) *B. cereus* F4433/73R, b) *Bt* subsp. *kurstaki* og c) *Bt* subsp. *israelensis*, viste alle tre at i dyr fodret med vegetative bakterier genfandtes ingen eller kun få bakterier i fæces- og tarmprøver. Forsøg med sporer og vegetative celler af *B. cereus* og *Bt* subsp. *kurstaki* i simuleret mavevæske viste at de vegetative celler hurtig blev dræbt. Dette er i overensstemmelse med et andet studie [Clavel et al., 2004], som viste at under pH 4,5 har vegetative celler af *B. cereus* og *Bt* svært ved at overleve. Derfor kan den manglende genfindelse af *B. cereus* og *Bt* forklares ved at de vegetative celler ikke overlever passagen gennem mavesækken.

Varmeaktivering af sporerne før dosering havde ingen indflydelse på deres overlevelse og spiring i tarmmiljøet, dvs. at varmebehandling af fødevarer f.eks. ved tilberedning ikke øger risikoen for spiring af *Bt* i tarmen. Både ubehandlede og varmebehandlede sporer kunne detekteres med den højeste koncentration den første uge med dosering, hvorefter antallet hurtig faldt. Dog kunne vi selv to uger efter sidste dosering genfinde *B. cereus* og *Bt* i enkelte dyr.

I forsøget med *Bt* subsp. *israelensis* i HFA rotter kunne bakterien ikke detekteres i dyrenes fæces to uger efter sidste dosering, dette skyldes dog formodentlig at bakterien i modsætning til de to andre undersøgte stammer ikke var rifampicin resistent men streptomycin resistent. Streptomycinresistente bakterier er almindelig blandt en normal menneske tarmflora, og disse har formodentlig hindret den resistente subsp. *israelensis* stamme i at vokse op på de selektive plader. Det kan derfor ikke udelukkes at der ligesom i de to andre forsøg stadig er *Bt* subsp. *israelensis* stammer tilbage i dyrene to uger efter dosering.

Der var et enkelt dyr doseret med varme-aktiverede sporer af *Bt* subsp. *kurstaki*, som havde en meget højere koncentration af denne stamme i fæces end de andre dyr. Ved aflivning to uger efter dosering blev den samme høje koncentration fundet i alle tarmafsnit og varmeaktivering af tarmprøver fra tyndtarmen, viste at 90% af cellerne her var i den vegetative fase. Dette viser at i dette dyr er der sket spiring og re-sporulering. Desuden blev der i dette dyr fundet *Bt* subsp. *kurstaki* celler i milten, dvs. at *Bt* subsp. *kurstaki* celler kan passere tarm-barrieren og nå andre organer. Passage af tarm-barrieren blev ikke observeret for *Bt* subsp. *israelensis* i hverken HFA eller kimfri dyr.

Forsøgene med *Bt* subsp. *israelensis* mærket med et grønt fluorescerende protein og undersøgt i kimfri rotter viste tydeligt at indgivne sporer både spirer og re-sporulerer, dvs. at de har en hel livscyklus i tarmmiljøet. Selv i fæces fandtes bakterierne at være i det vegetative stade. Denne forskel fra resultaterne med HFA dyr skyldtes sandsynligvis fraværet af en omkringliggende tarmflora i de kimfri dyr, hvilket giver *Bt* meget bedre vækstbetingelser i hele mave-tarm kanalen.

3.2 Ændringer af den normale tarmflora

En eventuel påvirkning af den normale tarmflora efter dosering med *B. cereus* F4433/73, *Bt* subsp. *kurstaki* eller *Bt* subsp. *israelensis* blev studeret både ved simple kimtællinger af bestemte bakteriegrupper og ved en molekylærbiologisk

metode, som i princippet skulle fange alle bakterier i prøven. Der blev taget fæcesprøver før, under og efter dosering, derudover blev tarmprøver også undersøgt.

3.2.1 Kimtællinger af bakteriegrupper

Som beskrevet i Materialer og Metoder blev følgende bakteriegrupper undersøgt for eventuelle ændringer efter dosering med *B. cereus* og *Bt*: Total aerobe, total anaerobe, laktobaciller, koliforme og enterokokker. Disse blev udvalgt da de er dyrkbare og hører til de store grupper af bakterier i tarm. Ingen store ændringer blev observeret i fæces- og tarmfloraen ved dyrkning af de ovenstående nævnte bakteriegrupper før, under og efter dosering. Der blev fundet enkelte små ændringer som er opsummeret i Tabel 7. Ved aflivning to uger efter sidste dosering blev der ikke observeret forskelle mellem holdene.

Tabel 7. Observerede ændringer af bestemte bakteriegrupper i fæces- og tarmprøver. Ændringer i bakteriesammensætningen i tarmprøverne ses kun ved første aflivning på Dag 5.

Doseret bakteriestamme	Tarmafsnit	Ændring
<i>B. cereus</i> F4433/73	Ileum	Nedgang i antallet af laktobaciller i dyr doseret med varmebehandlede sporer
	Caecum	Nedgang i antallet af koliforme i dyr doseret med levende sporer
	Kolon	Nedgang i antallet af totale aerobe og anaerobe bakterier i dyr doseret med varmebehandlede sporer
<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> DMU67	Caecum og kolon	Nedgang i antallet af aerobe, anaerobe, laktobaciller og koliforme i dyr doseret med ubehandlede sporer
<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> HD567	Fæces i doseringsperioden	Øget antal enterokokker i dyr doseret med sporer (både inaktiverede og levende)

3.2.2 Ændringer af tarmflora studeret vha. DGGE

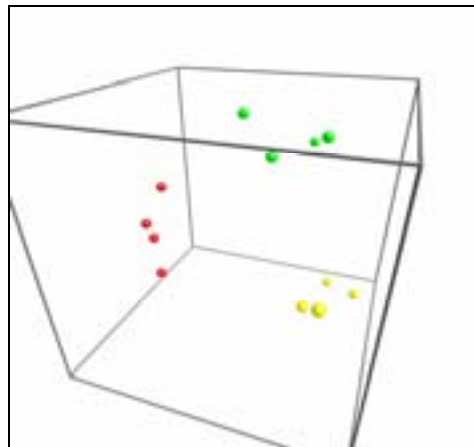
Da en stor del af bakterierne i tarmen ikke kan dyrkes på næringsmedier i laboratoriet, har vi anvendt en molekylærbiologisk metode, DGGE (denaturerende gradient gel elektroforese) som i princippet fanger alle bakterier, der udgør mere end 1% af populationen.

I projektet har vi undersøgt fæcesprøver fra alle tre forsøg med HFA dyr. Der er blevet taget prøver til DGGE før, under og efter dosering. Prøverne blev i forsøget med *B. cereus* F4433/73 undersøgt både med generelle primere der detekterer hele bakteriepopulationen og med specifikke primere til at finde ændringer i *Bacteroides*, laktobaciller og bifidobakterier. Disse tre grupper af bakterier menes at have betydning for menneskers tarmfunktion og immunstatus. I de to forsøg med *Bt* er prøverne kun analyseret vha. generelle

primere, da forsøget med *B. cereus* ikke viste ændringer i de førnævnte specifikke populationer.

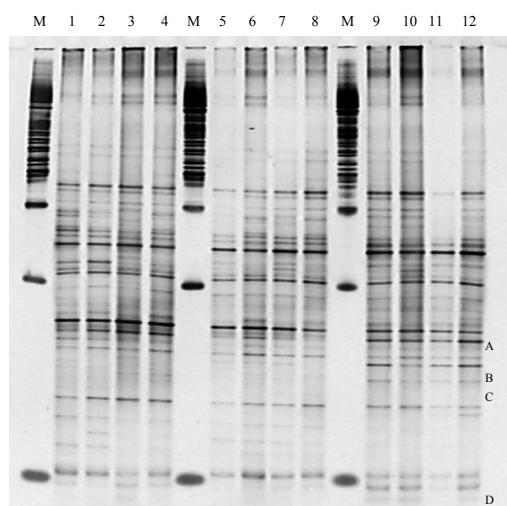
3.2.2.1 *B. cereus*

Som sagt var der ikke ændringer i de specifikke grupper (Bacteroides, lactobaciller og bifidobakterier) efter dosering med *B. cereus* F4433/73. Det samme gjaldt for hele bakteriepopulationen i de dyr der blev doseret med inaktiverede (strålesteriliserede) sporer og vegetative celler. Derimod viste PCR-DGGE af prøver fra dyr doseret med levende sporer (enten ubehandlede eller varmebehandlede) en klar gruppering af bakteriepopulationerne i grupper før, under og efter dosering (Figur 14, Bilag A).



Figur 14. Computeranalyse af tarmfloraen hos rotter med menneske-flora før, under og efter fodring med sporer af *B. cereus*. Prøver fra før, under og efter fodring er markeret med henholdsvis rødt, grønt og gult. Jo tættere prikkerne ligger på hinanden, des mere ens var floraen i fæcesprøverne.

Disse grupperinger kunne tilskrives ændringer i tilstedeværelsen af bånd eller intensiteten af bånd på DGGE gelen (Figur 15). Kloning, sekventering og sammenligning med kendte sekvenser i databaser viste at bakterierne i de udskårne bånd var identiske med forskellige anaerobe ikke-dyrkbare tarmbakterier.



Figur 15. PCR-DGGE profiler genereret fra fæcesprøver af dyr doseret med varmebehandlede sporer af *B. cereus* F4433/73. Bane 1-4: prøver fra individuelle dyr før dosering; bane 5-8: poolede prøver fra dyr i doseringsugen; bane 9-12: poolede prøver fra dyr efter dosering. M: markør. Båndene blev bestemt til at tilhøre følgende genera af bakterier: Bånd A: *Ruminococcus obeum*, bånd B: *Fusobacterium* sp.; bånd C: *Clostridiaceae* familien; bånd D: genus *annerella*.

3.2.2.2 *Bt subsp. kurstaki*

I modsætning til forsøget med *B. cereus* har vi med prøverne fra *Bt* forsøgene ikke anvendt samlede prøver fra flere dyr, men set på fæcesprøver på enkeltdyr fra før, under og efter dosering med *Bt*.

PCA-analyse (principal komponent analyse) af DGGE gelerne viser at for de dyr der fik vegetative celler og inaktiverede sporer sker der en ændring i floraen i undersøgelsesperioden, hvor floraen efter dosering adskiller sig fra floraen før og under.

I de rotter der fik levende sporer (både ubehandlede og varmebehandlede) ses i nogle af dyrene en ændring af bakteriesammensætningen under dosering (Bilag A). Dette gælder for dyr 7 fra *Hold 2* og dyr 15 fra *Hold 3*, som begge i perioder har en højere koncentration af *Bt subsp. kurstaki* i fæces end de andre dyr i holdene (Figur 7B). Som det ses af Bilag A (Figur 1.8.3 og 1.8.6) er der bånd der bliver kraftigere under dosering. Kloning og sekventering af disse bånd viste op til 99% identitet med *Faecalibacterium prausnitzii*, en dominerende gruppe i en normal human fæcesflora.

3.2.2.3 *Bt subsp. israelensis*

Også i forsøget med underarten *israelensis* sås en ændring i bakteriesammensætning under dosering med sporer af bakterien (Bilag A), men da der også sås en ændring i kontrolgrupperne fodret med hhv. vegetative celler og inaktiverede sporer er det uvist om ændringen skyldes doseringen med stammen.

3.2.3 Opsummering

Der blev kun observeret få og midlertidige ændringer af den omkringliggende bakterieflora, og vi kan konkludere at påvirkningen af den normale tarmflora er minimal. Nogle stammer af *B. cereus* bliver som sagt brugt som probiotika til mennesker og dyr og et studie med en sådan probiotisk stamme har vist en effekt på *E. coli* og enterokok populationen [Gedek et al., 1993]. Endvidere har et studie vist en signifikant reduktion i antallet af koliforme bakterier i tarmprøver fra smågrise fodret med en probiotisk *B. cereus* stamme (Jadamus et al, 2002). Den samme nedgang i antallet af koliforme bakterier har vi observeret i vores forsøg med *B. cereus*, dog var reduktionen kun midlertidig. Det er usikkert hvorvidt denne påvirkning af den omkringliggende bakterieflora skyldes vegetative celler eller sporer af *B. cereus* og *Bt*. Som forsøgene viser er bakterierne i de fleste dyr primært tilstede som sporer, og det er derfor sandsynligt at det er disse der er ansvarlige for ændringerne, evt. ved at binde sig til tarmepitelceller og derved optage plads for andre bakterier.

I to rotter fodret med sporer af *Bt* subsp. *kurstaki* sås en ændring af bakteriesammensætningen i fæces under dosering ved DGGE. Dette gælder for dyr 7 fra *Hold 2* og dyr 15 fra *Hold 3*, som begge i perioder har en højere koncentration af *Bt* subsp. *kurstaki* i fæces end de andre dyr i holdene. Under dosering er der bånd der bliver kraftigere på DGGE gelen. Kloning og sekventering af disse bånd viste op til 99% identitet med *Faecalibacterium prausnitzii*, en dominerende gruppe i en normal human fæcesflora. *F. prausnitzii* er en butyrat-producerende bakterie, som menes at danne energi til tarmepitelceller og har en god indflydelse på sundhedstilstanden i tyktarmen. Da der ses en stigning af denne bakterie i doseringsperioden kunne det tyde på at *Bt* subsp. *kurstaki* har en positiv effekt på netop denne bakterie.

PCA-analyse (principal komponent analyse) af DGGE gelerne viser at for de dyr der fik vegetative celler og inaktiverede sporer sker der en ændring i floraen i undersøgelsesperioden, hvor floraen efter dosering adskiller sig fra floraen før og under. Dette er formodentlig en naturlig ændring der sker i tarmfloraen på HFA rotter, en bakteriesammensætning, som i forhold til konventionelle rotter ikke er helt stabil, da den ikke er naturlig for rotter.

3.3 Enterotoksiner i tarmen

Inden der blev kigget efter enterotoksiner i tarmprøver vha. Vero-celle assay og et kommercielt kit fra Oxoid (BCET-RPLA) var det nødvendigt at lave en del indledende forsøg for at optimere forsøgsbetingelserne, bestemme detektionsgrænser m.m. Disse forsøg er ikke beskrevet her, men i afsnittet om Materialer og Metoder, paragraf 3.5.

3.3.1 Vero-toksiciteten af forskellige bakterier

Vero-toksiciteten af forskellige stammer dyrket under optimale betingelser er vist i Tabel 8. *Bt* subsp. *israelensis* HD-567 havde den højeste aktivitet, dette kan sandsynligvis tilskrives en celledræbende faktor som produceres samtidig med krystal-toksinet. Ingen af de andre stammer har denne faktor. De to andre kommercielle stammer, subsp. *kurstaki* og subsp. *tenebrionis* har lavere aktivitet end det sygdomsfremkaldende isolat *B. cereus* F4433/73. Endelig har også den probiotiske stamme *B. cereus* BCIP 5832 lav Vero-toksisk aktivitet.

Tabel 8. Vero-toksicitet af referencestammer og stammer brugt til rotteforsøg. Fortyndingsfaktoren er det antal gange bakteriesuspensionen er blevet fortyndet for at opnå mindst 50% overlevelse af Vero-cellerne. Dvs. jo højere fortyndingsfaktor jo mere toksisk er stammen.

Stamme	Fortyndingsfaktor
<i>B. cereus</i> F4433/73	160
<i>B. cereus</i> BCIP 5832	20
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> HD-1	80
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> DMU67R	80
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> HD-567	640
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> NB-125	80

3.3.2 Detektion af Vero-toksisk aktivitet i tarmprøver fra rotter

I ingen af forsøgene med HFA rotter kunne der detekteres Vero-toksisk aktivitet i prøverne fra tarm og fæces. Hverken i de dyr der var doseret med den sygdomsfremkaldende *B. cereus* F4433/73 eller i de dyr doseret med de to underarter af *Bt* (subsp. *kurstaki* og subsp. *israelensis*).

I de kimfri rotter doseret med sporer af *Bt* subsp. *israelensis* blev komponenten L2 fra HBL detekteret i et enkelt dyr fra tyndtarmsprøve vha. det kommercielle kit BCET-RPLA (Tabel 9).

Tabel 9. Resultat af Vero-assay og Oxoid test af tarmprøver fra mono-associerede rotter. Fortynding: Tarm-prøve ekstrakterne fortyndes 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 og 1280 gange. Den angivne fortynding nedenfor angiver ved hvilken fortynding der er mere end 50% af cellernes aktivitet tilbage. Kun de ekstrakter hvor der enten står et "-" eller et "+" er blevet testet i OXOID analysen.

