



Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen

# Human eksponering for mikrobiologiske bekæmpelses- midler, deres naturligt forekommende slægtninge og andre mikroorganismer

Anne Mette Madsen<sup>a</sup>, Vinni Mona Hansena<sup>b</sup>,  
Nicolai Vitt Meyling<sup>b</sup>, Niels Bohse Hendriksen<sup>c</sup>,  
Anne Winding<sup>c</sup>, Kira Tendal Kock<sup>a</sup> og Jørgen Eilenberg<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø,

<sup>b</sup> Institut for Jordbrug og Økologi, Københavns Universitet,

<sup>c</sup> Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet

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

<b>FORORD</b>	<b>5</b>
<b>SAMMENFATNING</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>10</b>
<b>1 BAGGRUND OG FORMÅL</b>	<b>13</b>
<b>2 BIOLOGI AF UDVALGTE ARTER TIL BIOLOGISK BEKÆMPELSE</b>	<b>15</b>
2.1 INSEKTPATOGENE BAKTERIER	15
2.2 INSEKTPATOGENE SVAMPE	17
2.3 MIKROORGANISMER MOD PLANTEPATOGENE SVAMPE	20
<b>3 BIOAEROSOLER</b>	<b>23</b>
3.1 BIOAEROSOL KOMPONENTER	23
3.2 FORESLÅEDE GRÆNSEVÆRDIER OG GRÆNSEVÆRDIER	29
<b>4 METODER</b>	<b>31</b>
4.1 GARTNERIER DER ER LAVET EKSPONERINGSMÅL I	31
4.2 LUFTPRØVER I GARTNERIER	33
4.3 UDE-REFERENCE MÅL	34
4.4 ANALYSER AF LUFTPRØVER	34
4.5 MYKOTOKSIN ANALYSER	35
4.6 INDSAMLING AF GRØNSAGER	35
4.7 BEHANDLING AF GRØNSAGERNE	36
4.8 KVANTIFICERING AF <i>TRICHODERMA</i> SPP., <i>BACILLUS CEREUS</i> OG <i>BEAUVERIA</i> SPP.	36
<b>5 RESULTATER</b>	<b>43</b>
5.1 UDVIKLING AF METODE TIL TIL DETEKTION AF <i>TRICHODERMA</i> SPP. OG <i>T. HARZIANUM</i> SU	43
5.2 EKSPONERING AF LUFTVEJENE	44
5.3 POTENTIEL EKSPONERING FRA GRØNSAGER	58
<b>6 DISKUSSION</b>	<b>69</b>
6.1 EKSPONERING AF LUFTVEJENE	69
6.2 POTENTIEL EKSPONERING FRA GRØNSAGER	73
6.3 UDVIKLING AF METODE TIL IDENTIFIKATION AF <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> SU	75
6.4 EN STRUKTUREL FORKLARINGSMODEL FOR <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> SKÆBNE PÅ GRØNSAGER	75
<b>7 KONKLUSION</b>	<b>79</b>
7.1 BAGGRUNDSEKSPONERING FOR MIKROORGANISMER ANVENDT TIL BIOLOGISK BEKÆMPELSE	79
7.2 EKSPONERING FOR BIOLOGISK BEKÆMPELSESPRODUKTER	80
7.3 EKSPONERING FOR ANDRE BIOAEROSOL KOMPONENTER	81
<b>8 PERSPEKTIVERING</b>	<b>83</b>
8.1 EKSPONERING FOR MIKROBIOLOGISKE BEKÆMPELSESMIDLER	83

8.2	<b>EKSPONERING FOR ANDRE BIOAEROSOL KOMPONENTER</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCER</b>	<b>85</b>
	Bilag A Ordforklaring	93

# Forord

Denne rapport beskriver resultaterne opnået under projektet 'Human eksponering for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, deres naturligt forekommende slægtninge og andre mikroorganismer, som er gennemført i perioden februar 2008 til september 2010. Projektet blev delvist finansieret af Miljøstyrelsens program for bekæmpelsesmiddelforskning. Projektets overordnede formål er at tilvejebringe ny viden som kan anvendes i dansk og international risikovurdering af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, der anvendes ved grønsagsdyrkning. Resultaterne er fremkommet ved et samarbejde mellem Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet (Anne Winding, Niels Bohse Hendriksen), Det National Forskningscenter for Arbejdsmiljø (Anne Mette Madsen, Vinni Mona Hansen, Kira Tendal) og Institut for Jordbrug og Økologi, Københavns Universitet (Jørgen Eilenberg, Nicolai Vitt Meyling). 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, Christina Bøje (Miljøstyrelsen), Jesper Lund-Larsen (Fagligt Fælles Forbund 3F), Jesper Bælum (Odense Universitetshospital), Kirsten Friis (Bayer A/S), Michael Nielsen (Videncentret for Landbrug), Carsten Suhr Jacobsen (GEUS).

