

Kan mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler give mave-problemer?

Det er et åbent spørgsmål, om nogle af de mikrobiologiske bekæmpelsesmidler kan give sygdomme. Det er derfor nødvendigt at have eksperimentelle analyse-metoder (modeller), som på en tilfredsstillende måde kan bruges til at undersøge dette spørgsmål. I dette projekt har vi undersøgt om en række nye ”sygdoms- modeller” kan bruges til formålet. Resultaterne viser, at de afprøvede modeller er gode alternativer til de eksisterende. De skal bruges så man sammenligner med såvel kendte ufarlige som sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

Baggrund og formål

Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler er alternativer til de kemiske midler. De betragtes ofte – relativt ukritisk - som mere miljøvenlige og som ufarlige for mennesker.

I dette projekt har vi undersøgt om det ved hjælp af tre forskellige typer af ”sygdoms-modeller” kan forudsiges om et mikrobiologisk plantebeskyttelsesmiddel kan give mave-problemer. De tre undersøgte eksperimentelle analyse-metoder (sygdoms-modeller) er en rundorm med navnet *Caenorhabditis elegans*, larver af sommerfuglen ”Det store Voksmøl”, og forskellige celler fra pattedyr. De tre modeller har tidligere været anvendt til den samme slags undersøgelser med andre mikroorganismer.

De aktuelle undersøgelser er blevet gennemført med bakterier fra fire forskellige plantebeskyttelsesmidler. Bakterierne tilhører arten *Bacillus thuringiensis*, og de kan bruges til at bekæmpe forskellige insektlarver. I Danmark bruges de mest til bekæmpelse af kålorme på friland og af sørgemyg i drivhuse.

Vi valgte disse bakterier fordi man ved de har et potentiale for at forårsage sygdom, hvis de bliver spist. Dette skyldes, at de har nogle egenskaber, som er kendt for at kunne give sygdom hos den nært beslægtede bakterie *Bacillus cereus*. Det har derfor været vigtigt i projektet at sammenligne bakterierne fra bekæmpelsesmidlerne med på den ene side bakterier, som er kendt for at kunne give sygdom, og på den anden side med bakterier, som ikke giver sygdom. Resultaterne fra

undersøgelserne kan bruges til at vurdere de mikrobiologiske bekæmpelsesmidlers mulige effekter på mennesker. Desuden har projektet tilvejebragt viden om anvendelse af sygdoms-modeller, der ikke er pattedyr, som jo ellers anvendes i mange sammenhænge, og som derfor måske kan spare på anvendelsen af pattedyr som forsøgsdyr.

Undersøgelsen

Projektet er gennemført af forskere ved Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet, Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet og fra INRA instituttet i Frankrig. Projektet er blevet udgivet som en engelsksproget rapport med titlen "New experimental approaches for human risk assesment of microbial pest control agents – exemplified by the bacterium *Bacillus thuringiensis*". Projektet er blevet gennemført som en del af Miljøstyrelsens program for bekæmpelsesmiddel forskning.

Hovedkonklusioner

Hovedkonklusionerne fra projekter er:

- At de undersøgte nye sygdoms-modeller er gode til at skelne mellem de forskellige bakterier, hvilket ikke er tilfældet med dem der benyttes til at undersøge mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i dag. Det betyder, at de er et godt alternativ til disse modeller.
- At studier vedrørende mikroorganismer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidlers patogene egenskaber bør gennemføres på en måde, så der sker en sammenligning med mikroorganismer, som er kendt for at kunne være patogene og med mikroorganismer som ikke er patogene.
- At vurdering af mikroorganismer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler ikke kan baseres på en enkelt forsøgsmodel. Dette skyldes, at mikroorganismernes eventuelle potentiale til at forårsage sygdom er komplekst og påvirkes af mange forskellige faktorer.
- At funktionelle cellemodeller er meget følsomme. Deres anvendelse er afhængig af deres tilgængelighed og forskningsmæssig ekspertise i relation til deres anvendelse og fortolkning af resultaterne. De tre modeller som er blevet afprøvet i dette projekt er alle anvendelige og relevante i forhold til risikovurdering, men set ud fra en praktisk synsvinkel synes den model, som er kendt som cytotoksicitets-testen, at være den mest anvendelige.

- Modellerne baseret på Voksmøl og rundorme er simple og effektive til at undersøge sygdoms-potentiale. De er nemme at anvende og resultaterne er relativt enkle at analysere, men erfaring er også her påkrævet for at kunne anvende og fortolke resultaterne.
- De fire undersøgte bakterier isoleret fra plantebeskyttelsesmidlerne Agree, Vectobac, Dipel og Novodor falder med hensyn til sygdoms-fremkaldende potentiale i to grupper. Bakterierne fra Agree og Vectobac er mest sammenlignelige med to uproblematiskke bakterier, mens bakterierne fra Dipel og Novodor er sammenlignelige med de fire bakterier fra sygdomstilfælde. Det er dog ikke muligt at konkludere, at nogle af bakterierne med sikkerhed vil kunne forårsage sygdom hvis de spises.