Dyr	prøve	Fortynding	Oxoid test
1	J	40	-
1	I	Mindre end 10	-
1	Ca	Mindre end 10	-
3	J	40	-
3	I	20	+
3	Ca	Mindre end 10	-
4	J	40	-
4	I	Mindre end 10	
4	Ca	Mindre end 10	
5	J	20	-
5	I	Mindre end 10	
5	Ca	Mindre end 10	
6	J	80	-
6	I	Mindre end 10	
6	Ca	Mindre end 10	
7	J	40	-
7	I	Mindre end 10	
7	Ca	Mindre end 10	
8	J	40	-
8	I	Mindre end 10	-
8	Ca	Mindre end 10	-
6	Kolon	Mindre end 10	
7	Kolon	Mindre end 10	
8	Kolon	Mindre end 10	

Desuden sås udslag i Vero-celle assayet i jejunum (midterste del af tyndtarm) i alle dyr, også i kontroldyr 1, som ikke blev doseret med *Bt* subsp. *israelensis* (Tabel 9).

3.3.3 Opsummering

Inden prøver fra dyr kunne testes for tilstedeværelsen af enterotoksiner var det nødvendigt at udføre en del indledende forsøg, som beskrevet i Materialer og Metoder. I disse indledende forsøg blev forsøgsbetingelserne optimeret, det blev vist at fæces- og tarmekstrakt ikke influerer på genfindelse af enterotoksiner, at fæcesprøver ikke i sig selv er giftige for cellerne, og at der skal være mindst 10^6 bakterier per ml til stede for at der kan måles Vero-toksisk aktivitet.

Vero-celle assay på de anvendte stammer viste at den højeste toksin-aktivitet fandtes i *Bt* subsp. *israelensis*, formodentlig pga. et nonspecifikt cytolytisk toksin der dannes samtidig med krystaltoksinet. Denne stamme bruges i Danmark kun på pryddplanter. De andre kommercielle stammer, subsp. *kurstaki* og subsp. *tenebrionis*, som benyttes til spiselige afgrøder, og hvoraf kun subsp. *kurstaki* er tilladt på det danske marked, havde en lavere aktivitet end det *B. cereus* isolat der har givet anledning til diarré.

At der ikke kunne detekteres Vero-toksisk aktivitet i HFA dyrene kan skyldes at vegetative former af de tilsatte bakterier ikke fandtes i tilstrækkelig høj densitet i tyndtarmen, hvor produktionen af enterotoksiner menes at ske [Granum and Lund, 1997]. De indledende forsøg viste at der skal være mindst 10^6 bakterier per ml til stede for at der kan detekteres cytotoksisk effekt på Vero-celler, og i tyndtarmsprøverne detekterede vi højst 10^4 bakterier per g tarmindehold.

I forsøgene med kimfri rotter associeret med *Bt* subsp. *israelensis* sås udslag i Vero-celle assayet i jejunum (midterste del af tyndtarm) i alle dyr, også i kontroldyr 1, som ikke blev doseret med *Bt* subsp. *israelensis* (Tabel 9). Derfor er det sandsynligvis ikke bakterien der har en negativ effekt på Vero-celler, men kan måske skyldes galde-salte eller pankreas-enzymen der er blevet udskilt til tyndtarmen. Kun i et dyr ud af seks fra forsøgene med kimfri rotter fandtes cytotoksisk aktivitet i Vero-celle assay, samt positivt respons fra Oxoid kittet som detekterer L2 komponenten fra enterotoksin HBL.

3.4 Overførsel af DNA mellem to *Bt* stammer i kimfri rotter

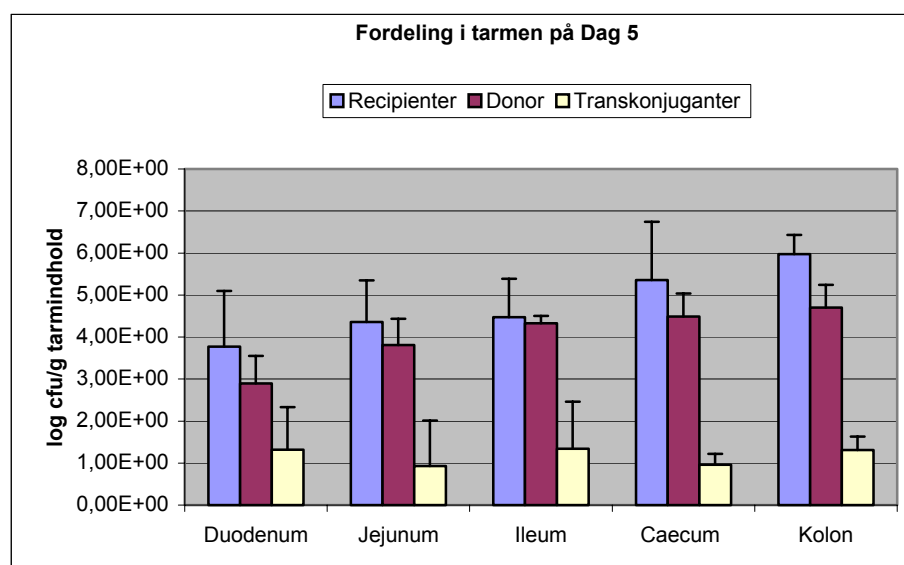
3.4.1 Dyreforsøg med kimfri dyr

Bakterierne i *B. cereus* gruppen er kendt for at indeholde plasmider (cirkulært DNA) hvoraf mange kan overføres fra den ene bakterie til den anden ved en proces der kaldes konjugation. Der findes mange artikler som beskriver denne overførsel i laboratoriet, og det er også blevet vist at der kan ske overførsel vha. konjugation i tarmen på insekter. Det er dog aldrig blevet undersøgt i tarmen hos pattedyr, og det er interessant fra et evolutionært og økologisk synspunkt hvorvidt *Bt* er i stand til at udveksle DNA i et sådant miljø, og er en vigtig faktor i risikovurderingen af *Bt* midler. Derudover afspejler det bakteriel

aktivitet. En eventuel overførsel viser nemlig at de indgivne sporer må have spiret og dannet vegetative celler, idet kun aktive celler kan overføre DNA.

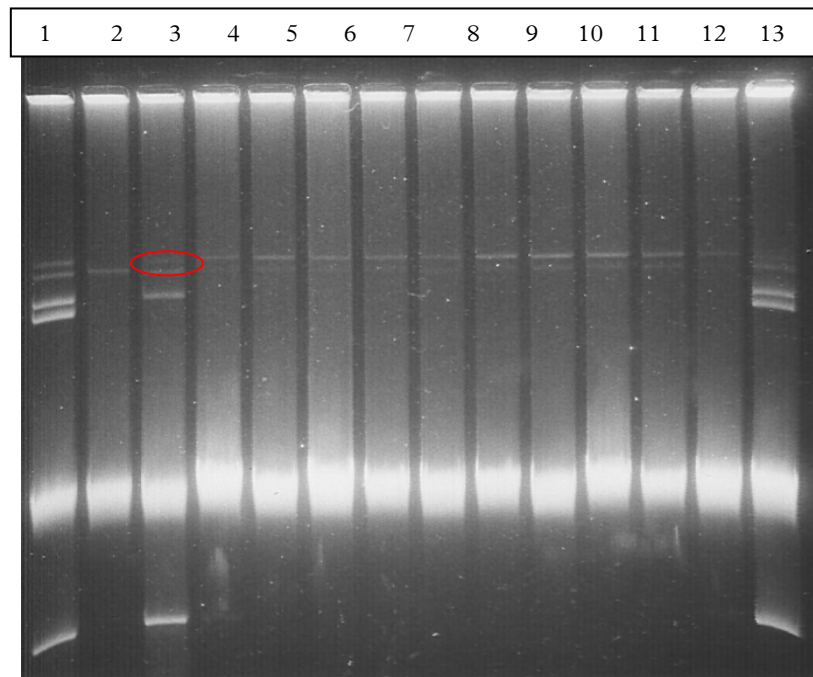
For at øge muligheden for at detektere en eventuel overførsel mellem to *Bt* stammer valgte vi at bruge kimfri rotter, som blev doseret med to isogene stammer, dvs. bakterier som er ens bortset fra indholdet af plasmider. Seks dyr blev først doseret med sporer af recipientstammen fire dage i træk, ugen efter fik dyrene så donorstammen som sporer fire dage i træk. Donorstammen indeholdt det konjugative plasmid pXO16, som i laboratoriet overføres med meget høj frekvens til recipientstammen. Halvdelen af dyrene blev aflivet dagen efter sidste dosering med donorstammen og de resterende tre en uge efter.

Der blev detekteret transkonjuganter (dvs. recipienter som har modtaget plasmidet pXO16 fra donoren) i alle dyr ved den første aflivning (Figur 16). Som det ses af figuren (store standardafvigelser) dækker tallene over store individuelle forskelle i specielt antallet af donorer og transkonjuganter i de enkelte dyr. Der blev dog fundet transkonjuganter i alle dyr i alle tarmafsnit, på nær et dyr hvor der ikke kunne detekteres transkonjuganter i den øverste del af tyndtarmen (duodenum). Ved aflivning en uge efter sidste dosering med donorstammen blev der kun fundet få donorceller og ingen transkonjuganter.



Figur 16. Antallet af recipienter, donorer og transkonjuganter i de forskellige tarmafsnit ved aflivning dagen efter sidste dosering med donorstammen. Gennemsnit af tre dyr.

Transkonjuganterne blev isoleret ved at plade ud på selektive plader, som kun transkonjuganterne kunne vokse på. For at sikre at det var ægte transkonjuganter og ikke spontane mutanter, blev der lavet plasmid-oprensninger som blev undersøgt ved gel-elektroforese. Dette viste at alle transkonjuganter var ægte transkonjuganter indeholdende plasmidet pXO16 (Figur 17).



Figur 17. Gelbillede af transkonjuganter opnået i dyreforsøg med en *Bt* subsp. *israelensis* donor med det konjugative plasmid pXO16 og en *Bt* subsp. *israelensis* recipient. Bane 1 og 14: vildtypestamme af *Bt* subsp. *israelensis* (AND508), Bane 2: recipient, Bane 3: donor, Bane 4-13: transkonjuganter. Det konjugative plasmid pXO16 kan svagt detekteres i donorstammen (rød ring), i den oprindelige vildtypestamme, samt i alle transkonjuganter.

3.4.2 Opsummering

Forsøget med kimfri rotter viste at *Bt* stammer er i stand til at udveksle plasmider *in vivo* i en tarm fra pattedyr. Forsøget viste dog også at bakterier indeholdende det konjugative plasmid, pXO16, ikke havde en vækstfordel i tarmmiljøet, da der i slutningen af forsøget primært kunne detekteres recipientstammer i dyrene, kun få donorstammer og ingen transkonjuganter.

4 Diskussion

For at øge vores viden om den sundhedsmæssige effekt af oral indtagelse af mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler baseret på *Bt* er flg. punkter blevet undersøgt i rotter fodret med *Bt*: 1) overlevelse og spiring i tarmen, 2) ændring af den eksisterende bakteriesammensætning, 3) enterotoksinproduktion i tarmen og 4) genoverførsel i tarmen. Resultaterne fra de enkelte punkter vil blive diskuteret grundigt i det følgende.

4.1 Overlevelse og spiring i tarmen

Forsøgene viste, at i rotter fodret med vegetative celler af *Bt* eller den nærtbeslægtede *B. cereus* genfandtes ingen eller kun få bakterier i fæces og tarm. Forsøg med sporer og vegetative celler af *B. cereus* og *Bt* subsp. *kurstaki* i simuleret mavevæske viste, at de vegetative celler hurtigt blev dræbt. Dette er i overensstemmelse med et andet studie [Clavel et al., 2004], som viste at under pH 4,5 har vegetative celler af *B. cereus* og *Bt* svært ved at overleve. Derfor kan den manglende genfindelse af *B. cereus* og *Bt* forklares ved at de vegetative celler ikke overlever passagen gennem mavesækken. Plantebeskyttelsesmidler baseret på *Bt* bliver sprøjtet ud som sporer, som viste høj overlevelse i den kunstige mavevæske selv ved pH 1,5.

Overlevelse gennem mavesækken kan dog ændres hvis bakterierne indtages sammen med fødevarer. Eksempelvis vil fedtholdige fødevarer beskytte bakterierne, så også vegetative celler kan overleve. [Clavel et al., 2004] har vist, at *B. cereus* celler har en bedre overlevelse i mælk ved lav pH end i andre undersøgte medier. Denne bedre overlevelse kan skyldes at bakterierne bliver fanget i hydrofobe fedtmolekyler, der yder beskyttelse gennem maven [Conway et al., 1987]. Mange fødevarer kunne give den samme beskyttelse for vegetative celler som mælk gør. Endvidere har studier vist at tolerance over for lav pH kan induceres ved at dyrke *B. cereus* ved subletalt pH [Jobin et al., 2002], f.eks. ved tilberedning af mad. Endelig kan pH i maven under visse omstændigheder være højere, f.eks. hos ældre mennesker, i slutningen af et måltid og ved visse sygdomstilstande. Derfor kan det ikke udelukkes at også vegetative celler kan overleve passagen gennem maven og give anledning til effekter i tarmen.

I modsætning til de vegetative celler viste sporerne god overlevelse gennem maven, og i mange tilfælde kunne bakterien detekteres i fæces selv to uger efter sidste dosering. I de kimfri dyr med *Bt* subsp. *israelensis*, var der spiring og vækst af de indgivne sporer i alle dyr. I HFA dyrene kan det kun med sikkerhed siges at være sket i ét dyr fodret med sporer af *Bt* subsp. *kurstaki*, hvor der fandtes op til 10^4 CFU/g i alle tarmafsnit og bakterien kunne endvidere detekteres i milten.

I overensstemmelse med vores resultater har også andre vist at *Bacillus* sporer er i stand til at overleve og nogle gange spire i mave-tarmkanalen. Tre *B. cereus* stammer er blevet vist at kunne overleve i mave-tarmkanalen på konventionelle mus 18 dage efter sidste dosering [Duc et al., 2004]. Ligeledes

viste et andet dyreforsøg med konventionelle mus at antallet af *Bacillus subtilis* sporer var højere i fæces end det indgivne antal [Hoa et al., 2001]. Ved at anvende et sensitivt revers transkriptase-PCR assay til detektion af vegetative celler i tyndtarmen blev det endvidere vist, at *Bacillus subtilis* sporer spirer i mave-tarmkanalen på mus [Casula and Cutting, 2002]. Sporer er ligeledes blevet detekteret i smågrise fodret med vegetative celler [Jadamus et al., 2001]. Sammen med resultaterne fra vores undersøgelse indikerer det, at sporer kan spire i den nærings-rige tyndtarm, gro og efterfølgende sporulere i det mere nærings-fattige og barske miljø i tyktarmen, hvor vandaktiviteten er lav.

Genfindelsen af *Bt* og *B. cereus* hele to uger efter sidste dosering kan også skyldes bakteriens evne til at hæfte sig til tarm-cellerne. Studier har vist at bakterier af *B. cereus* gruppen er mere hydrofobe end andre *Bacillus* grupper [Ronner et al., 1990] og desuden er overfladen dækket af filamenter [Husmark and Ronner, 1992], som gør dem i stand til at binde til tarmcellerne.

Translokationen af *Bt* subsp. *kurstaki* fra tarm til milt i ét dyr ud af seks kræver yderligere studies for at klarlægge risikoen for en sådan translokation. I andre studier har man også isoleret *Bt* fra organer, men forfatterne af sådanne studier påstår at disse fund skyldes efterfølgende kontamination [McClintock et al., 1995]. Dette kan udelukkes i dette studie, bl.a. fordi milt og lever er taget ud af dyrene før tarmene er åbnet. *B. cereus* gruppen er kendt for at producere forskellige virulensfaktorer, som f.eks. hæmolysiner, fosfolipaser og cytolysiner [Drobniewski, 1993] som kan destruere værts vævskomponenter og dermed være involveret i invasion af bakterien. *B. cereus* kan være årsag til andet end mave-tarm infektioner, både lokalt og systemisk i følsomme befolkningsgrupper som f.eks. immunsvækkede patienter, og også *Bt* har været associeret med to ikke-mavetarm infektioner, en sår- og en øjeninfektion [Drobniewski, 1993].