Vi vil også gerne takke gartnerierne og de mange gartneriarbejdere, der har været involveret i projektet, for deres hjælp og velvillige bistand til projektets gennemførelse. Uden denne positive medvirken til projektet ville det ikke kunnet gennemføres.



# Sammenfatning

Anvendelse af mikroorganismer til biologisk bekæmpelse kan føre til øget eksponering for disse mikroorganismer. Udbringningsmetode, valg af biologisk bekæmpelsesmiddel og afgrøde tyder på at have stor betydning for eksponeringsniveauet. Brug af mikrobiologisk bekæmpelse kan føre til en moderat øgning af den humane eksponering via luften i dagene efter udbringning. Anvendelsen af bakterier kan øge den humane eksponering for disse bakterier via grønsager betydeligt. Den naturlige eksponering for arter af mikroorganismer, som anvendes til mikrobiologisk bekæmpelse, er lav, eksponeringen vil derfor ofte være større ved anvendelse af mikrobiologisk bekæmpelse. Derimod er den samlede eksponering for mikroorganismer via luften oftest højere end eksponeringen for mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse.

## **Baggrund og Formål**

Bekæmpelse af skadevoldere med anvendelse af biologisk bekæmpelse er udbredt. En række produkter til biologisk bekæmpelse af skadevoldere i grønsagsproduktion er baseret på mikroorganismer, såvel svampe (*Beauveria bassiana* og *Trichoderma* spp.) som bakterier (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*). Ved anvendelse af mikroorganismer til biologisk bekæmpelse vil f.eks. væksthusearbejdere eksponeres via luften for bioaerosol komponenter som sporer og andre bestanddele af disse organismer.

Projektets overordnede formål er at tilvejebringe ny viden som kan anvendes i dansk og international risikovurdering af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, der anvendes ved grønsagsdyrkning

## **Undersøgelsen**

I projektet har vi udført eksponeringsmålinger i 2007 og 2008 i ni grønsagsgartnerier. Tre af gartnerierne (A, G og H) er tomatgartnerier, to er agurkegartnerier (C og E), tre er kålgartnerier (B, D, F) og endelig indgik også et jordbærgartneri (I). I fem af disse gartnerier blev der anvendt mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Vi har målt eksponering via luften for følgende bioaerosolkomponenter: a) skimmelsvampe, herunder *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Verticillium* spp., b) bakterier herunder *Bacillus* spp. og aktinomycceter, samt c) inhalerbart støv,  $\beta$ -glucan, udvalgte metabolitter og endotoksin. Endvidere er koncentrationen af *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Verticillium* spp. og *Bacillus* spp. undersøgt på stikprøver af grønsager hjemtaget fra gartnerierne.

## **Projektresultater**

Generelt blev de laveste koncentrationer af mikroorganismer og mikrobielle komponenter fundet i udendørsreferencerne og de næsthøjeste koncentrationer i stationære målinger. De højeste koncentrationer blev observeret vha. de personbårne samplere. I agurkegartnerier var der en generel høj eksponering for støv, endotoksin og skimmelsvampe, desuden blev *Beauveria bassiana* fundet. Eksponeringen var ofte højere i tomatgartnerier end i kål- og jordbærgartnerier. *Beauveria* spp., og *Bacillus* spp. blev fundet både i luften og på grønsagsprøver. Disse isolater blev karakteriseret ved brug af molekylærbiologiske metoder.

I 2008 besøgte vi et enkelt økologisk tomatgartneri fire gange fra vinter til sommer. Koncentrationen af skimmelsvampe startede på en værdi, der var på niveau med målingerne på friland. I løbet af foråret øgedes koncentrationen af skimmelsvampe og ved høstmålingen i maj var koncentrationen af luftbårne svampesporer nået op omkring 1 million sporer  $m^{-3}$ , hvilket er sammenligneligt med hvad vi så under høst i andre tomatvæksthuse.