Projekresultater

Projektets hovedspørgsmål ”Kan mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler give mave-problemer hos mennesker?” er blevet belyst ved at sammenligne resultater opnået med fire bakterier isoleret fra plantebeskyttelsesmidler med resultater opnået med omhyggeligt udvalgte nærtbeslægtede bakterier. Disse bakterier blev udvalgt så de repræsenterede såvel bakterier som har været involveret i sygdom og diarre, som bakterier der ikke forårsager sygdom. Udvalget bestod i alt af fire bakterier af arten *Bacillus thuringiensis* fra plantebeskyttelsesmidler, fire nærtbeslægtede bakterier der har været involveret i sygdom og diarre og to bakterier som sandsynligvis ikke kan forårsage sygdom.

Baggrunden for at en spore-dannende bakterie, som *Bacillus thuringiensis* kan forårsage sygdom i mave-tarm systemet er skitseret i figur 1. Det er naturligvis en forudsætning, at bakterien spises i en eller anden form for fødevarer, og at den derefter er i stand til at overleve ophold i maven, hvor der er surt og hvor der er forskellige enzymer. I tyndtarmen, som er det sted sygdom oftest ”opstår”, skal bakterien kunne spire og dele sig, ligesom den skal kunne overleve de betingelser som er her, f.eks. påvirkning af galdealte og forskellige enzymer. Samtidigt skal bakterien, for at kunne forårsage sygdom, kunne udtrykke de giftige faktorer som forårsager sygdom, fordi de er giftige over for tarmcellerne. Bakterierne kan måske også binde sig til og endog invadere tarmcellerne. I dette projekt er en række af de forhold som påvirker bakterierne i mave-tarm-systemet blevet undersøgt. Det drejer sig om hvorvidt bakterierne er i stand til at vokse ved legemstemperatur

(37°C) og overleve under betingelser der er ligner forholdene i maven og påvirkning af galdesalte. Bakteriernes evner til at påvirke celler er blevet undersøgt i en række forskellige modeller:

- Bakteriernes evne til at binde sig til, invadere celler og ødelægge forbindelserne mellem cellerne er blevet undersøgt med forskellige celler fra mennesker
- Bakteriernes udtryk af forskellige gift-faktorer blevet undersøgt i én celletype og i voksmøllet.
- Den direkte giftige virkning af bakterierne er blevet undersøgt med celler fra mennesker,, i larver af voksmøllet og i rundormen.

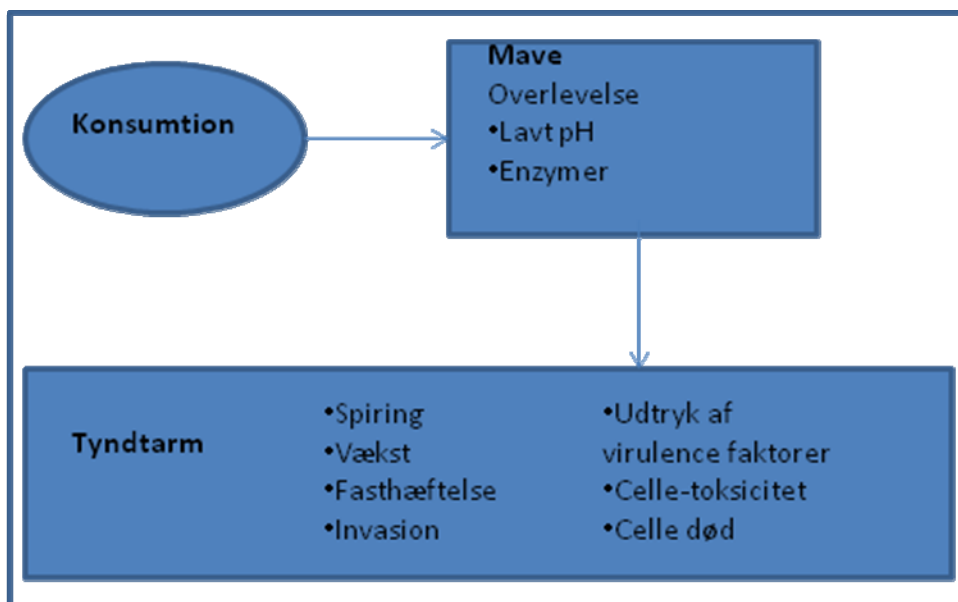
På basis af resultaterne har vi lavet en såkaldt ”cluster”-analyse, som gør det muligt på en overskuelig måde at sammenligne resultaterne opnået med de ti bakterier. Analysen kan bruges til at ordne observationer, så de bliver opdelt i grupper (clustre) som er ensartede. Resultatet af cluster-analysen er vist i figur 2. Det kan ses af figuren, at hvis man sammenligner de fire stammer fra de mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler (Bt50, Bt52, Bt53 og Bt55) med de fire stammer fra sygdomstilfælde (Bc11, Bc14, Bc25 og Bc38) og de to stammer som ikke kan forårsage sygdom (Bt48 og Bc49), så falder Bt50 og Bt52 sammen med de to uproblematisk stammer Bt48 og Bc49, mens de øvrige stammer falder i to beslægtede grupper som består af henholdsvis Bc38, Bc14 og Bc25 og Bt53 samt Bc11 og Bt55.