4.2 Påvirkning af den eksisterende bakteriepopulation

Et aspekt ved risikovurdering af plantebeskyttelsesmidler baseret på *Bt* kunne være bakteriens evne til at påvirke sammensætningen af den tilstedeværende normale tarmflora. Bakterier i *B. cereus* gruppen er kendt for at danne forskellige produkter, der kan have en effekt på andre bakterier, og enkelte underarter af *B. cereus* anvendes som probiotika til dyr og mennesker, hvor de menes at have en gunstig effekt på sammensætningen af bakterier i tarmen.

Der blev kun observeret få og midlertidige ændringer af den omkringliggende bakterieflora, og vi kan konkludere, at påvirkningen af den normale tarmflora er minimal. Nogle stammer af *B. cereus* bliver som nævnt brugt som probiotika til mennesker og dyr og et studie med en sådan probiotisk stamme har vist en effekt på *E. coli* og enterokok populationen [Gedek et al., 1993]. Endvidere er der blevet påvist en signifikant reduktion af koliforme bakterier i tarmprøver fra smågrise fodret med en probiotisk *B. cereus* stamme [Jadamus et al, 2002]. Den samme reduktion af koliforme bakterier har vi observeret i vores forsøg med *B. cereus*, dog var reduktionen kun midlertidig. Det er usikkert hvorvidt denne påvirkning af den eksisterende bakteriepopulation skyldes vegetative celler eller sporer af *B. cereus* og *Bt*. Som forsøgene viser, er bakterierne i de fleste dyr primært tilstede som sporer, og det er derfor sandsynligt, at det er disse, der er ansvarlige for ændringerne, evt. ved at binde sig til tarmepitelceller og derved optage plads for andre bakterier.

I to rotter fodret med sporer af *Bt* subsp. *kurstaki* sås en ændring af bakteriesammensætningen i fæces under dosering analyseret vha. DGGE. Dette gælder for dyr 7 fra *Hold* 2 og dyr 15 fra *Hold* 3, som begge i perioder har en højere koncentration af *Bt* subsp. *kurstaki* i fæces end de andre dyr. I prøverne taget under dosering er der bånd der bliver kraftigere på DGGE gelen sammenlignet med prøverne før dosering. Kloning og sekventering af disse bånd viste op til 99% identitet med *Faecalibacterium prausnitzii*, en dominerende gruppe i normal human fæcesflora. *F. prausnitzii* er en butyrat-producerende bakterie, som menes at danne energi til tarmepitelceller og som har en god indflydelse på sundhedstilstanden i tyktarmen. Da der ses en stigning af denne bakterie i doseringsperioden kunne det tyde på, at *Bt* subsp. *kurstaki* har en positiv effekt på netop denne bakterie og dermed indirekte på tyktarmens sundhedstilstand.

4.3 Dannelse af enterotoksiner i tarmen

Vero-celle assay på de anvendte stammer viste at den højeste toksin-aktivitet fandtes i *Bt* subsp. *israelensis*, formodentlig pga. et nonspecifikt cytotoksisk toksin, der dannes samtidig med insekttoksinet. Plantebeskyttelsesmidler der indeholder denne stamme bruges i Danmark kun på prydplanter. De andre kommercielle stammer der indgik i undersøgelsen, *Bt* subsp. *kurstaki* og *Bt* subsp. *tenebrionis*, som benyttes til plantebeskyttelse på spiselige afgrøder (hvoraf kun *Bt* subsp. *kurstaki* er tilladt på det danske marked), havde en lavere toksin-aktivitet end det *B. cereus* isolat (F4433/73), der også indgik i undersøgelsen, og som har givet anledning til diarré hos mennesker [Granum et al., 1993].

Dannelse af enterotoksiner i tarmen blev kun observeret i et dyr. Dyret stammede fra forsøgene med kimfri rotter fodret med sporer af *Bt* subsp. *israelensis*. Enterotoksinproduktion blev fundet i den midterste del af tyndtarmen både vha. Vero-celle assay og det kommercielle kit, som detekterer en komponent af det hæmolytiske BL toksin. At der ikke kunne detekteres Vero-toksisk aktivitet i de resterende dyr kan skyldes, at vegetative former af de tilsatte bakterier ikke fandtes i tilstrækkelig høj koncentration i tyndtarmen, hvor produktionen af enterotoksiner menes at ske [Granum and Lund, 1997]. De indledende forsøg viste, at der skal være mindst 10^6 bakterier per ml til stede for at der kan detekteres cytotoksisk effekt på Vero-celler, og i tyndtarmsprøverne fandt vi højst 10^4 bakterier per g tarmindehold.

Desuden er vi usikre på, om pH forholdene i en normal fungerende tarm er optimale for toksinproduktion, idet det er vist, at en *B. cereus* stamme ikke dannede L2 komponenten af enterotoksin HBL ved pH5 og 6, men ved pH7 blev komponenten dannet [Jobin et al., 2002]. Denne observation understøtter desuden, at i tilfælde af høj pH værdi i mavesækken (og dermed i tarmen) vil dette, udover at give god overlevelse af bakterierne, også være gunstig for dannelse af enterotoksiner i tarmen.

4.4 Overførsel af DNA i tarmen

En vigtig faktor ved risikovurdering af bakterier anvendt som plantebeskyttelsesmidler er deres evne til at overføre genetisk information til

andre bakterier. Her tænkes i første omgang især på gener der koder for resistens overfor antibiotika, men også for andre gener, som f.eks. toksin-gener, er det vigtigt at vide hvorvidt de er overførbare.

For *Bt* vides det at generne for insekttoksinet oftest sidder på plasmider, der kan overføres til andre *Bt*, hvilket er årsagen til den store diversitet der ses i arten *Bt*. Arten er nært beslægtet med *Bacillus anthracis*, hvis virulens skyldes to store plasmider, pXO1 og pXO2, der ligesom insekttoksin-plasmiderne fra *Bt* kan overføres mellem medlemmer af *B. cereus* familien. Det nære genetiske slægtskab mellem arterne af *B. cereus* familien er blevet underbygget ved DNA sekvens-bestemmelse af et *Bt* plasmid, og denne har vist stor lighed med pXO2 plasmidet fra *B. anthracis* [Van der Auwera et al., 2005]. Foruden ligheden med pXO2 havde plasmidet også lighed med plasmider fra andre Gram-positive arter, hvilket sandsynliggør, at DNA-udveksling mellem forskellige arter foregår i naturen.

Udveksling af plasmider vha. konjugation blandt *B. cereus* arterne er blevet observeret i laboratoriet og i tarmen på insekter, men dette studie er det første, der viser at konjugation også kan ske i en pattedyrs tarm. Da forsøget er blevet udført i en worst-case model med høje koncentrationer af donor og recipient er der dog behov for yderligere studier for at konkludere om overførsel af DNA fra *Bt* også vil ske i tarmen hos mennesker.

Da der er fundet genetisk lighed mellem plasmider fra *Bt* og andre Gram-positive bakterier, kunne det være interessant at gentage forsøget, hvor tarmbakterier, f.eks. enterokokker, blev brugt som recipienter.

5 Perspektiver

5.1 anbefalinger til Miljøstyrelsen vedr. risikovurdering af *Bt* midler

Generelt giver denne undersøgelse ikke grund til øget bekymring omkring de *Bt* midler, der er på det danske marked i dag. Selvom *Bt* subsp. *kurstaki* (som anvendes på grøntsager) kan spire i tarmen, danner stammen ikke høje koncentrationer af celle-dræbende toksiner under de anvendte *in vitro* dyrkningsbetingelser. Dog kræver den observerede passage til milten hos ét af dyrene flere studier af netop denne stamme, og evt. de andre kommercielle stammer på det europæiske marked, for at klarlægge om en sådan passage også kan ske i mennesker.

I ingen af forsøgene blev dyrene påvirket af at blive fodret med bakterierne, endog ikke i det forsøg hvor der blev fodret med en human patogen stamme af *B. cereus*. Dette viser begrænsningen i at anvende rotter til at vurdere den humane virulens af *Bt*. Ved fremtidige risikovurderinger af *Bt* baserede insekticider anbefales det derfor, at man lægger større vægt på undersøgelser af toksicitet i *in vitro* assays (f.eks. PCR analyser for virulensgener, celle-assays), og mindre vægt på rotteforsøg. Denne undersøgelse viser dog, at dyreforsøg er anvendelige til at undersøge bl.a. bakteriens evne til at kolonisere tarmen, påvirkning af den omkringliggende tarmflora og udveksling af DNA med andre bakterier.

Da stammer af samme art kan være helt forskellige, anbefales det, at der anvendes en case-by-case vurdering af hver enkelt stamme, hvor der også bliver taget hensyn til brugen af det endelige produkt – f.eks. sprøjtning af enten grøntsager eller pryddplanter. Eksempelvis viste nærværende undersøgelse at *Bt* subsp. *israelensis* har høj cytotoxisk effekt, men da stammen i Danmark kun anvendes i forbindelse med produktion af potteplanter, er det næppe et problem for den almindelige forbruger, men kan være et arbejdsmiljø-problem, hvis ikke der anvendes tilstrækkelige værnemidler.

5.2 anbefalinger til fremtidig forskningsindsats

Det er uvist hvorvidt fundet i milten hos rotter efter indtagelse af sporer af *Bt* subsp. *kurstaki* skyldes en egenskab ved stammen eller om overgangen er individ-afhængig (f.eks. dyrets immunstatus, omkringliggende tarmflora etc.). Dette nødvendiggør yderligere forskning for at teste evnen af de kommercielle stammer til at passere mave-tarm barrieren og nå andre organer.

Metode-indkøring af Vero-celle assayet viste, at enterotoksinproduktionen af de enkelte stammer var meget afhængig af dyrkningsbetingelserne. Dette kræver yderligere studier for at bestemme under hvilke forhold *Bt* producerer enterotoksiner, specielt hvilke abiotiske og biotiske faktorer i fødevarer og mave-tarm miljøet der stimulerer enterotoksin-produktionen. Endvidere er det relevant at undersøge de forskellige metoder til bestemmelse af

enterotoksinproduktion. Herunder er interaktioner mellem bakterier og betydningen af dette for toksindannelse og infektion i den humane tarm stort set ukendt. Den enkelte bakteries evne til at konkurrere i et komplekst mikrobielt miljø kan vise sig at have en signifikant betydning for en risikovurdering.

Som beskrevet i diskussionsafsnittet kan en række forhold bevirke, at de vegetative celler overlever passagen gennem maven, og en undersøgelse af disse forhold kunne også være interessant. Kunne man forestille sig, at når mennesker får diarré forårsaget af *B. cereus* er det i virkeligheden er de vegetative celler der har vokset i fødevaren og produceret enterotoksiner, der giver problemer i tarmen og ikke sporerne? Der bør derfor foretages studier af betydningen af fødens sammensætning, f.eks. fedtindholdet, for overlevelse af vegetative bakterier under mave-passagen.

Forsøg med rotter er i øjeblikket det primære redskab til at teste sikkerheden ved nye mikrobiologiske bekæmpelsesmidler både i Danmark og i EU, men vores og andres resultater viser at rotteforsøg ikke er den bedste metode til at afsløre sygdomsfremkaldende egenskaber hos bakterier. Der er derfor behov for yderligere forskning i hvilke metoder man skal anvende til at bestemme virulensen af bakterier anvendt som mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Alternative virulensmodeller, som f.eks. nematoden *Caenorhabditis elegans* bør overvejes.

Udveksling af plasmider vha. konjugation blandt *B. cereus* arterne er blevet observeret i laboratoriet og i tarmen på insekter, men dette studie er det første, der viser at konjugation også kan ske i en pattedyrstarm. Da forsøget er blevet udført i en worst-case model med høje koncentrationer af donor og recipient er der dog behov for yderligere studier for at konkludere, om overførsel af DNA fra *Bt* også kan ske i tarmen hos mennesker. Da der er fundet genetisk lighed mellem plasmider fra *Bt* og andre Gram-positive bakterier, er det endvidere oplagt at udføre et forsøg, hvor tarmbakterier, f.eks. enterokokker, bliver brugt som recipienter.

6 Konklusion

Vores resultater 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 og overlevelsen. 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 (subsp. *kurstaki*), end fra dem, som i Danmark kun bruges på prydplanter (subsp. *israelensis*). 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.

Referencer

Casula G, Cutting SM (2002) Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2344-2352

Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, Eberl L, Moller S, Givskov M, Molin S (1998) Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2247-2255

Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C, Schmitt P (2004) Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* **97**: 214-219

Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* **70**: 1-12

Damgaard PH (1995) Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**: 245-250

Drobniewski FA (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**: 324-338

Duc IH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2161-2171

Dunn AK, Handelsman J (1999) A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene* **226**: 297-305

Feitelson JS, Payne J, Kim L (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology* **10**: 271-275

Gedek B, Kirchgessner M, Wiehler S, Bott A, Eidelsburger U, Roth FX (1993) [The nutritive effect of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 2. Effect and microbial count, composition and resistance determination of gastrointestinal and fecal microflora]. *Arch Tierernahr* **44**: 215-226

Granum PE, Brynestad S, Kramer JM (1993) Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol* **17**: 269-279

Granum PE, Lund T (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 223-228

Hansen, B. M, Damgaard, P. H., Eilenberg, J., and Pedersen, J. C. *Bacillus thuringiensis*. Ecology and environmental effects of its use for pest control. 316. 1996. Danish Environmental Protection Agency. Environmental project. Ref Type: Report

Hendriksen, N. B. and Binnerup, S. Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i planteproduktionen - muligheder og risici. 14/1997. 1997. Danmarks Miljøundersøgelser. Tema-rapport. Ref Type: Report

Hirayama K, Itoh K (2005) Human flora-associated (HFA) animals as a model for studying the role of intestinal flora in human health and disease. *Curr Issues Intest Microbiol* **6**: 69-75

Hoa TT, Duc LH, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca E, Van PH, Cutting SM (2001) Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3819-3823

Hofte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* **53**: 242-255

Husmark U, Ronner U (1992) The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling* **5**: 335-344

Jadamus A, Vahjen W, Simon O (2001) Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch Tierernahr* **54**: 1-17

Jensen, G. B., Andrup, L., Jacobsen, B. L., and Larsen, P. Mikrobiologiske insektbekæmpelsesmidler. 53. 2001. Copenhagen, National Institute of Occupational Health. AMI Rapport. Ref Type: Report

Jobin MP, Clavel T, Carlin F, Schmitt P (2002) Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol* **79**: 65-73

McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD (1995) A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic Sci* **45**: 95-105

Melling J, Capel BJ, Turnbull PC, Gilbert RJ (1976) Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J Clin Pathol* **29**: 938-940

Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127-141

Normander B, Christensen BB, Molin S, Kroer N (1998) Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* **64**: 1902-1909

Pedersen JC, Damgaard PH, Eilenberg J, Hansen BM (1995) Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field. *Can J Microbiol* **41**: 118-125

Ronner U, Husmark U, Henriksson A (1990) Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J Appl Bacteriol* **69**: 550-556

Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, Oggioni MR (2000) On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol* **151**: 361-368

Van der Auwera GA, Andrup L, Mahillon J (2005) Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC Genomics* **6**: 103.