Der er blevet udviklet en molekylærbiologisk PCR-baseret metode til specifik detektion af *Trichoderma harzianum* stammen, der indgår i midlet Supresivit. Metoden blev verificeret ved tjek af de specifikke DNA-sekvenser i databaser og ved PCR-amplificeringen af såvel 7 *Trichoderma* spp. fordelt på 12 stammer som 9 arter af nærtbeslægtede svampe fordelt på 15 stammer. Dette viste, at sekvenserne udelukkende matchede den specifikke *T. harzianum* stamme. I luftprøver blev der kun fundet *Trichoderma* spp. i fire indsamlinger, hvoraf tre indsamlinger var fra gartnerier, hvor *Trichoderma* spp. ikke var blevet anvendt. Her blev *Trichoderma* spp. fundet ved nedtagning af agurk i væksthuse, ved høst af kål og broccoli på friland samt ved pakning af broccoli. Den fjerde indsamling var fra et væksthusegartneri, hvor Supresivit var blevet anvendt. Her blev den specifikke stamme af *T. harzianum* fundet i luften under blandingsproceduren og på dagen for udbringning. Ved efterfølgende målinger foretaget uger efter udbringningen blev der ikke fundet *Trichoderma* spp. i luften.

Der blev fundet *Bacillus cereus*-lignende bakteriesporer på grønsager fra alle de undersøgte gartnerier. På agurk og på broccoli, hvor der ikke var blevet anvendt Dipel, var koncentrationerne ganske lave og bakterierne blev kun fundet på mellem 20 og 67 % af grønsagerne. På bladselleri og broccoli, som var blevet sprøjtet med Dipel, var koncentrationerne derimod høje, på broccolien cirka 20.000 sporer/g og på bladsellerien 7600 sporer/g i august og cirka 2000 sporer/g i september, henholdsvis ca én og to måneder efter udsprøjtningen. De isolater, der blev mikroskopert fra disse prøver, havde alle bipyramidale krystaller og tilhører derfor *Bacillus thuringiensis*. I et tomatgartneri, hvor der blev anvendt begrænsede mængder af et produkt som er baseret på *Bacillus thuringiensis* (Dipel), blev der kun fundet meget lave koncentrationer af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på tomaterne.

Igennem målinger i gartnerier og igennem et litteraturstudium har vi opnået en god viden om baggrundseksponering for mikroorganismer anvendt til biologisk bekæmpelse. Det blev således set at, *Bacillus thuringiensis* kun sjældent blev fundet i luften mens *L. jecanii* ikke blev fundet. *Beauveria bassiana* blev kun sjældent fundet, og hvis den blev fundet var det i luften i agurkevæksthuse, på bladselleri eller på broccoli. *Trichoderma* spp. blev oftere fundet i luften og i højere koncentrationer.

Igennem dette studium har vi endvidere fået et indtryk af eksponering for mikroorganismer fra biologiske bekæmpelsesmidler under og efter udbringning. Udbringningsmetode og produkt tyder på at have stor betydning for eksponeringen, men denne del kræver flere studier med fokus på udbringning. Det konkluderes at brugen af mikroorganismer til biologisk bekæmpelse kan øge den humane eksponering via luften under udbringning og ved udrøring af et produkt i vand; personlig beskyttelse i form af åndedrætsværn, kan derfor være en fordel. Brugen af mikroorganismer til biologisk bekæmpelse øger derimod ikke den humane eksponering via luften signifikant i dagene efter udbringning. Den potentielle eksponering for



***Bacillus thuringiensis*** igennem konsum af Dipel behandlede grønsager er høj for broccoli og bladselleri og lav for tomat.

Igennem dette studium har vi fået et grundigt mål for eksponering for bioaerosol komponenter i agurke, tomat og frilandsgrønsags gartnerier. Arbejdsopgaver som kan give for høje eksponeringer er identificeret. Det konkluderes at eksponeringen for bioaerosoler generelt er høj under høst af agurker og tomater og under nedrivning af planter. Derimod er eksponeringen på friland oftest væsentligt lavere.

#### ***Andre kilder***

En del af projektets resultater er publiceret i:

Madsen, A.M., Hansen, V.M., Meyling, N.V., og Eilenberg, J., 2007. Human exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production. *Ann Agric Environ Med* 14, 5-24.

Madsen, A.M., Hansen, V.M., Nielsen, S.H., og Olsen, T.T., 2009. Exposure to dust and endotoxin of employees in cucumber and tomato nurseries. *Ann Occup Hyg* 53, 129-138.

Hansen, V.M., Eilenberg, J., og Madsen, A.M., 2010. Occupational exposure to airborne ***Bacillus thuringiensis*** subsp. ***kurstaki*** HD1 and other bacteria in greenhouses and vegetable fields. *Biocontrol Science and Technology* 20, 605-619.

Tendal, K. Madsen, A.M. (2010). Exposure to airborne microorganisms, hyphal fragments, and pollen in a field of organically grown strawberries. *Aerobiologia* DOI 10.1007/s10453-010-9171-1.