Sammenlignes denne opdeling med resultaterne kan man sige, at Bt50 og Bt52, som er isoleret fra bekæmpelsesmidlerne Agree og Vectobac på mange måder opfører sig ens i eksperimenterne. De har begrænset vækst ved 43°C og de overlever betingelserne i maven. De påvirker på forskellig måde den ene celletype, i mindre grad den anden og har kun en begrænset effekt på den tredje type. De har en begrænset effekt på såvel voksmøllet som rundormen. Alt i alt er disse to stammer, som det ses af clusteranalysen, mest sammenlignelige med de to uproblematisk stammer. Det ser altså ud til at disse to stammers potentiale for at fremkalde sygdomme er mindre end hos stammerne fra sygdomstilfældene.

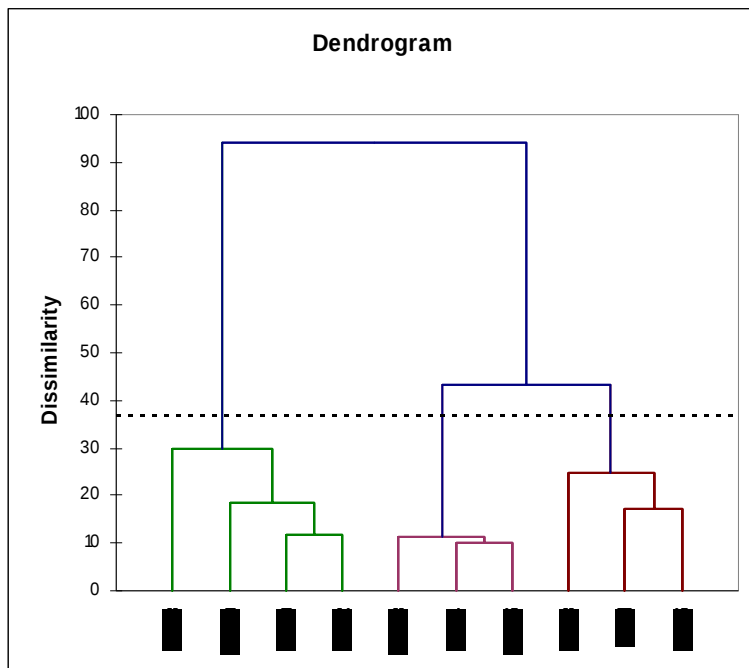
På samme måde kan man sige at stammerne Bt53 og Bt 55 isoleret fra Dipel og Novodor også på mange måder opfører sig ens i eksperimenterne. De vokser udmærket ved 43°C, de bliver skadet af betingelserne i maven, de påvirker alle cellelinierne på en negativ måde, og de har også en sammenlignelig negativ effekt på voksmøllet. Derimod påvirker de to stammer rundormen forskelligt, idet Bt55 har en betydelig negativ effekt på rundormen, mens Bt53 har en mindre udtalt effekt. Overordnet betragtet er disse to stammer mest sammenlignelige med stammerne fra

sygdomstilfældene. De ser altså ud til at have et potentiale for at fremkalde sygdomme som ikke adskiller sig fra stammerne fra sygdomstilfældene. Hovedforskellen mellem disse to stammer og de sygdomsfremkaldende stammer er, at de skades af betingelserne i maven.

Er vi så ved at nærme os et svar på spørgsmålet i overskriften? Nej ikke helt, men vi har fået metoder, som gør det muligt mere præcist at udtale sig om hvorvidt specifikke mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler har et potentiale for at give mave-problemer.



Figur 1. De basale forudsætninger for at en spore-dannende bakterie kan forårsage sygdom i mave-tarm-kanalen.



Figur 2. Dendrogram baseret på en cluster-analyse, som viser hvordan de ti undersøgte bakteriestammer forholder sig til hinanden på basis af alle resultaterne opnået i projektet.