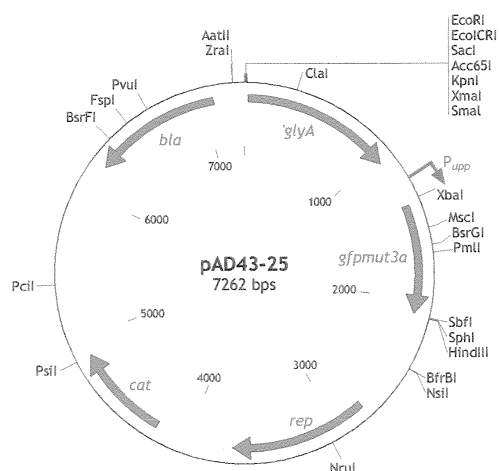
- 1.1 Kort over anvendt plasmid
- 1.2 Fremstilling af dosis-kulturer
- 1.3 DNA oprensning fra fæcesprøver
- 1.4 Anvendte primere og DGGE betingelser
- 1.5 DGGE kørsel
- 1.6 Sekventering af bånd fra DGGE geler
- 1.7 DGGE data fra *B. cereus* forsøget
- 1.8 DGGE data fra *Bt* subsp. *kurstaki* forsøget
- 1.9 DGGE data fra *Bt* subsp. *israelensis* forsøget
- 1.10 Formidling relateret til projektet
- 1.11 Trykt publikation

1.1 Kort over anvendt plasmid

Bacillus Genetic Stock Center

New Product Announcement February 2003

New Gram-Positive – *E. coli* Shuttle Vector With Constitutive Expression of Green Fluorescent Protein



BGSC Accession: ECE166 (see also ECE165)

Original Code: DH5α(pAD43-25)

Reference: Dunn, A. K., and J. Handelsman. 1999. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene* 226:297-305

Sequence: Not in database; available from BGSC at <http://www.bgsc.org/sequences/pAD43-25.htm>

Features:

- gfpmut3a* promoter-less gene encoding a variant of Green Fluorescent Protein from plasmid pFPV25 Valdivia, R. H. and S. Falkow. 1997. *Science* 277:2007-2011
- rep* Replication initiation protein from cryptic rolling circle plasmid pTA1060 (GenBank U32380) from *Bacillus subtilis* "natto"
- cat* encodes chloramphenicol acetyl transferase; selectable in either *E. coli* or *B. subtilis* (chloramphenicol 5 µg/ml)
- bla* encodes β-lactamase; selectable in *E. coli* only (ampicillin 100 µg/ml)
- 'glyA* last 1010 bp of the *Bacillus cereus* structural gene for glycine/serine hydroxymethyltransferase
- P_{upp}* constitutive promoter from the *Bacillus cereus* *upp* (uracil phosphoribosyltransferase) gene

Description: pAD43-25 is a shuttle vector, replicating in *E. coli* from the pBR322 origin and in *Bacillus* from the pTA1060 origin. A chromosomal fragment from *Bacillus cereus* UW85, containing the first 21 bp of the *upp* gene and all of its upstream regulatory regions, allows for high-level constitutive expression of a Green Fluorescent Protein variant.

Construction: pAD43-25 was constructed by ligating chromosomal DNA *Sau*3A fragments from UW85 into the pAD123 BamHI site and screening for clones that express high levels of GFP in *Bacillus cereus* during vegetative growth.

Use: The placement of the *B. cereus* UW85 *upp* promoter upstream of *gfpmut3a* allows for constitutive expression of a mutant GFP that has been optimized for use in fluorescence-activated cell sorting, with an optimal excitation wavelength of 498 nm. This shuttle vector should replicate in a wide variety of Gram-positive organisms along with *E. coli*. Plasmid pAD43-25 should serve as a useful marker for quantifying or sorting cells in a wide variety of applications.

Our thanks to Anne K. Dunn for donating pAD123 and pAD43-25 to the BGSC Collection!

1.2 Fremstilling af dosis-kulturer

Levende sporer (Hold 2):

1. Fra plade podes i 100 ml sporulationsmedium i ½ liter flaske tilsat rifampicin (20 µg/ml) eller streptomycin (40 µg/ml).
2. Inkuberer med ryst ved 30 °C i 1 uge, indtil ca. 90% af cellerne har dannet sporer, se fasemikroskopi.
3. Deles ud i 4 store centrifugerør. Centrifugerer ved 2000 g i 20 min ved 4 °C.
4. Supernatanten fjernes og der resuspenderes i koldt 96 % ethanol.
5. Der centrifugeres og supernatanten fjernes. Sporerne resuspenderes i koldt sterilt vand.
6. Herefter renses sporerne yderligere 2 gange ved skiftende centrifugering (2000 g, 20 min, 4 °C) og vask med sterilt vand.
7. Genopløs i 8 ml FKP, og frys ned ved -80 °C.

Stråledræbte sporer (Hold 1): Sporerne stråledræbes ved 50 kGray

Varmeaktiverede sporer (Hold 3): Sporerne behandles ved 80 °C i 15 min i portioner på 1½ ml på varmeklok

Vegetative celler (Hold 4):

1. Fra plade podes en koloni i 2 x 10 ml LB kultur tilsat rifampicin (50 mg/ml) eller streptomycin (100 µg/ml).
2. Rørene inkuberes n.o. ved 37°C med ryst.
3. Cellerne centrifugeres ned, vaskes 2 gange i sterilt vand, og genopløses i FKP.

Sporulationsmedie (Kim & Naylor, 1966):

Per liter:	Nutrient broth (Oxoid CM1)	8 g
	Yeast extract (Oxoid L21)	4 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O (Merck)	10 mg
	Dest. Vand	1000 ml

Ingredienserne blandes, evt. under opvarmning. pH justeres til 7,2.
Boullonen fyldes i flasker som autoklaveres.

1.3 DNA oprensning fra fæcesprøver

a) Homogenisering af fæces og fjernelse af debris

1. 1,5 ml af 10^{-1} fortyndingen centrifugeres ved 200 x g (2100 rpm) i 2 min.
2. Supernatanten overføres til et nyt rør og centrifugeres ved 12.000 x g (5500 rpm) i 5 min.
3. Supernatanten suges fra og pellet opløses i 1,2 ml TE-buffer (ved at suge væske op og ned med pipetten)

b) Mekanisk homogenisering og SDS behandling

1. Prøven overføres til et 2ml eppendorfrør med Zirconia beads (står på køl i kølerum)
2. 30 μ l 10% SDS tilsættes og prøven rystes i 4 min. i bead beater på High speed
3. Prøven centrifugeres ved 1000 x g (4500 rpm) i 20 sek.

c) Oprensning af DNA (Qiagen Mini Stool DNA kit)

1. 1,4 ml (mest muligt) supernatant overføres til et nyt rør
2. *Opbevar ved -20°C eller fortsæt direkte oprensningen.*
3. Tilsæt 1 InhibitEX tablet til hver prøve og vortex straks i 1 min. eller indtil tabletten er fuldstændigt opløst. Inkuber 1 min. ved stuetemperatur for at tillade inhibitorer at absorbere til InhibitEX matrixen.
4. Centrifuger prøven i 3 min. ved 13.000 rpm (20000 x g) for at fælde fæces partikler og inhibitorer bundet til Inhibit EX
5. Overfør straks supernatanten til et 1,5ml eppendorfrør og smid pellet ud. Centrifuger i 3 min. ved 13.000 rpm (20000 x g) for at fjerne resterende partikler/pellet
6. Apipeter 15 μ l Proteinase K i et 1,5ml eppendorfrør og tilsæt 200 μ l supernatant fra trin 5
7. Tilsæt 200 μ l buffer AL og vortex i 15 sek.
8. Inkuber ved 70°C i 10 min. Centrifuger kort for at fjerne dråber fra låget
9. Tilsæt 200 μ l 96% ethanol til lysatet og vortex. Centrifuger kort for at fjerne dråber fra låget.
10. Mærk låget af QIAamp kolonnen siddende i et 2 ml opsamlingsrør. Tilsæt forsigtigt lysatet fra trin 9. Luk låget og centrifuger i 1 min. ved 13.000 rpm (20000 x g).
11. Åben forsigtigt QIAamp kolonnen og tilsæt 500 μ l AW1. Luk låget og centrifuger i 1 min. ved 13.000 rpm (20000 x g). Placer QIAamp kolonnen i et nyt 2ml opsamlingsrør og smid røret med filtratet ud.
12. Åben kolonnen og tilsæt 500 μ l AW2. Luk låget og centrifuger i 3 min. ved 13.000 rpm (20000 x g).
13. Overfør kolonnen til et 1,5 ml eppendorfrør og afpipeter 200 μ l AE direkte ned i midten af QIAamp membranen.
14. Inkuber i 3 min. ved stuetemperatur og centrifuger derefter i 1 min. ved 13.000 rpm (20000 x g) for at eluere DNAét. Opbevar DNAét ved -20°C .

1.4 Anvendte primere og DGGE betingelser

Primere	Sekvens	PCR produkt/bp	DGGE	Målgruppe	Reference:
HDA1-GC	GC-clamp*-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT	200	25-65%, 9% PAAG	Alle bakterier	Walter et al., 2000
HDA2	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C				
Bact. 596F	TCA GTT GTG AAA GTT TGC G	287	35-55%, 9% PAAG	Subgruppe af Bacteroides	Vanhoutte et al., 2004
Bact. 826R-GC	GC-clamp**-GTR TAT CGC MAA CAG CGA				
Bact-0011	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	716 nested PCR: 200 bp	25-65%, 9% PAAG	<i>Lactobacillus</i> group	Heilig et al., 2002
Lab-0677	CAC CGC TAC ACA TGG AG				
g-Bifid F	CTC CTG GAA ACG GGT GG	596	40-70% 9% PAAG	Bifidobacterium	Matsuki et al., 2002; Vanhoutte et al., 2004
g-Bifid R-GC	GC-clamp**-GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A				

*GC-clamp: CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

**GC-clamp: CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C

Referencer:

Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D. and de Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:114-123.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H. and Tanaka, R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5445-5451.

Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E. and Swings, J. 2004. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:437-446.

Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. and Alatossava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303.

1.5 DGGE kørsel

Fremstilling af UF (opløsninger til DGGE)

Alle opløsninger fremstilles i stinkskab, da de er meget giftige

9% acrylamid: acrylamidebis 37.5:1

500ml 100% UF:

112,5 ml 40% premix AABIS

10 ml 50 x TAE

210 g urea

200 ml formamid

500ml 0% UF

112,5 ml 40% premix AABIS

10 ml 50 x TAE

377,5 ml milliporevand

De ønskede gradienter (f.eks. 25% og 65%) dannes udfra 0% og 100% opløsningerne.

Fremstilling af acrylamid gel i gradientblander:

- 18 ml gradient
- 190 µl 10% APS, amonumpersulfat
- 11 µl Temed

Blandes i gradientblander:

Den laveste gradient f.eks (25%) blandes i det venstre rør og luftboblen fjernes ved at åbne for gennemstrømning og derefter suge indholdet i modsatte rør op.

Derefter kommer den stærkeste f.eks (65%) gradient i højre rør og 10 % APS tilsættes hver rør, Der tændes for magnetomrøreren og rørene flyttes så der er optimal omrøring i begge rør.

Til sidst tilsættes Temed til hvert rør. (får gelen til at stivne).

Påsætning af prøver:

Brøndene renses forsigtigt med buffer (1*TAE) ved at bufferen suges op i en engangssprøjte og sprøjtes forsigtigt ud i brønden. Alle brønde skylles 2 gange.

Derefter tilsættes prøverne forsigtigt til brøndene efter et fastlagt skema.

Hver prøve indeholder 16µl .(13µl prøve og 3µl farvemiks).

Markør: Invitogen Cat no: 15628-050. fortyndes 20gange. (På gel ,6µl og 1µl farve)

Start af DGGE apparat:

DGGE apparatets top kommer oven på karret og der tændes for apparatet.

Temperaturen sættes til 60°C

Gelen kører i 16 timer ved 36 V og 28 mA.

Farvning af DGGE gel:

Farvebad fremstilles ved, at ½ l 1 × TAE blandes med 24 µl flourecrom farvestof i specielt farvekar. Gelen på glaspladen kommes i farvebadet og farves fra 45 minutter til 1 ½ time.

Foto af gel:

Gelen (på glasplade) løftes forsigtigt op ad vandbadet, og der kommes vand på lyspladen.

Overskydende vand fjernes og billede tages (ved både 302nm UV-B og 254nm UV-C) (invert)

Sikkerhed:

Der bruges handsker under hele arbejdet.

Alle sikkerhedsblade skal læses inden der arbejdes med DGGE, da mange af opløsningerne er meget giftige.

Gelen kasseres til Z-affald.

Div. opløsninger mærkes med faremærker.

1.6 Sekventering af bånd fra DGGE geler

1. Udskæring
2. S1 nuklease behandling
3. PCR+kloning
4. Elektroporation
5. Oprensning af plasmider
6. PCR-DGGE
7. Sekventering

1. Udskæring

- De ønskede bånd udskæres sterilt under UV-lampen – BESKYT ansigt og hænder!
- Placeres i sterile eppendorfrør hvortil der tilsættes 40 µl sterilt vand. DNA'et eluerer ud i vandet ved inkubering natten over ved 4°C

2. S1 nuklease behandling (Tannock et al., 2004)

- 33 µl af vandet (som indeholder DNA'et) behandles med 3 µl S1 nuklease (400 U/µl, Roche) og 4 µl 10x buffer (330 mM NaAc, 500 mM NaCl, 0.3 mM ZnSO₄, pH 4.5) i 1 time ved 37 °C
- Reaktionen stoppes ved at varme blandingen ved 95°C i 5 min.
- Prøver opbevares ved -80°C indtil videre brug

3. PCR + kloning (Knarreborg et al., 2002; Walter et al., 2000)

- S1 behandlet DNA bruges i en PCR med HDA1/2 primerne (uden GC-clamp):
HDA-kort: 94°C i 4 min
20 cykler: 94°C i 30 sek
56°C i 30 sek
68°C i 60 sek
68°C i 7 min.
- Til kloning benyttes TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen), findes i -20°C fryser (F112).
 - Bland 4 µl friskt PCR produkt med 1 µl fortyndet Salt Solution og 1 µl TOPO vector.
 - Bland og inkuber 5 min på bordet ved stuetemperatur
 - Placer blandingen på is.

4. Elektroporation

- Fremstil LB plader med ampicillin (50 µg/ml)
- Bland 2 µl fra kloningsreaktionen med 1 rør One Shot Electrocompetent *E. coli* (lille -80°C fryser)
- Overfør forsigtig blanding til kold elektroporationskuvette (Coli-lab)
- Elektroporation på Ec2 (Coli-lab)
- Tilsæt straks 250 µl opvarmet (37°C) S.O.C. medium (følger med kittet).
- Overfør blandingen til et 15 ml centrifugerør og ryst 1 time ved 37°C med løst låg.
- Udplad 20 og 200 µl på selektiv plade (LB +amp) og inkuber natten over ved 37 °C.

5. Plasmidoprensning

- Udvalg 5 kolonier fra hver plade og oprens plasmider v.h.a. Qiagen Mini Spin Prep.

6. PCR-DGGE

- Kør PCR med HDA1-GC/HDA2 primerne på programmet HDA-kort.
- Kør DGGE gel og sammenlign med oprindelig bånd, der blev skåret ud.
- Gem den stamme, som kun indeholder et bånd, og som befinder sig i den korrekte position.

7. Sekventering

- PCR produkt eller plasmid-oprensning sendes til MWG i Tyskland til sekventering. Primerne T3 og T7 kan bruges til sekventering.

Referencer:

Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B. and Tannock, G.W. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5918-5924.

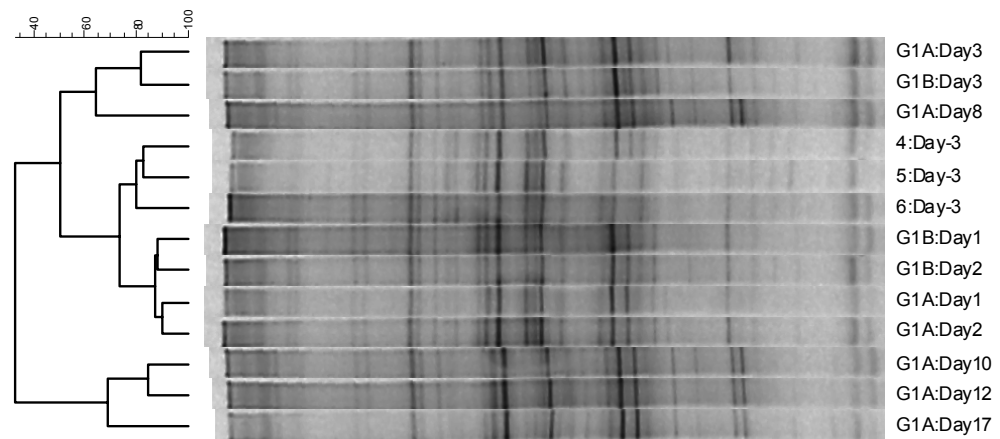
Tannock, G.W., Munro, K., Bibiloni, R., Simon, M.A., Hargreaves, P., Gopal, P., Harmsen, H. and Welling, G. 2004. Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2129-2136.

Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. and Alatossava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303.