Hansen VM, A. Winding, A. M Madsen. Exposure to bioaerosols during the growth season in an organic greenhouse tomato production using Supresivit® (***Trichoderma harzianum***) and Mycostop® 2 (***Streptomyces griseoviridis***).  
Published ahead of print: doi:10.1128/AEM.00446-10 in *Appl. Envir. Microbiol.*

# Summary

Biological control against pests is commonly used. A number of products for biological pest control in vegetable production are based on microorganisms, such as fungi (*Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp.) and bacteria (*Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*). Greenhouse workers using microorganisms for biological control are exposed through the air to aerosolised components, such as spores, from these microorganisms.

The overall objective of this project is to generate new knowledge that can be used in Danish and international risk assessment of microbiological pest control products used in vegetable production.

In this project we have measured exposure at nine vegetable production sites in 2007 and 2008. Produce grown included tomatoes (sites A, G and H) cucumbers (sites C and E), cabbages (sites B, D, F) and strawberries (site I). Microbiological pest control agents were applied by five of the producers. We measured exposure to the following bioaerosol components: a) moulds, including *Trichoderma* spp. and *Beauveria* spp. b) bacteria including *Bacillus* spp. and actinomycetes, and c) inhalable dust,  $\beta$ -glucan, selected metabolites and endotoxins. Finally, we also measured the concentration of *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp. and *Bacillus* spp. on randomly taken samples of vegetables from the producers.

Generally, the lowest concentrations of microorganisms and microbial components were found in the outdoor references and the second lowest concentrations by the stationary samplers. The highest concentrations were seen in the personal air samples. We found an overall high exposure to dust, endotoxins and moulds in the cucumber nurseries, and *Beauveria bassiana* was found at low levels. The exposure in tomato greenhouses was generally higher than in the open fields. *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp. and *Bacillus* spp. were all found in both air and vegetable samples. These isolates were identified and characterized using molecular biological methods.

In 2008 we paid four visits from winter to summer to an organic tomato producer. Initial concentration of moulds was comparable to that in the open field. Throughout the spring the mould concentrations increased and during harvest in May, the concentration of airborne fungal spores reached about 1 million spores m<sup>-3</sup>, resembling measurements during harvest in other tomato greenhouses.

A molecular biological method was developed for the specific detection of *Trichoderma* species by PCR amplification of DNA. The method was verified by checking the specific DNA sequences in databases. This confirmed that the sequences only matched *Trichoderma* species. *Trichoderma* was only found in air samples from six of the sampling days, and the vast majority was found in a greenhouse where the *Trichoderma*-based product Supresivit was applied. Here *Trichoderma* was found in the air during and after the mixing procedure. It was verified by PCR that the colonies were in fact *Trichoderma* spp. No airborne *Trichoderma* fungi were found during the subsequent measurements in the weeks after application of Supresivit.

*Bacillus cereus*-like bacteria were found on vegetables from all the investigated production sites. Dipel had not been used on cucumber and broccoli. Bacteria were found on 20-67% of these vegetables, but the concentrations were very low. However, high concentrations were found on celery and broccoli, which had been sprayed with Dipel; on the broccoli approximately 20,000 spores g<sup>-1</sup>, and on the celery 7,600 spores g<sup>-1</sup> in August and about 2,000 spores g<sup>-1</sup> in September. The isolates from these samples all contained bipyrmidale crystals, and therefore belong to *Bacillus thuringiensis*. In a tomato greenhouse, where limited amounts of Dipel were used, very low concentrations of *Bacillus cereus*-like bacteria were found on the tomatoes.

The measurements in the present study together with a review of the literature gave significant new knowledge about background exposure to microorganisms used for biological control. *Bacillus thuringiensis* was rarely found in the air at the vegetable production sites. *Beauveria bassiana* was rarely found, and if found, it was either in the air in cucumber greenhouses or on celery or broccoli. *Trichoderma* spp. was found in the air and in higher concentrations when an MPCA containing *T. harzianum* was used.

In this study we measured exposure to microorganisms from biological control products during and after application. The application method and the product itself seem to have important implications for the exposure level, but more studies are needed with focus on the specific application techniques. It is concluded that use of microorganisms for biological control may increase human exposure from the air during application and when mixing a product in water; respiratory protection may therefore be advantageous. The use of microorganisms for biological control does not increase human exposure from the air significantly in the days after application. The potential exposure to *Bacillus thuringiensis* through consumption of Dipel-treated vegetables is high for broccoli and celery and low for tomato.

From this study we have gained thorough knowledge about exposure to bioaerosol components such as endotoxins in cucumber, tomato and outdoor vegetable production. Tasks, which may cause too high exposures, are identified. It is concluded that exposure to bioaerosols is generally high during harvest of cucumbers and tomatoes, and removal of old plants in greenhouses. In contrast, exposure in the open field is usually significantly lower.