1.7 DGGE data fra *B. cereus* forsøget

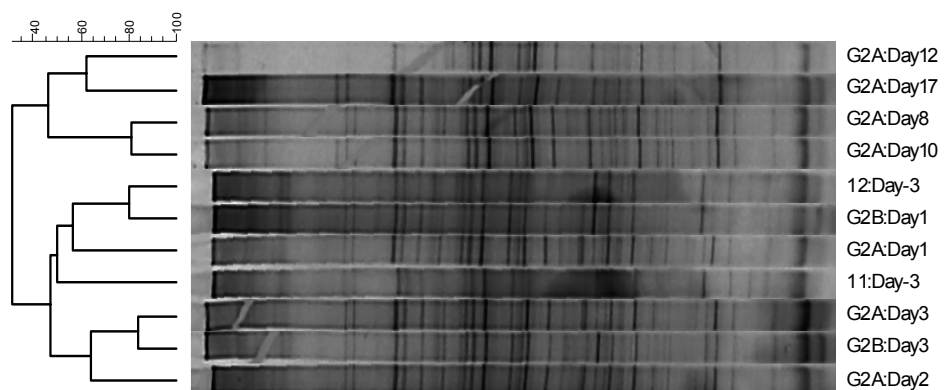
Hold 1, stråledræbte
sporer

Pearson correlation [14.0%-25.8%] [26.0%-89.6%] [89.8%-98.4%] [99.6%-100.0%]
DGGE-universal **DGGE-universal**



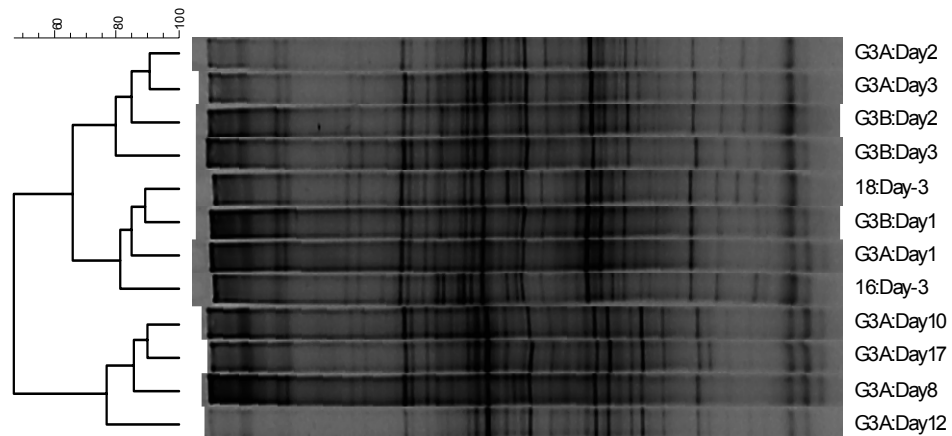
Hold 2, ubehandlede sporer

Pearson correlation [14.0%-25.8%] [26.0%-89.6%] [89.8%-98.4%] [99.6%-100.0%]
DGGE-universal **DGGE-universal**



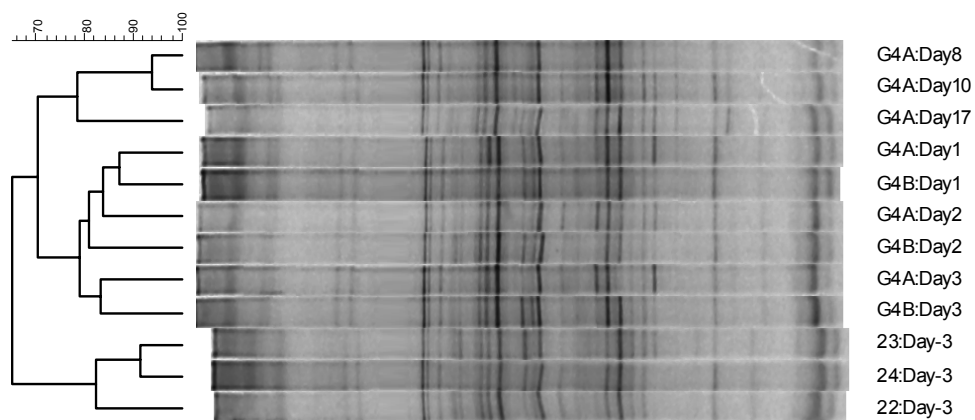
Hold 3, varmebehandlede

Pearson correlation (Opt 0.22%) [14.0%-25.8%] [26.0%-89.6%] [89.8%-98.4%] [99.6%-100.0%]
DGGE-universal **DGGE-universal**



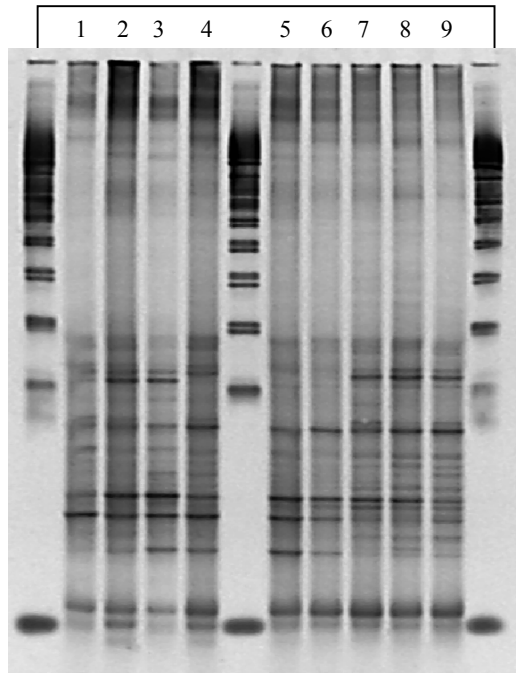
Hold 4, vegetative celler

Pearson correlation [14.0%-25.8%] [26.0%-89.6%] [89.8%-98.4%] [99.6%-100.0%]
DGGE-universal **DGGE-universal**

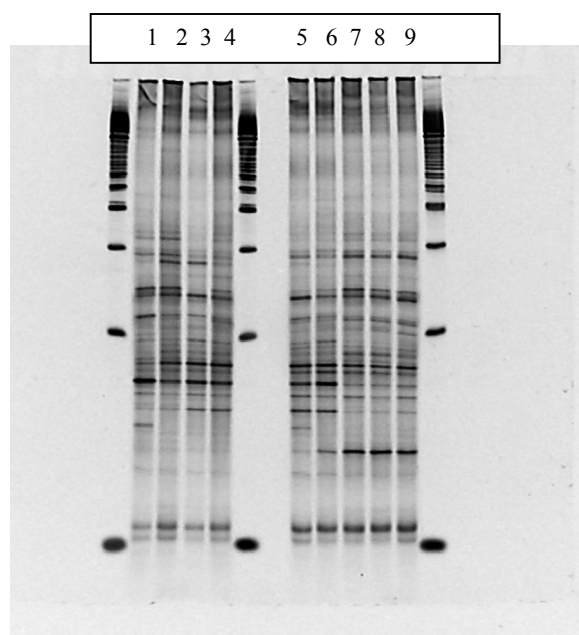


1.8 DGGE data fra *Bt* subsp. *kurstaki* forsøget

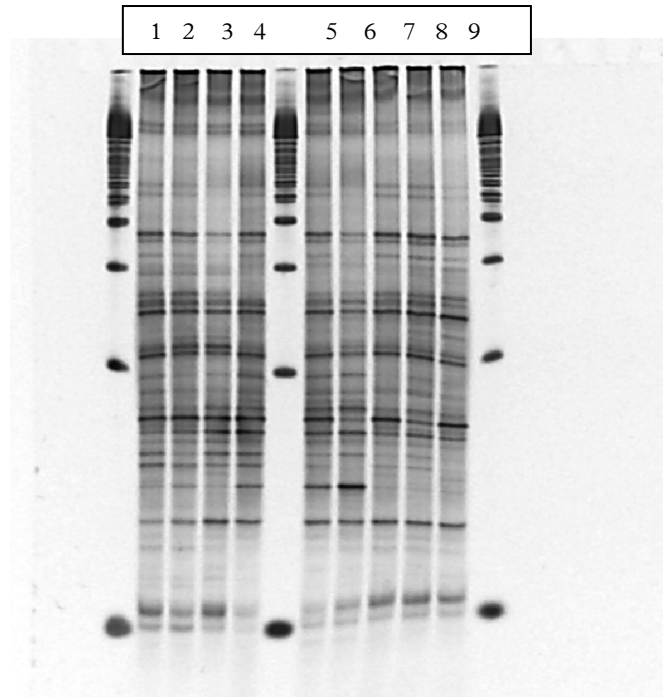
Figur 1.8.1. DGGE af Dyr 1 fra Hold 1. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



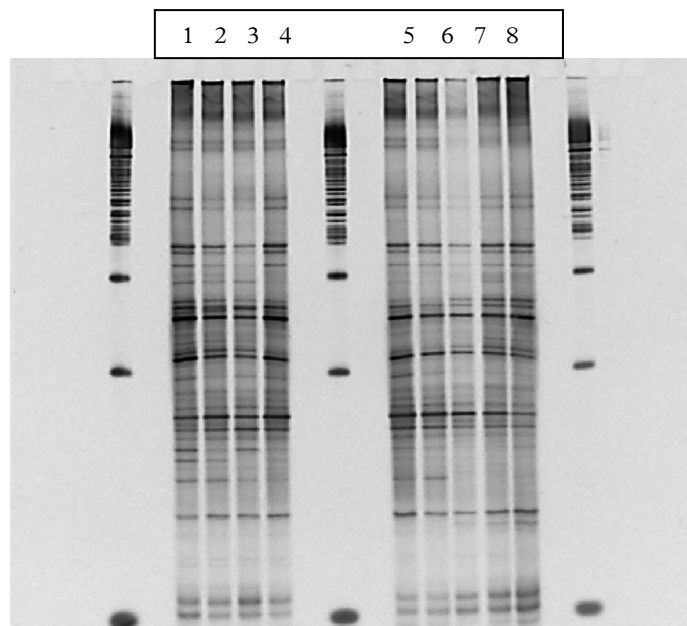
Figur 1.8.2. DGGE af Dyr 2 fra Hold 1. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



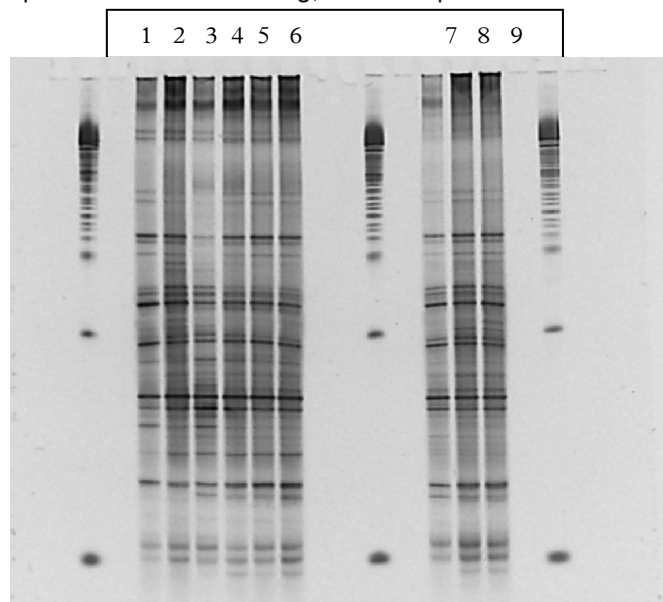
Figur 1.8.3. DGGE af Dyr 7 fra Hold 2. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



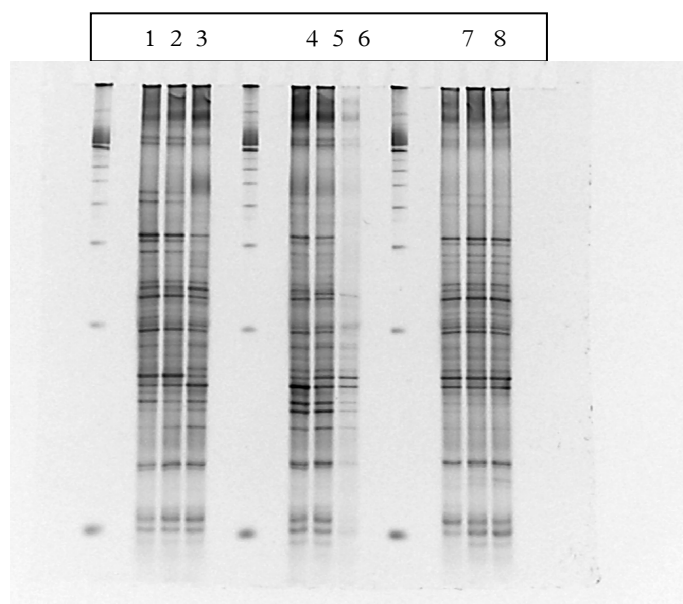
Figur 1.8.4. DGGE af Dyr 8 fra Hold 2. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



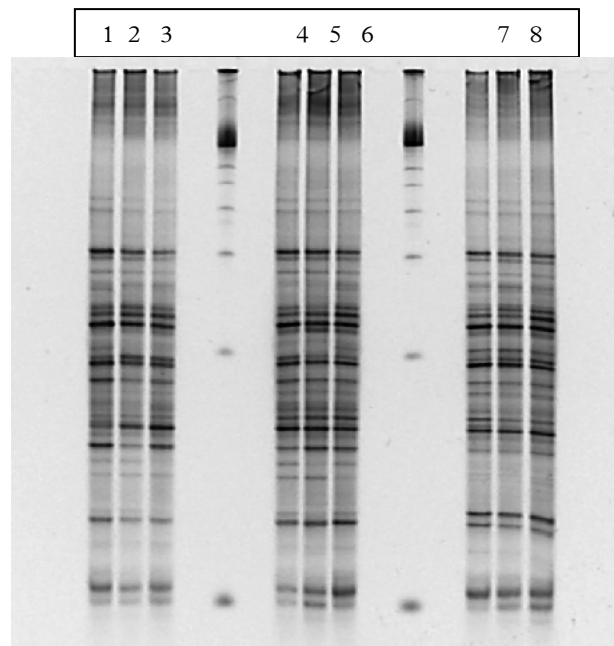
Figur 1.8.5. DGGE af Dyr 14 fra Hold 3. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



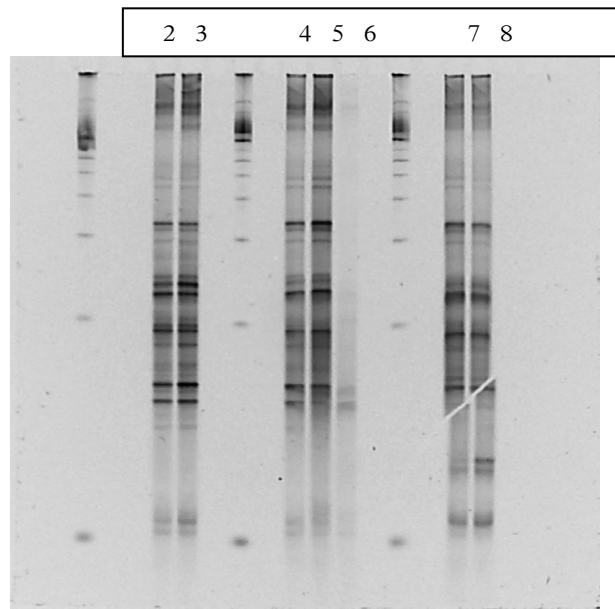
Figur 1.8.6. DGGE af Dyr 15 fra Hold 3. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



Figur 1.8.7. DGGE af Dyr 20 fra Hold 4. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.

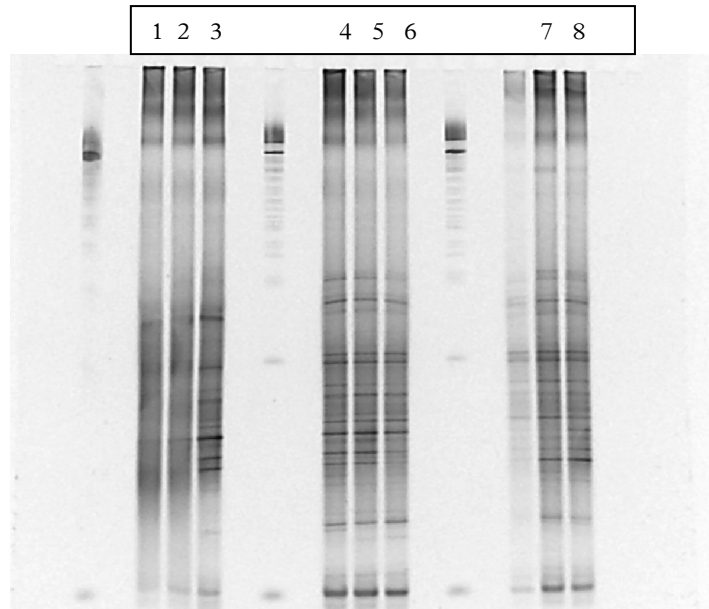


Figur 1.8.8. DGGE af Dyr 21 fra Hold 4. Bane 2-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-8: prøver efter dosering.

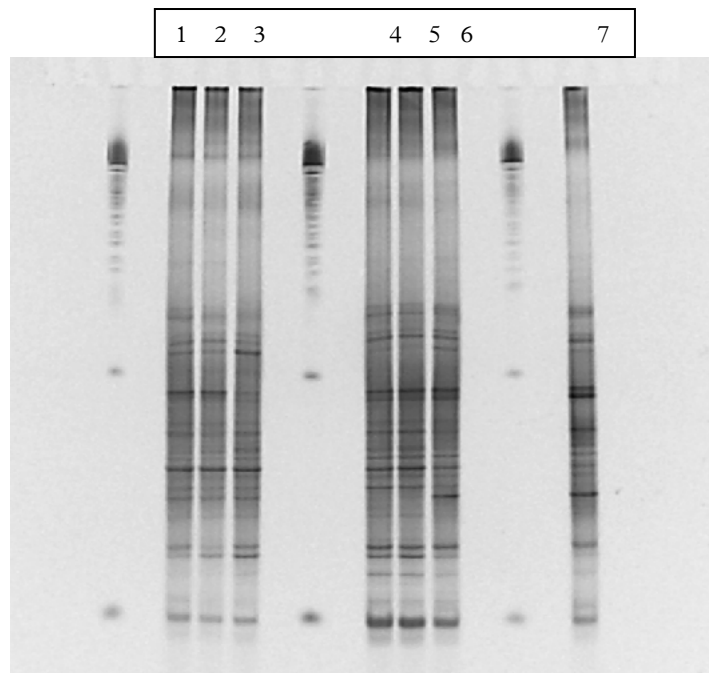


1.9 DGGE data fra *Bt* subsp. *israelensis* forsøget

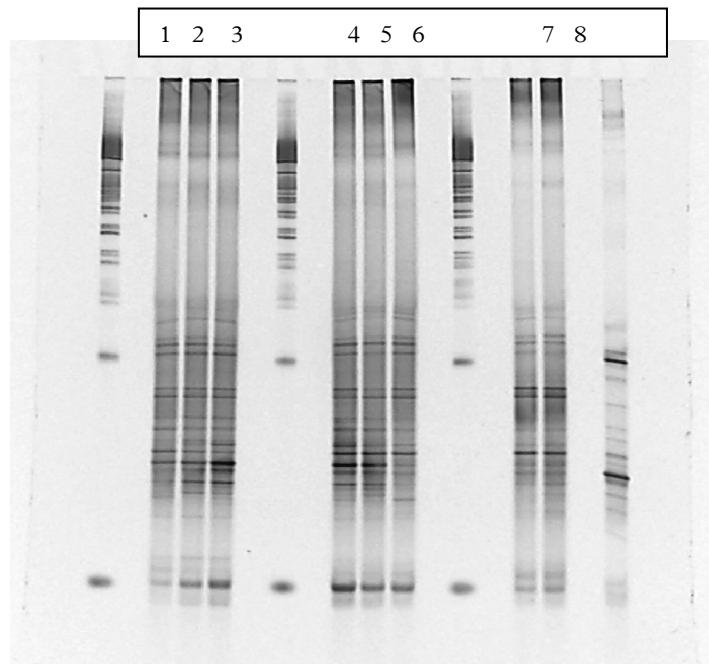
Figur 1.9.1. DGGE af Dyr 2 fra Hold 1. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



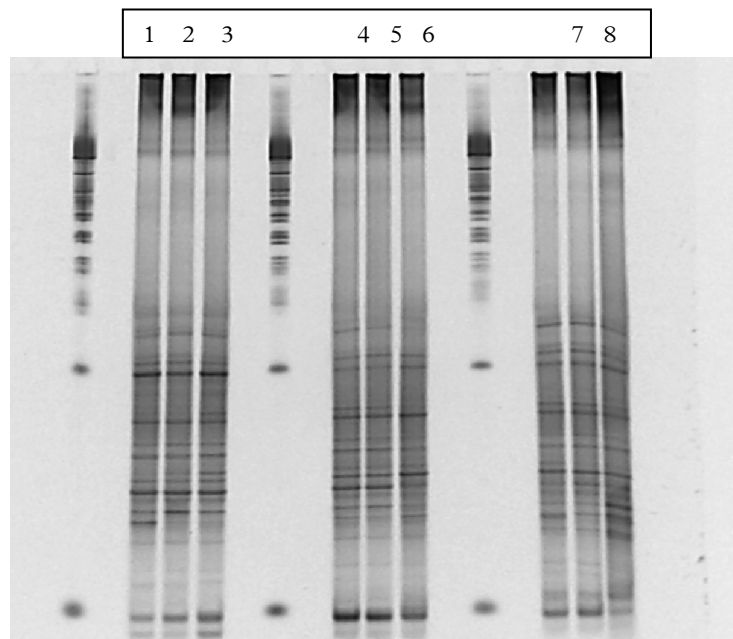
Figur 1.9.2. DGGE af Dyr 3 fra Hold 1. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7: prøve efter dosering.



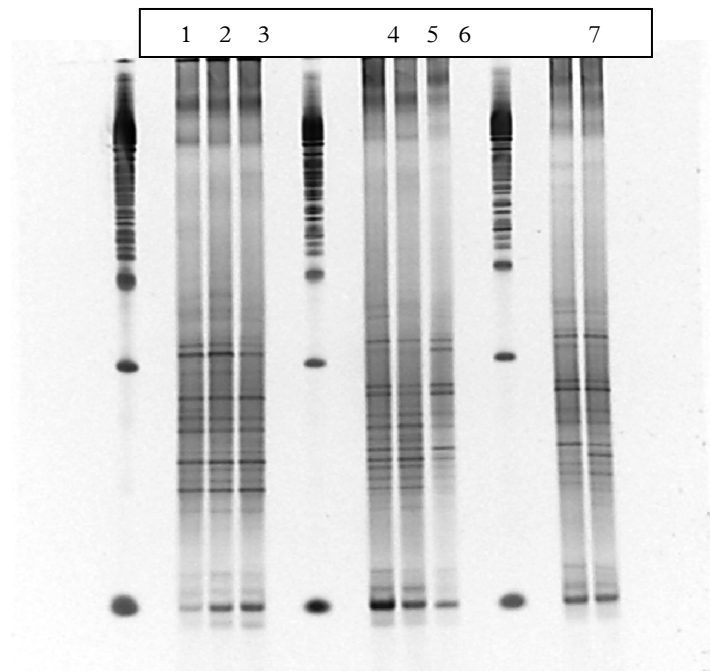
Figur 1.9.3. DGGE af Dyr 8 fra Hold 2. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-8: prøver efter dosering.



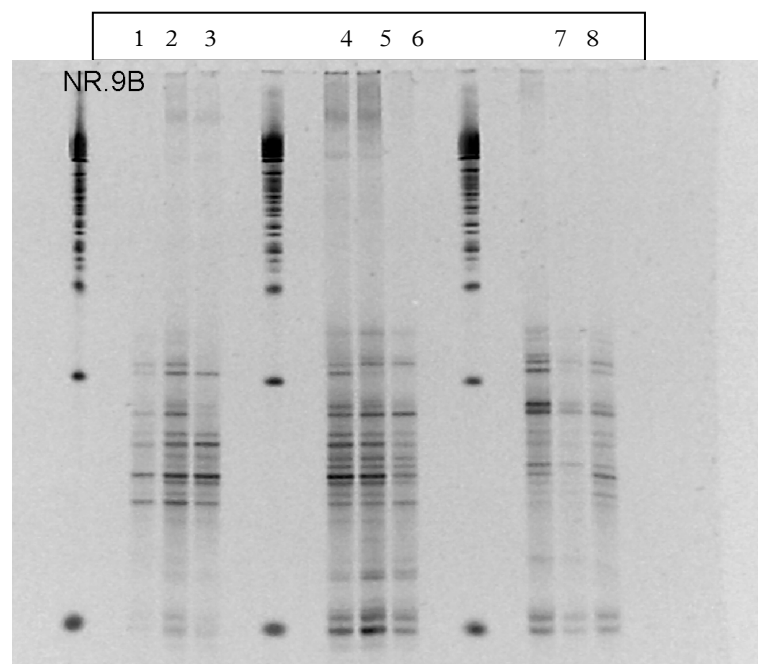
Figur 1.9.4. DGGE af Dyr 9 fra Hold 2. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



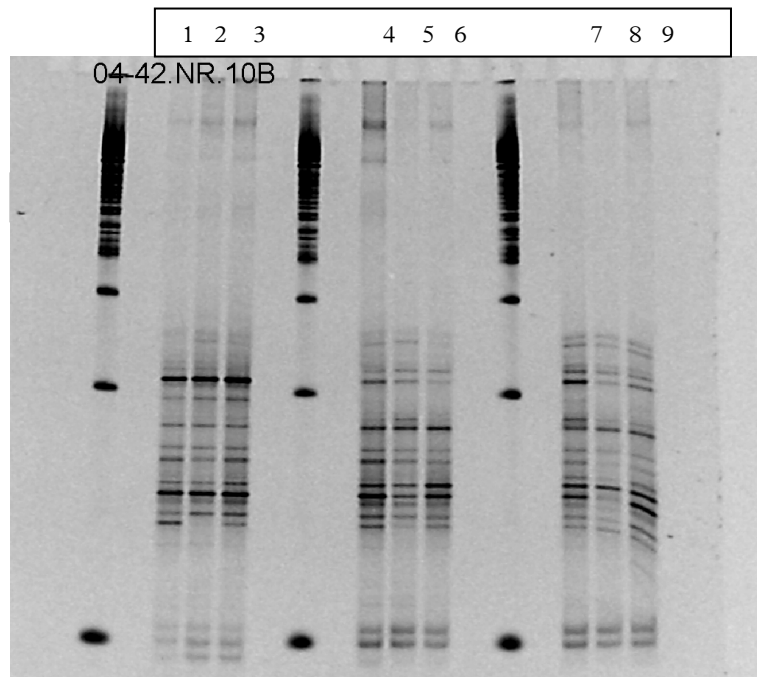
Figur 1.9.5. DGGE af Dyr 13 fra Hold 3. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering.



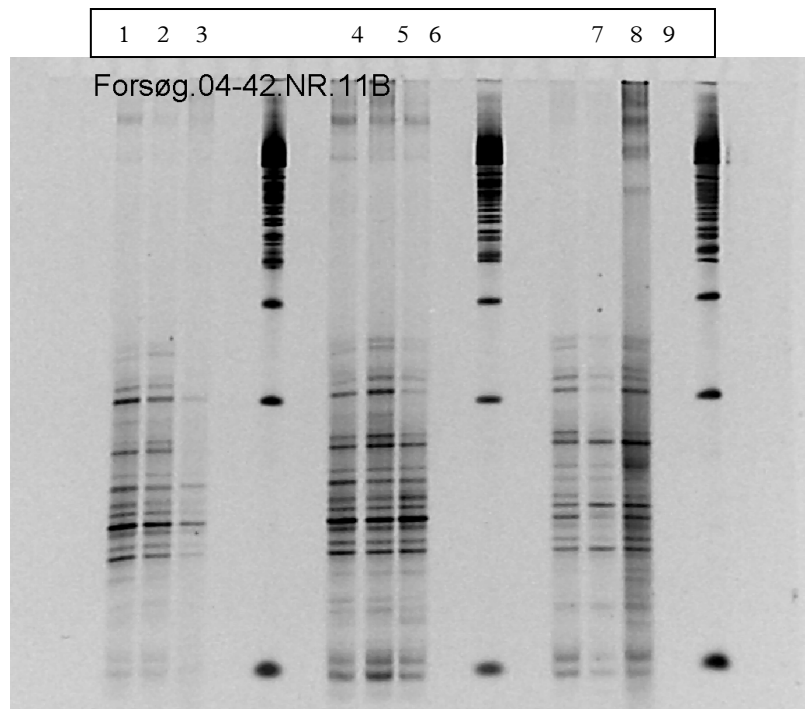
Figur 1.9.6. DGGE af Dyr 15 fra Hold 3. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering



Figur 1.9.7. DGGE af Dyr 20 fra Hold 4. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering



Figur 1.9.8. DGGE af Dyr 21 fra Hold 4. Bane 1-3: prøver fra før dosering; bane 4-6: prøver under dosering; bane 7-9: prøver efter dosering



1.10 Formidling relateret til projektet

Trykte publikationer

Wilcks, A., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B. and Licht, T.R. 2006. Fate and effect of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46:70-77.

Wilcks, A., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. Persistence of *Bacillus thuringiensis* in the gut of human-flora-associated rats. FEMS Immunol. Med. Microbiol. (accepteret, september 2006).

Wilcks, A., Smidt, L., Bahl, M.I., Hansen, B.M., Andrup, L., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. Colonization and conjugation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the intestine of gnotobiotic rats (foreløbig title). Manuskript under udfærdigelse.

Abstrakts

Wilcks, A., Smidt, L., Bahl, M.I., Hansen, B.M., Andrup, L., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. Germination and conjugation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the intestine of gnotobiotic rats. Gut microbiology: research to improve health, immune response and nutrition. Aberdeen, UK, juni 2005.

Licht, T.R., Wilcks, A., Rosenquist, H., Andersen, S.R., Hendriksen, N.B., Hansen, B.M., Smidt, L. and Andrup, L. 2003. Presentation of a future project: The fate of biopesticides in the human gut. Poster ved AMI-seminar om biologiske insekticider. København, november 2003.

Foredrag

Wilcks, A., Smidt, L., Bahl, M.I., Hansen, B.M., Andrup, L., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. Germination and conjugation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the intestine of gnotobiotic rats. COST 862 Workshop: Ecology of Bacteria used for Insect Control. Goniadz, Polen, maj 2006.

Wilcks, A., Smidt, L., Bahl, M.I., Hansen, B.M., Andrup, L., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. Germination and conjugation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the intestine of gnotobiotic rats. LMC Symposium on Food Microbiology. Gl. Avernæs, maj 2006.

Wilcks, A. 2005. Fate and effect of *B. thuringiensis* based insecticides in the human gut. COST 862 workshop: Bacterial toxins for insect control. Nitra, Slovakiet, september 2005.

Wilcks, A. 2004. Fate and effect of *B. thuringiensis* in rats. DMU workshop: Health and environmental risks by the use of organisms for biological control of pests and disease in agriculture. Helsingør, november 2004.

Licht, T.R. 2004. Mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidlers skæbne i mave-tarmkanalen. Miljøstyrelsens pesticidforskningsseminar. Kolding, januar 2004.

Publikationer og præsentationer indirekte relateret til projektet

Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jørgensen, K., and Wilcks, A. 2006. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. Appl. Environ. Microbiol. 72:3435-3440.

Rosenquist, H., L. Smidt, S.R. Andersen, G.B. Jensen and A. Wilcks. 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. FEMS Microbiol. Lett. 250:129-136.

Johansen, J.E., Hu, X., Hansen, B.M., Yuan, Z. and Eilenberg, J. Bioassay with mosquitos for evaluation of transconjugant *Bacillus* spp. containing the pBtoxis plasmid. Poster ved 37th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology & 7th International Conference on *Bacillus thuringiensis* Helsinki, Finland, August 1-4, 2004.

Licht, T. Biological control – assessment of health risks. Foredrag ved DMU-arrangeret workshop November 2004: 'Health and environmental risks by the use of organisms for biological control of pests and diseases in agriculture'.

Hansen, B.M. Enterotoxins – a potential risk of using *B. thuringiensis* products? Foredrag ved DMU-arrangeret workshop November 2004: 'Health and environmental risks by the use of organisms for biological control of pests and diseases in agriculture'.

Hansen, B.M. and Hendriksen, N.B. 2004. Emetic toxin and enterotoxins – a potential risk of using *B. thuringiensis* products. Præsentation ved 37th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology & 7th International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Helsinki, Finland, August 1-4, 2004.

Hendriksen, N.B. Occurrence of microbial pest control agents in food. Foredrag ved DMU-arrangeret workshop November 2004: 'Health and environmental risks by the use of organisms for biological control of pests and diseases in agriculture'.