Parts of results presented in this paper are published in:

Madsen, A.M., Hansen, V.M., Meyling, N.V., og Eilenberg, J., 2007. Human exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production. *Ann Agric Environ Med* 14, 5-24.

Madsen, A.M., Hansen, V.M., Nielsen, S.H., og Olsen, T.T., 2009. Exposure to dust and endotoxin of employees in cucumber and tomato nurseries. *Ann Occup Hyg* 53, 129-138.

Hansen, V.M., Eilenberg, J., og Madsen, A.M., 2010. Occupational exposure to airborne *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 and other bacteria in greenhouses and vegetable fields. *Biocontrol Science and Technology* 20, 605-619.

Tendal, K. Madsen, A.M. (2010). Exposure to airborne microorganisms, hyphal fragments, and pollen in a field of organically grown strawberries. *Aerobiologia* DOI 10.1007/s10453-010-9171-1.

Hansen VM, A. Winding, A. M Madsen. Exposure to bioaerosols during the growth season in an organic greenhouse tomato production using Supresivit® (*Trichoderma harzianum*) and Mycostop® 2 (*Streptomyces griseoviridis*).  
Published ahead of print: doi:10.1128/AEM.00446-10 in Appl. Envir. Microbiol.

# 1 Baggrund og formål

Biologisk bekæmpelse er brugen af levende organismer til at bekæmpe skadedyr, plantesygdomme og ukrudt. Blandt organismer til brug i biologisk bekæmpelse er bakterier og svampe. For bakteriers vedkommende er arten *Bacillus thuringiensis* på verdensplan den mest brugte organisme til biologisk bekæmpelse og anvendes især overfor sommerfuglelarver, myg og sørgemyg, samt biller. Der findes større produktionsanlæg, som udelukkende er dedikeret til fermentering af denne bakterie, efterfulgt af formulering af det salgbare produkt. For svampenes vedkommende findes en række arter, der anvendes, omend i mindre omfang end bakterier. Der findes svampe som er antagonistiske overfor visse plantepatogener, mens andre svampe kan inficere insekter og dermed bruges til biologisk bekæmpelse af skadedyr.

Danmark er blandt verdens førende lande indenfor biologisk bekæmpelse, især i væksthuseproduktion af grønsager. Igennem de senere årtier er sortimentet af organismer til biologisk bekæmpelse af skadedyr og plantesygdomme i væksthuse vokset støt, således at danske avlere nu har et batteri af muligheder og i de fleste tilfælde kan undgå brugen af kemisk bekæmpelse. På friland findes også adskillige produkter til biologisk bekæmpelse. Biologisk bekæmpelse er dermed reelt med til at sænke forbruget af kemiske stoffer og dermed bidrage til opnåelse af målene i pesticidhandlingsplanerne.

Med den øgede brug af biologisk bekæmpelse er det oplagt at se på, om der kan være arbejdsmiljømæssige risici forbundet hermed. Når talen kommer på bakterier og svampe er det relevant at undersøge, hvilken eksponering væksthusearbejdere er udsat for på forskellige tidspunkter af vækstperioden og under forskellige arbejdsprocesser. Herunder er det vigtigst at kende eksponeringen for endotoksin (fra bakterier), idet endotoksin kan virke ved at forstærke helbredseffekten af f.eks. eksponering for svampesporer. Kan der overhovedet måles en øget eksponering i luft, når man bruger mikrobiologisk bekæmpelse? Udgør denne eksponering en potentiel sundhedsmæssig risiko? Og endelig: hvad er baggrundseksponeringen målt som den naturlige tæthed i luft af mikroorganismer i væksthuse og i frilandsproduktion af grønsager?

Den nævnte viden er central for en risikovurdering af mikroorganismer til biologisk bekæmpelse og vil danne baggrund for myndighedernes håndtering af risici. Bør det f.eks. tilrådes at bære maske under udsprøjtning af mikroorganismer? Vi satte os for at undersøge disse ting i et tværfagligt samarbejde, som også rummede et omfattende samarbejde med grønsagsproducenterne. De resultater, der præsenteres i rapporten, er under international publicering, da det er første gang, denne eksponering undersøges i et større omfang.