Hendriksen, N.B. and Hansen, B.M. Occurrence of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* in field plots with curly kale (*Brassica oleracea acephala*). Poster ved 37th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology & 7th International Conference on *Bacillus thuringiensis* Helsinki, Finland, August 1-4, 2004.

Hu, X., Hansen, B.M., Eilenberg, J., Hendriksen, N.B., Smidt, L., Yuan, Z. and Jensen, G.B. Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a cry1Ac gene in *Bacillus cereus* group strains. Poster ved 37th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology & 7th International Conference on *Bacillus thuringiensis* Helsinki, Finland, August 1-4, 2004.

Rosenquist, H. The occurrence of *B. thuringiensis* in food. Foredrag ved DMU-arrangeret workshop November 2004: 'Health and environmental risks by the use of organisms for biological control of pests and diseases in agriculture'.

1.11 Trykt publikation



Fate and effect of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats

Andrea Wilcks¹, Bjarne Munk Hansen², Niels Bohse Hendriksen² & Tine Rask Licht¹

¹Department of Microbiological Food Safety, Danish Institute for Food and Veterinary Research, Søborg, Denmark and ²Department of Environmental Chemistry and Microbiology, National Environmental Research Institute, Roskilde, Denmark

Correspondence: Andrea Wilcks,
Department of Microbiological Food Safety,
Danish Institute for Food and Veterinary
Research, Mørkhøj Bygade 19, DK-2860
Søborg, Denmark. Tel.: +45 7234 7185;
fax: +45 7234 7698; e-mail: anw@dfvf.dk

Received 30 May 2005; revised 21 June 2005;
accepted 23 June 2005.
First published online 14 September 2005.

doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00007

Editor: Alex van Belkum

Keywords

Bacillus cereus; human-flora-associated rats;
DGGE; spores.

Abstract

The fate and effect of *Bacillus cereus* F4433/73R in the intestine of human-flora-associated rats was studied using bacteriological culturing techniques and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis in combination with cell assays and immunoassays for detection of enterotoxins. In faecal samples from animals receiving vegetative cells, only few *B. cereus* cells were detected. Spores survived the gastric barrier well, and were in some cases detected up to 2 weeks after ingestion. Selective growing revealed no major changes in the intestinal flora during passage of *B. cereus*. However, denaturing gradient gel electrophoresis analysis with universal 16S rRNA gene primers revealed significant changes in the intestinal microbiota of animals dosed with spores. Vero cell assays and a commercial kit (BCET-RPLA) did not reveal any enterotoxin production from *B. cereus* F4433/73R in the intestinal tract.

Introduction

The members of the *Bacillus cereus* family group include *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus weihenstephanensis*. Among those are bacteria that are harmful to humans, such as *B. anthracis*, causing anthrax, and *B. cereus*, responsible for food-borne illnesses. Others have beneficial effects, such as the insect pathogen *B. thuringiensis* that is used worldwide – for example, to combat malaria and as bioinsecticides applied in production of fruit and vegetables. However, the story of the *B. cereus* group is not unambiguous. Some strains of *B. cereus sensu stricto* are used as probiotics for humans (Jadamus *et al.*, 2001; Duc *et al.*, 2004), and biopesticides based on *B. thuringiensis* have been shown to be able to produce enterotoxins that are also produced by *B. cereus* strains known to cause food poisoning (Damgaard, 1995).

Human intake of members of the *B. cereus* group can therefore either be deliberately intended, as is the case for probiotics, or nonintended through ingestion of food contaminated with residues of commercially applied or naturally occurring strains. In both cases, the cells are primarily ingested as spores. In food poisoning cases caused by *B. cereus*

spores, the strains are believed to adhere to mucosal epithelium of the small intestine, and thereafter to germinate. The resulting vegetative cells produce enterotoxins responsible for diarrhoeal symptoms (Granum & Lund, 1997).

Regarding probiotic products based on *Bacillus* spores, it is unknown whether it is the spores or the vegetative cells that are responsible for the probiotic effect *in vivo*. The beneficial effect of other probiotics, such as lactic acid bacteria, has been ascribed to actively multiplying cells producing metabolic products or proteins in the intestine. One study indicates that *Bacillus subtilis* and *Bacillus clausii* spores transit unchanged in mice (Spinosa *et al.*, 2000), whereas recent evidence suggests that *B. subtilis* and *B. cereus* spores do germinate in the mouse gastrointestinal (GI) tract (Hoa *et al.*, 2001; Jadamus *et al.*, 2001; Casula & Cutting, 2002). Likewise, *B. cereus* spores have been shown to undergo germination as well as sporulation when administered to broiler chickens and piglets (Jadamus *et al.*, 2001). If *B. cereus* spores are capable of germination and subsequent metabolic activity in the GI tract, it could explain an effect on the indigenous intestinal microflora, because the vegetative cells are known to have antibiotic and antifungal properties (Stabb *et al.*, 1994), and to produce bacteriocins (Cherif *et al.*, 2003; Duc *et al.*, 2004).

The objectives of this study were to examine whether spores and vegetative cells of *B. cereus* F4433/73R were able to persist in the gut of human-flora-associated (HFA) rats, and if their presence influenced the composition of the indigenous gut flora. The strain F4433/73 is known to cause food poisoning (Granum *et al.*, 1993) and was therefore chosen as model organism for studies addressing *in vivo* enterotoxin production.

Materials and methods

Bacillus cereus vegetative cells and spore production

The strain *Bacillus cereus* F4433/73R (Hu *et al.*, 2004), a spontaneous rifampicin resistant mutant of the enterotoxigenic strain F4433/73 (Granum *et al.*, 1993) was used for inoculation of the animals. If not stated otherwise, the strain was grown in Luria–Bertani medium (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 50 µg mL⁻¹ rifampicin. For production of spores, the strain was grown in sporulation media (Kim & Naylor, 1996) containing 20 µg mL⁻¹ rifampicin for about 1 week at 30 °C. After centrifugation, the pellet was washed once with cold 96% ethanol and twice with cold sterile water. Finally, the cells were resuspended in saline supplemented with 0.1% peptone, and it was checked by phase contrast microscopy and heat treatment (80 °C, 15 min) that the suspension was free of vegetative cells. Killed spores were produced by irradiation at 50 kGy (Nunc, Roskilde, Denmark). Heat-activated spores were obtained by heating 8 mL of spores in a 80 °C water bath for 10 min. Vegetative cells were made by inoculation in Luria–Bertani bouillon containing 50 µg mL⁻¹ rifampicin and incubation overnight at 37 °C. CFU of the different dosage cultures were determined prior to dosage of the animals.

Preparation of human faecal flora

A faecal sample was obtained from a woman aged 32 years who had consumed a common diet, and had no recent history of GI disturbances or antibiotic treatment. The sample (kept at anaerobic conditions and below 5 °C for less than 12 h) was placed in an anaerobic chamber and diluted 10-fold in 50% Reinforced Clostridial Medium (Oxoid) containing 17% glycerol, homogenized and stored at -80 °C until use.

Animal experiment

Germfree Sprague–Dawley rats (5–7 weeks old) bred at the Danish Institute for Food and Veterinary Research were originally obtained from Taconic, (German town, NY, USA). The animals were caged in groups of three males or three

females and housed as previously described (Wilcks *et al.*, 2004). Prior to dosing with *B. cereus* F4433/73R, the cages were equipped with gridded floors to prevent coprophagy and filter tops to prevent aerosol contamination from one cage to another. To obtain HFA rats, the animals were dosed once (Day 21 of the experiment) with 1 mL of a 10% human faecal suspension that was allowed to establish in the animals for a period of 3 weeks. Subsequently, the animals were placed in four groups, each containing six animals. One group was dosed with irradiated spores, one group with untreated spores, one group with heat-activated spores, and the last group with vegetative cells. Each animal was inoculated either with approximately 10⁸ spores or with 10⁸–10⁹ vegetative cells per dosage. At Days 1–4 of the experiment, the animals received 1 mL of the respective dosage cultures. Half of the animals were sacrificed at Day 5 and the other half at Day 18 of the experiment. Intestinal and faecal samples were analysed as described below. The animal experiment was conducted according to Danish legislation.

Enumeration of bacteria

Faecal and intestinal samples (duodenum, ileum, caecum, and colon) were suspended in saline supplemented with 0.1% peptone. Lactobacilli were counted on Rogosa agar (Oxoid) after anaerobic incubation at 37 °C for 72 h. Coliforms and enterococci were enumerated after incubation at 37 °C for 24 h on MacConkey Agar no. 3 (Oxoid) and Slanetz & Bartley Medium (Oxoid) at 37 °C for 48 h, respectively. Total aerobic and anaerobic counts were obtained after growth on Reinforced Clostridial Agar (Oxoid) at 37 °C for 72 h in an aerobic or anaerobic atmosphere, respectively.

DNA extraction

Faecal samples from all animals were obtained at four independent days before dosage, three days during the week of dosage, and four independent days after dosage. A 2 mL quantity of 10⁻¹ dilutions of the faecal samples from three animals from each group was pooled and DNA was extracted by a method modified from Leser *et al.* (2000). Samples were centrifuged at 200 g for 2 min, and the supernatant was transferred to a new Eppendorf tube and centrifuged at 12 000 g for 5 min. The pellet was resuspended in 1.2 mL TE-buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). The suspension was transferred to a 2 mL Eppendorf tube containing approximately 500 mg of 100 µm zirconia–silica beads (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, USA). A 30 µL quantity of 10% sodium dodecyl sulfate was added, and the bacteria were lysed by shaking for 4 min on a bead beater (Mixer Mill MM 300, Retsch, Haan, Germany) at 30 Hz.

After centrifugation at 1000 *g* for 20 s, the supernatant was transferred to a new tube, and stored at -20°C prior to DNA isolation by use of QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

PCR amplification with universal and group-specific primers

Universal as well as group-specific primers were used for amplification. Aliquots of 10 μL of the extracted DNA were applied to the following to give a 50 μL PCR mixture: 20 μL of Eppendorf[®] Mastermix ($2.5\times$) (Eppendorf) and 40 pmol of each primer. For amplification with the universal primers HDA1-GC/HDA2 (Walter *et al.*, 2000), PCR was run in a Peltier Thermal Cycler PTC-225 (MJ Research, Bio-Rad, Waltham, MA, USA) as a touchdown PCR. Initial denaturation was at 96°C for 5 min, amplification was carried out using 20 cycles, including denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 65°C for 1 min decreased by 0.5°C for each cycle, and extension at 72°C for 1 min. This was followed by additional five cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C at 5 min. The PCR program for the *Bacteroides* primers Bact.596F/Bact826R-GC was described previously (Vanhoutte *et al.*, 2004). For amplification of products using primers against *Lactobacilli* (Bact-0011/Lab-0677) (Kane *et al.*, 1993; Heilig *et al.*, 2002) and *Bifidobacteria* (g-Bifid1/g-BifidR) (Matsuki *et al.*, 2002; Vanhoutte *et al.*, 2004), another PCR program previously described was used (Heilig *et al.*, 2002). PCR products were purified with Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and used as templates in a nested PCR with the universal bacterial primers HDA1-GC and HDA2.

DGGE

The DGGE was carried out using a DCode[™] Universal Mutation Detection System instrument and gradient former model 475 according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The denaturing gradient was formed with two 9% acrylamide (acrylamide-bis 37.5:1) stock solutions (Bio-Rad Laboratories) in $1\times\text{TAE}$ (20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 M EDTA, pH 7.4). The gels were made with denaturing gradients ranging from 25% to 65%. The 100% denaturant solution contained 40% formamide and 7 M urea. A 13 μL quantity of PCR product was mixed with 3 μL loading dye before loading. Gels were run in $1\times\text{TAE}$ at 60°C for 16 h at 36 V, 28 mA, stained with the fluorescent dye Gelstar (BioWhittaker, Cambrex, Vällensback, Denmark) for 45 min, and viewed by UV transillumination. The gels were analysed using the

BIONUMERICS software, version 3.00 (Applied Maths, Keisstraat, Belgium).

Recovery of bands from DGGE gels and sequencing

Prominent DGGE bands were identified for nucleotide sequencing. Each selected band was excised with a sterile razor, placed in 40 μL sterile water, and incubated at 4°C overnight for diffusion of DNA into the water. A 33 μL quantity of the sterile water (containing the DNA) was treated with S1 nuclease (Tannock *et al.*, 2004). The S1-nuclease-treated DNA was used in a PCR with HDA1/2 primers without GC-clamp (4 min at 94°C , 20 cycles consisting of 30 s at 94°C , 30 s at 56°C , 1 min at 68°C , and finally 7 min at 68°C). Subsequently, the PCR products were directly cloned into pCR[®]4-TOPO (Invitrogen, Taastrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions, and electroporated into electrocompetent *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen) with a single pulse (2500 V, 400 Ω , 25 μF) by use of Gene Pulser apparatus (Bio-Rad Laboratories). Plasmid DNA was isolated from the cells using the Qiagen Mini Spin Prep kit (Qiagen), and subjected to PCR (HDA1/2-GC) as earlier described. The PCR product was run on a DGGE gel to check the purity and confirm the melting behaviour of the excised band. The inserts were sequenced by MWG (Ebersberg, Germany) using primers T3 and T7. The obtained sequences were compared to known sequences in the GenBank database using the BLASTN algorithm (Altschul *et al.*, 1990).

Enterotoxin assays

Vero cells (DSMZ no. ACC33) were obtained from the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (Department of Human and Animal Cell Cultures, Braunschweig, Germany) and were cultivated as recommended by the supplier. Bacterial strains (Table 1) to be analysed in a Vero cell assay were shaken overnight in Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid) supplemented with 1% glucose (BHIG). For detection of Vero toxic substances, 20 μL overnight bacterial culture was added per mL BHIG, and the cultures were cultivated at 271 r.p.m. at 32°C for 6 h, after which the cultures were cooled on ice. The cultures were centrifuged at 15 000 *g* for 3 min at 4°C , and the supernatant was filtrated through a 0.2 μm sterile filter to remove any remaining bacteria. Extraction of potential toxic substances from the rat intestinal samples was performed as described in the BCET-RPLA kit (Oxoid). Bacterial culture supernatants as well as intestinal extracts were stored at -80°C until use. The extracts were thawed on ice and the Vero cell assay was performed as described by Cherif *et al.*

Table 1. Vero toxicity of reference strains and strain included in the rat feeding experiment

Strain	Characteristics	Dilution factor*
<i>Bacillus cereus</i> F4433/73	Isolated from diarrhoeal food poisoning case (Granum <i>et al.</i> , 1993)	160
<i>Bacillus cereus</i> BCIP 5832	Probiotic for humans and domestic animals (Hansen & Salamiou, 2000)	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407 δ PicR	Inactivated PicR (Salamiou <i>et al.</i> , 2000)	< 10
<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> HD-1	Kills lepidopteran insect larvae	80
<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> DMU67R	Danish field isolate, indistinguishable from HD-1 (Pedersen <i>et al.</i> , 1995)	80
<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> HD-567	Kills dipteran insect larvae	640
<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i> NB-125	Kills coleopteran insect larvae	80

*The dilution factor is the number of times the bacterial extract has been diluted to obtain at least 50% survival of Vero cells.

(2003). The BCET-RPLA toxin detection kit (Oxoid) was used for detection of the L2 component of the haemolysin BL toxin.

Results

Survival and persistence of *Bacillus cereus* F4433/73R in HFA rats

No *Bacillus cereus*-like bacteria were detected in faeces from animals dosed with irradiated spores (negative control). In faecal samples from animals dosed with vegetative cells, *B. cereus* F4433/73R was detected at a concentration of 10^2 CFU g⁻¹ during the first week of dosing, and in a single animal (Animal 19) at the end of the experiment (data not shown).

Untreated spores and heat-activated spores showed the same survival in the gut, and in one animal, *B. cereus* cells could be detected even 2 weeks after the last dosage (Fig. 1).

No *B. cereus* F4433/73R cells were detected in intestinal contents in any of the animals dosed with vegetative cells at

Day 5. However, in a single animal (Animal 19) from this group, F4433/73R was found in caecum and colon (Table 2). At Day 5, all animals receiving spores, either untreated or heat-activated, had F4433/73R in the contents of caecum and colon at a concentration of 10^4 – 10^6 CFU g⁻¹, whereas the bacteria could only be detected in the duodenum of one animal and in the ileum of three animals out of six. Two weeks after the last dosing with F4433/73R, only one animal (Animal 13) dosed with heat-activated spores had detectable numbers of F4433/73R in colon (Table 2) and in faecal samples (Fig. 1).