Projektets overordnede formål er at:  
tilvejebringe ny viden som kan anvendes i dansk og international risikovurdering af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler der anvendes ved grønsagsdyrkning

Projektet har karakteriseret eksponeringsniveauer via luften og identificeret arbejdsprocesser der fører til eventuel eksponering i tomat-, agurke- og kålgartnerier der anvender og ikke anvender biologisk bekæmpelse. I gartnerier der anvender biologisk bekæmpelse, gartnerier der ikke anvender biologisk bekæmpelse og i økologiske gartnerier er den samlede eksponering for mikroorganismer og mikroorganisme bestanddele (herunder velkendte toksiner som endotoksin og emetisk toksin) målt. Eksponeringer for mikroorganismer fra biologisk bekæmpelsesmidler er sammenholdt med den samlede eksponering for forskellige mikroorganismer og mikroorganisme bestanddele. Endvidere er eksponeringsniveauer sammenholdt med eksponeringsniveauer målt i andre danske arbejdsmiljøer. De salgbare produkter: tomater, agurker, bladselleri og kål, rummer potentielt både naturligt forekommende mikroorganismer og mikroorganismer anvendt til biologisk bekæmpelse, samt deres metabolitter. Derved vil forbrugeren potentielt eksponeres for mikroorganismer og deres metabolitter. Projektet har afdækket, hvorvidt denne eksponering er af betydning.

## 2 Biologi af udvalgte arter til biologisk bekæmpelse

### 2.1 Insektpatogene bakterier

På verdensplan er adskillige mikrobiologiske bekæmpelsesmidler baseret på den insektpatogene bakterie *Bacillus thuringiensis*; salget af disse midler udgør langt den største del af det samlede salg af midler til mikrobiologisk bekæmpelse. *Bacillus thuringiensis* deles i en række underarter, de to underarter, der indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, der anvendes i Danmark hedder *kurstaki* og *israelensis*. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* kan anvendes til bekæmpelse af sommerfuglelarver, mens *israelensis* kan anvendes til bekæmpelse af myggelarver, i Danmark anvendes den primært mod sørgemyg. I dette projekt er der kun besøgt gartnerier, som anvender et *Bacillus thuringiensis* baserede plantebeskyttelsesmiddel, der beskytter mod angreb af sommerfuglelarver (f.eks. kålsommerfugle og sommerfugle på tomat). Det middel som pt må anvendes i Danmark hedder Dipel og indeholder en stamme af *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, som stammer fra USA og benævnes HD1.

#### 2.1.1 *Bacillus* spp.

Bakterieslægten *Bacillus* inddeles i tre grupper på basis af sporens og sporangiets morfologi (Turnbull et al., 1990). *Bacillus thuringiensis* tilhører *Bacillus cereus*-gruppen indenfor morfologi gruppe 1. *Bacillus cereus*-gruppen består udover *Bacillus thuringiensis* af arterne *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* og *Bacillus pseudomycoides*.

*Bacillus thuringiensis* adskilles fra *Bacillus cereus* og de øvrige arter i gruppen ved, at den producerer et parasporalt krystal protein, som består af -endotoksiner. Det kan f.eks. ses ved fasekontrast mikroskopi. Mange *Bacillus thuringiensis* isolater er patogene overfor invertebrater, specielt insektlarver, patogeniteten skyldes primært -endotoksinerne. Der er gjort adskillige forsøg på at skelne mellem *Bacillus thuringiensis* og specielt *Bacillus cereus* på basis af andre fænotypiske karakterer end produktionen af -endotoksiner. Disse forsøg inkluderer undersøgelser vedrørende morfologi, evnen til at bruge en lang række forskellige kulstofkilder til vækst, kemisk kvantificering af cellesammensætningen med hensyn til fedtstoffer og kulhydrater, multilokus enzym elektroforese, og såvel serologiske- som fag-typningsteknikker, (citeret i Hendriksen og Hansen, 1998). Men det har ikke været muligt at finde entydige forskelle. Generne som koder for -endotoksinerne er placeret på store plasmider (Stahly et al., 1992), som kan tabes eller overføres til andre bakterier. Et tab fører til en såkaldt krystal negativ stamme af *Bacillus thuringiensis*, mens overførsel kan føre til *Bacillus cereus* stammer som producerer krystaller (citeret i Hendriksen og Hansen, 1998). Det er således ikke enkelt at differentiere imellem disse to arter.

*Bacillus thuringiensis* er blevet opdelt i adskillige underarter. Udgangspunktet for denne opdeling er immunologiske reaktioner til bakterielle flagel antigener

(H-serotypning). I 1999 var *Bacillus thuringiensis* således opdelt i 69 H-serotyper (underarter) og 82 serologiske varianter (Lecadet et al., 1999). De to underarter der indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, der anvendes i Danmark hedder, som ovenfor nævnt, *kurstaki* og *israelensis*.

Fylogenetiske relationer indenfor *Bacillus cereus*-gruppen er blevet analyseret ved hjælp af AFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphism) (Hill et al., 2004). AFLP-teknikken er baseret på en selektiv PCR amplifikation af restriktionsfragmenter fra en total skæring af genomisk DNA. Teknikken involverer tre trin, (1) restriktionsskæring af DNA'et og ligering til oligonukleotid adaptore, (2) selektiv PCR forstærkning af restriktionsfragmenterne og (3) gel analyse af de forstærkede fragmenter. Analysen viste en meget betydelig diversitet inden for såvel *Bacillus thuringiensis* som *Bacillus cereus*, til forskel fra *Bacillus anthracis* som er særdeles ensartet. Ti forskellige fylogenetiske forgreninger blev ved teknikken beskrevet indenfor *Bacillus cereus*-gruppen, hvor flere af grenene indeholder såvel *Bacillus thuringiensis* som *Bacillus cereus* stammer. Spredningen af *Bacillus cereus* som *Bacillus thuringiensis* stammer mellem hinanden i det fylogenetiske træ viser, at forskellen imellem de to arter (dannelse af -endotoksin krystaller) ikke bliver reflekteret i deres genomiske sammensætning.

Alle de 24 stammer af *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* som blev analyseret i undersøgelsen knytter sig tæt sammen i en enkelt gren af det fylogenetiske træ. Denne gren består af stammer fra *Bacillus thuringiensis* underarterne: *kurstaki*, *entomocidus*, *aizawai*, *colmeri*, *tolworthi*, *darmstadiensis* og *alesti*, mange af disse stammer er aktive overfor sommerfuglelarver. AFLP teknikens evne til at adskille forskellige stammer kan vurderes ud fra sammenligninger mellem stammer som tilsyneladende er identiske. Hvis man tager dette som udgangspunkt for en sammenligning mellem de 24 *kurstaki* stammer, kan det ses at de falder i seks forskellige grupper, idet nogle af stammerne ser ud til at være identiske, mens andre er identiske med stammer fra andre underarter. Alt i alt viser AFLP-analysen, at *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* er en temmelig homogen gruppe, som består af stammer som har en begrænset variation med hensyn til den genomiske sammensætning.

Den begrænsede variation i genomisk sammensætning hos *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* er blevet bekræftet ved hjælp af Multi Locus Sequence Typing (MLST). MLST er en teknik som er blevet brugt til fylogenetisk typning af mange forskellige bakterier. MLST er baseret på PCR amplifikation og efterfølgende sekventering af en del af et antal (typisk syv) basale gener spredt i bakteriens kromosom. Den genetiske beslægtethed imellem bakterielle stammer bliver så bestemt ved hjælp af forskelle mellem genernes sekvenser, som kan bruges til at lave fylogenetiske træer. Priest et al. (2004) fandt, at fem *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* stammer analyseret ved denne metode var identiske, skønt de stammer fra fire forskellige verdensdele. Det fremgår endvidere fra MLST databasen over *Bacillus cereus*-gruppe stammer (<http://pubmlst.org/bcereus/>), at *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 også er identisk med disse fem stammer. Der er ingen andre *Bacillus thuringiensis* underarter som ind til nu er blevet fundet identiske med *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* vha denne teknik. Yderligere evidens for en begrænset variation indenfor *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* er blevet givet ved hjælp af RAPD-PCR (Rivera og Priest, 2003a) og ved pulsed field gel elektroforese (Rivera og Priest, 2003b).



Alt i alt kan det konkluderes, at stammer indenfor *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* har en klonal struktur og derfor i en fylogenetisk sammenhæng den samme oprindelse, eller sagt på en anden måde den samme stamfader. Det betyder, at plantebeskyttelsesmidler baseret på forskellige stammer af *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* vil have meget store ligheder. Hidtil er der kun et middel "Dipel" godkendt i Danmark; mens yderligere fire andre *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* stammer er under godkendelse i EU.

## 2.2 Insektpatogene svampe

Nogle få produkter baseret på insektpatogene svampe er godkendt til kommercielt salg og anvendelse som mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i Danmark. Det drejer sig om produkterne Mycotal, som markedsføres til bekæmpelse af mellus (hvide fluer) og BotaniGard (22WP og ES) som kan anvendes til bekæmpelse af en række skadedyr såsom trips, bladlus, uldlus og mellus i væksthuse

([http://www.mst.dk/Virksomhed\\_og\\_myndighed/Bekaempelsesmidler/Pesticider/Regulering/Mikrobiologiske\\_pesticider\\_2008.html](http://www.mst.dk/Virksomhed_og_myndighed/Bekaempelsesmidler/Pesticider/Regulering/Mikrobiologiske_pesticider_2008.html)). En række andre svampebaserede midler til bekæmpelse af insekter vil sandsynligt blive inkluderet blandt de ovenstående midler inden for en årrække. I det følgende vil de mest relevante af de insektpatogene svampes biologi og systematik blive præsenteret.