Heat treatment (-80°C , 10 min) of intestinal (caecum and colon) and faecal samples followed by selective plating showed that F4433/73R was present in all samples as spores (data not shown).

Enumeration of specific bacterial populations by selective growing

No changes ($P > 0.05$) in the faecal *Lactobacillus* and enterococci population could be demonstrated after dosing with *B. cereus* F4433/73R. A decrease ($P < 0.05$) was observed in the aerobic, anaerobic and coliform faecal populations during dosing for all animal groups, including those dosed with irradiated spores (data not shown).

Only very few significant ($P < 0.05$) differences were observed between the four groups of animals in the numbers of selected bacterial groups from intestinal samples taken at Day 5 (data not shown). However, in the ileum, a significantly lower number of *Lactobacilli* were present in the group dosed with heat-activated spores as compared with the group dosed with vegetative cells. In caecum, the number of coliforms was significantly lower in the two groups dosed with live spores than in the group dosed with irradiated spores. The numbers of total aerobic and anaerobic bacteria in the colon were lower in the group dosed with heat-activated spores than in the other three groups.

No significant effect ($P > 0.05$) on the selected bacterial populations from intestinal samples could be observed at Day 18 (data not shown).

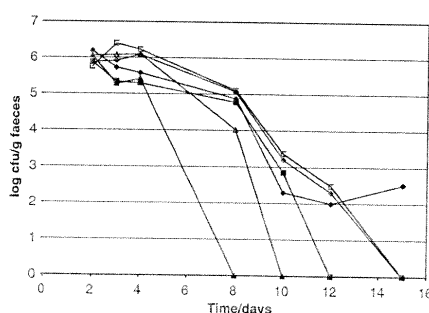


Fig. 1. Occurrence of *Bacillus cereus* F4433/73R in the faeces of six HFA rats dosed with 10^6 spores, which were either untreated (open symbols) or heat-activated (filled symbols, Animal 13 $\diamond$). Limit of detection was 100 CFU g⁻¹ faeces.

Table 2. Presence of *Bacillus cereus* F4433/73R in intestinal samples from HFA rats, dosed either with untreated spores, heat-activated spores, or vegetative cells

Intestinal sample	Concentration of <i>B. cereus</i> F4433/73R (log CFU g ⁻¹ intestinal content)					
	Day 5			Day 18		
	Untreated spores	Heat-activated spores	Vegetative cells	Untreated spores	Heat-activated spores	Vegetative cells
Duodenum	< *	2.00 (1/3)	<	<	<	<
Ileum	2.30 (1/3) [†]	1.98 ± 0.45 (2/3)	<	<	<	<
Caecum	5.02 ± 0.18 (3/3)	5.14 ± 0.49 (3/3)	<	<	<	1.36 (1/3)
Colon	5.70 ± 0.09 (3/3)	5.45 ± 0.06 (3/3)	<	<	2.83 (1/3)	1.85 (1/3)

* < indicates that the number of cells were below detection limit (10 CFU g⁻¹ intestinal sample).

[†]Number in parentheses indicate how many animals were positive out of total number of animals tested.

Comparison of faecal microflora studied by PCR-DGGE

No effect of dosing with the three forms of *B. cereus* F4433/73R on the *Bacteroides*, the *Lactobacillus* group, or the *Bifidobacterium* group was observed by computerized analysis of PCR-DGGE data carried out with rDNA primers specifically targeting these groups. Similarly, PCR-DGGE carried out with universal primers showed no effects of dosing, with neither irradiated spores nor vegetative cells (data not shown). However, PCR-DGGE data from animals dosed with live spores (either untreated or heat-activated) revealed a clear clustering between the bacterial populations that were present in the animals before, during and after dosage, as evidenced by principal component analysis (Fig. 2). Alterations in the profiles were observed to result from

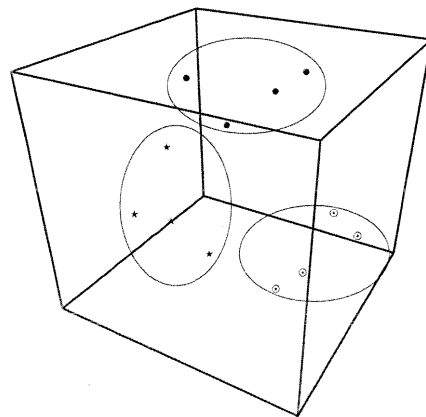


Fig. 2. Principal component analysis of DGGE profiles obtained with universal primers on faecal samples from animals receiving heat-activated spores of *Bacillus cereus* F4433/73R. The samples cluster together in samples taken before (★), during (●) and after (○) dosing.

changes in the presence/absence of bands or staining intensity of specific DNA fragments (Fig. 3). Cloning and sequencing revealed that band A was 100% identical to *Ruminococcus obeum* (AY169419), band B was 98% identical to *Fusobacterium* sp. (AB064909), band C was 96% identical to uncultured chicken caecal and rumen bacteria (AB075624, AB034126), and band D was 95% identical to an uncultured mouse intestinal bacterium (AJ400267) in the GenBank database (Fig. 3).

Vero toxicity of culture extracts from selected *Bacillus* strains

Comparison of the Vero toxicities of a number of strains belonging to the *B. cereus* group showed that strain *B. cereus* F4433/73 used in our experiments, was the second most toxic out of seven tested strains (Table 1). *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* HD-567 (commercially used as pesticide) showed the highest Vero toxicity. The limit of detection of *in vitro* Vero toxic activity from *B. cereus* F4433/73 was estimated to correspond to 10⁶ CFU of this strain per mL (data not shown).

Detection of *in vivo* enterotoxin production

Generally, no Vero toxicity was observed in faecal and intestinal samples from rats fed *B. cereus* F4433/73R. In a few samples, including also samples from rats dosed with irradiated spores, a Vero toxic activity of 10–20 (dilution factor) was detected. However, further analysis of these samples with the Oxoid BCET-RPLA test kit, which detects the L2 component of the haemolytic enterotoxin HBL and is shown to have a very low detection limit, revealed no presence of toxin.

Discussion

Bacillus cereus cells are primarily ingested as spores, either as probiotics or food contaminants. The present study shows

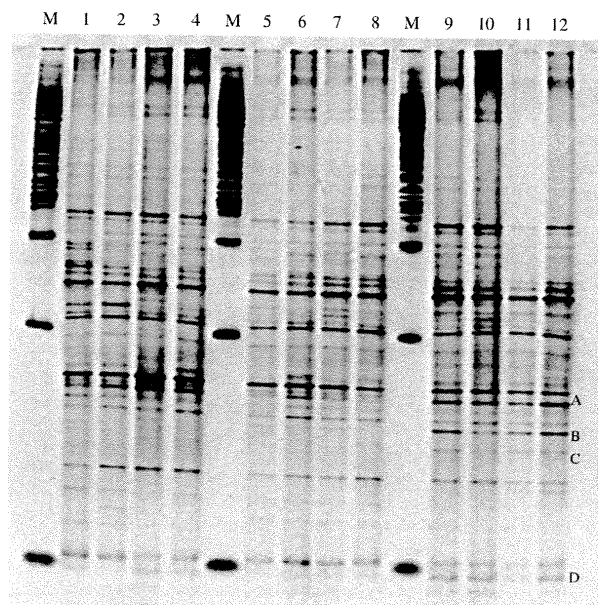


Fig. 3. PCR-DGGE profiles generated from faecal samples of animals dosed with heat-activated spores of *Bacillus cereus* F4433/73R by use of universal primers HDA1-GC and HDA2. Lanes: 1–4, samples from individual animals before dosing; 5–8, pooled samples from animals during dosing; 9–12, pooled samples from animals after dosing; M, marker, 100 bp (Invitrogen). The fragments were allocated by sequence analysis to the following genera: fragment A, *Ruminococcus obeum*; fragment B, *Fusobacterium* sp; fragment C, unculturable chicken caecal and rumen bacterium; fragment D, unculturable bacterium.

that it is the spore of these bacteria which is able to persist through the GI tract. In intestinal samples from five out of six animals dosed with *B. cereus* F4433/73 as the vegetative cells, no viable *B. cereus* cells were detected. In consistence with our observations, a recent study shows that vegetative cells of *B. cereus* F4433/73 are sensitive to simulated gastric fluid with a pH below 4.5 (Clavel *et al.*, 2004), whereas spores of the same strain are resistant to pH 1.5 for several hours. Also, heat-activated spores of strain F4433/73R are resistant to this low pH in simulated gastric fluid (A. Wilcks, unpublished results). The low detection of *B. cereus* cells in animals dosed with vegetative cells may therefore be explained by the fact that only very few cells are able to survive the gastric barrier. Still, *B. cereus* F4433/73R was detected in the intestine of a single animal dosed with vegetative cells even 2 weeks after last dosing, indicating that in this particular animal the cells somehow had survived the gastric barrier and probably multiplied.

Heat activation of spores prior to dosing (which is relevant in the context of ingestion of heat-treated food) did not affect their ability to persist in the intestinal environment. The highest concentrations of untreated as well as heat-activated spores were detected during the week of dosing; afterwards, the concentration of *B. cereus* cells rapidly declined. If the spores had passed through the GI tract as inert objects not undergoing germination and

proliferation, it would be expected that they were completely eliminated from the intestine after about 6 days (Mathers *et al.*, 1997). Nevertheless, low concentrations of *B. cereus* spores were still detected in some animals 2 weeks after dosing. It has been shown that *B. cereus* spores are more hydrophobic than other *Bacillus* spores (Ronner *et al.*, 1990; Andersson *et al.*, 1998), and that the spore surface is covered with appendages (Husmark & Ronner, 1992). This may enable *B. cereus* spores to adhere to the epithelial surface, thus explaining the continuous shedding of *B. cereus* spores throughout the experiment. However, in a single animal the number of spores excreted in faeces increased at the end of the experiment, indicating that germination, multiplication and subsequent sporulation took place in the intestine.

Consistent with our observations, other studies have shown that *Bacillus* spores are able to persist and occasionally germinate in the intestinal tract. Three *B. cereus* strains were shown to persist in the mouse GI tract up to 18 days postadministration (Duc *et al.*, 2004), further one animal study showed that the number of spores of *B. subtilis* excreted in faeces of mice in some cases were higher than the original inoculum (Hoa *et al.*, 2001). Use of a sensitive reverse transcription-PCR assay for detection of vegetative cells in the small intestine have substantiated the fact that *Bacillus* spores do germinate in the GI tract of mice (Casula & Cutting, 2002), and spores have been detected in intestinal

samples from piglets administered vegetative cells (Jadamus *et al.*, 2001). Together with the present study, these studies indicate that spores do occasionally germinate in the nutrient-rich small intestine, and subsequent spore formation may be a good strategy for survival in the more hostile and nutrient-scarce environment of the large gut.

We used traditional microbiological methods as well as DGGE to study the quantitative and qualitative effect of strain F4433/73R on the gut microflora. Enumeration of bacterial groups in faecal samples revealed changes in all groups, making it impossible to claim any special effects of live spores or vegetative cells on the cultured bacterial taxonomic groups. The only effect observed was a significant reduction in the number of coliforms isolated from intestinal samples from animals dosed with live spores in comparison with those dosed with irradiated spores. This is in accordance with another study showing that coliforms were significantly reduced in numbers in intestinal samples from piglets fed the probiotic *B. cereus* var. *toyoi* (Jadamus *et al.*, 2002). However, in the present study we could not observe any effect on the coliform population 2 weeks after administration of *B. cereus*, so we conclude that this effect as determined by quantitative cultivation was transient.

DGGE analysis of faecal samples by use of primers detecting all eubacterial 16S rRNA sequences showed a clear shift in the bacterial community in all animals receiving live spores. The first change in the composition was observed during dosage with the *B. cereus* spores, and yet another change occurred after cessation of dosage. Interestingly, the flora did not return to the original composition observed prior to dosage (Fig. 2). Sequence analysis of bands, which had visibly changed revealed that some of the changes occurred in populations of *Ruminococcus*, *Fusobacterium* and various unculturable genera. Because the spores did not germinate in the intestine (except perhaps in one animal), we must conclude that the spores have the ability to change the intestinal composition of bacteria even in the absence of an active metabolism. We speculate that this could be an indirect effect of the interaction of the spores with the intestinal epithelium, which might affect factors such as mucin production, immune stimulation and occupation of specific adhesion sites.

Comparative Vero cell assays on seven selected strains belonging to the *B. cereus* group showed that the toxic activity of *B. cereus* F4433/73R was the second highest among the tested strains (Table 1). In spite of this, no production of enterotoxins by *B. cereus* F4433/73R was detected in the rat intestine by use of cell assays as well as an immunological kit. This was predictable, because our experiments showed that the strain was present in the intestine as spores.

It has been hypothesized that rodents are an unsuitable model for investigations of the potential for human illness

by *B. cereus* (Bishop *et al.*, 1999). The rat gut physiology may not allow the bacterial spores to germinate and the cells subsequently to produce enterotoxins, whereas the conditions in the human digestive tract may be more conducive of attachment and germination (Andersson *et al.*, 1998). This hypothesis is supported by the work presented here.

Acknowledgements

We thank Anne Ørningreen and her department for professional handling of the animals, and Bodil Madsen and Tina Thane for excellent technical assistance. This project was supported by the Danish Environmental Protection Agency.

References

- Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Andersson A, Granum PE & Ronner U (1998) The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int J Food Microbiol* **39**: 93–99.
- Bishop AH, Johnson C & Perani M (1999) The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. *World J Microbiol Biotechnol* **15**: 375–380.
- Casula G & Cutting SM (2002) *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2344–2352.
- Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D & Boudabous A (2003) Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. *J Appl Microbiol* **95**: 990–1000.
- Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C & Schmitt P (2004) Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* **97**: 214–219.
- Damgaard PH (1995) Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**: 245–250.
- Duc IH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO & Cutting SM (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2161–2171.
- Granum PE & Lund T (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 223–228.
- Granum PE, Brynestad S & Kramer JM (1993) Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol* **17**: 269–279.
- Hansen BM & Salamitou S (2000) Virulence of *Bacillus thuringiensis*. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (Charles JR, Delecluse A & Nielsen-LeRoux D,

- eds), pp. 41–64. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD & de Vos WM (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 114–123.
- Hoa TT, Duc LH, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca E, Van PH & Cutting SM (2001) Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3819–3823.
- Hu X, Hansen BM, Eilenberg J, Hendriksen NB, Smidt L, Yuan Z & Jensen GB (2004) Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cryIAc* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 45–52.
- Husmark U & Ronner U (1992) The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling* **5**: 335–344.
- Jadamus A, Vahjen W & Simon O (2001) Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch Tierernahr* **54**: 1–17.
- Jadamus A, Vahjen W, Schafer K & Simon O (2002) Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **86**: 42–54.
- Kane MD, Poulsen LK & Stahl DA (1993) Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **59**: 682–686.
- Kim J & Naylor HB (1996) Spore production by *Bacillus stearothermophilis*. *Appl Microbiol* **14**: 301–302.
- Leser TD, Lindecrone RH, Jensen TK, Jensen BB & Møller K (2000) Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3290–3296.
- Mathers JC, Smith H & Carter S (1997) Dose-response effects of raw potato starch on small-intestinal escape, large-bowel fermentation and gut transit time in the rat. *Br J Nutr* **78**: 1015–1029.
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H & Tanaka R (2002) Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5445–5451.
- Pedersen JC, Damgaard PH, Eilenberg J & Hansen BM (1995) Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field. *Can J Microbiol* **41**: 118–125.
- Ronner U, Husmark U & Henriksson A (1990) Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J Appl Bacteriol* **69**: 550–556.
- Salamitou S, Ramisse F, Brehelin M, Bourguet D, Gilois N, Gominet M, Hernandez E & Lereclus D (2000) The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* **146**: 2825–2832.
- Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G & Oggioni MR (2000) On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol* **151**: 361–368.
- Stabb EV, Jacobson LM & Handelsman J (1994) Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4404–4412.
- Tannock GW, Munro K, Bibiloni R, Simon MA, Hargreaves P, Gopal P, Harmsen H & Welling G (2004) Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2129–2136.
- Vanhoutte T, Huys G, De Brandt E & Swings J (2004) Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 437–446.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K & Alatosava T (2000) Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* **66**: 297–303.
- Wilks A, Van Hoek AH, Joosten RG, Jacobsen BB & Aarts HJ (2004) Persistence of DNA studied in different *ex vivo* and *in vivo* rat models simulating the human gut situation. *Food Chem Toxicol* **42**: 493–502.