### 2.2.1 Klassifikation af insektpatogene svampe

Alle de insektpatogene svampe, som er tilgængelige som mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, tilhører divisionen Ascomycetes (sæksporesvampe) og ordenen Hypocreales. Alle svampene har tidligere også været henregnet til den samme familie (*Clavicipitaceae*), men efter analyser baseret på DNA sekvenser er denne familie blevet splittet op (Sung et al., 2007). Derfor opererer man nu med tre familier (se tabel 2.1).

Tabel 2.1. Familietilhørsforhold af anamorfe slægter af insektpatogene svampe som findes i mikrobiologisk bekæmpelsesmidler. Svampene var tidligere samlet i familien Clavicipitaceae. Baseret på (Humber, 2007).

	Clavicipitaceae	Cordycipitaceae	Ophiocordycipitaceae
Eksempler på slægter af insektpatogene svampe	<i>Metarhizium</i>	<i>Beauveria</i> <i>Isaria</i> * <i>Lecanicillium</i> **	<i>Verticillium</i> -like***

\*Nyt slægtsnavn for arterne *Paecilomyces fumosoroseus* og *P. farinosus*. Benævnes nu *I. fumosorosea* og *I. farinosa*

\*\*Nyt slægtsnavn for arter, som tidligere henregnedes til *Verticillium lecanii*

\*\*\*Arter, som tidligere blev samlet i *Verticillium* sect. *Prostrata*, men som nu er ekskluderet fra *Verticillium* i snæver forstand, men dog ikke endnu er klassificeret i slægter, som beskrives af (Zare and Gams, 2001).

Derved er slægten *Beauveria* uændret, men er nu placeret i familien Cordycipitaceae. Blandt de mest almindelige insektpatogene slægter er kun *Metarhizium* bevaret i Clavicipitaceae.

### 2.2.2 *Beauveria* spp.

Det godkendte bekæmpelsesmiddel BotaniGard (22WP og ES) er baseret på den insektpatogene svamp *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Produktet BotaniGard (22WP og ES) er fremstillet i USA på et isolat af *Beauveria bassiana*, som også anvendes i USA under navnet GHA. Produktet fremstilles af firmaet Mycotech i Montana, USA, som også producerer andre *Beauveria bassiana*-baserede midler (Mycotrol GH og CornGuard) til brug mod andre skadedyr på friland.

Det er påvist, at *Beauveria bassiana* er fundet som naturlige infektioner i arter tilhørende de fleste insektordener samt en række arachnider (mider og edderkopper). Derved har *Beauveria bassiana* som art betragtet et bredt værtsspektrum, men genotyper af svampen kan udvise variation i virulensen overfor specifikke værts-arter. Livscyklus er generelt, at sporer (konidier) kommer i kontakt med overfladen (kutikula) af en vært. Herpå vil konidierne spire og trænge igennem værtens kutikula. Når svampen er kommet ind til værtens hæmocøl (blodvæske) opformerer den sig og til sidst dør insektet. Efter værtens død vil svampehyfer ved de rette fugtige betingelser gennembryde værtens overflade, især ved tynde steder af kutikulaen, f.eks. mellem segmenter. Ude i det fri vil svampen danne nye infektiøse konidier, som kan spredes til en ny vært.

Jordmiljøet er et velbeskrevet sted for isolering af *Beauveria bassiana* (Meyling and Eilenberg, 2006a). Herfra kan svampen isoleres både ved udpladning af jordsuspension på selektive medier eller ved brug af bait-teknikker med modtagelige insektlarver. Det er dog også muligt at isolere *Beauveria bassiana* fra planteoverflader fra planter i levende hegn, men der findes ikke viden om svampens forekomst på afgrøder dyrket i væksthuse. Isolater kan også indsamles ved at indfange levende insekter og inkubere dem i laboratoriet. Det er også muligt direkte at gå ud og indsamle døde, inficerede insekter i de miljøer, man ønsker at undersøge for forekomst af svampen.

Generelt spredes de infektiøse enheder (sporer eller konidier) af insektpatogene svampe fra det døde insekt. Denne spredning kan ske ved vind og regn, men den kan også findes sted ved, at andre insekter kommer i kontakt med konidierne og spreder dem (Meyling et al., 2006). Det kan også ske, at insektet dør noget tid efter kontakten og siden opformerer svampen sig på dette sted. Når svampen anvendes til mikrobiologisk bekæmpelse i væksthuse vil skadedyrene enten blive inficerede direkte ved at det udsprøjtede materiale lander direkte på dyrene, eller de kan samle infektiøst materiale op fra bladoverflader, når de bevæger sig hen over disse.

*Beauveria bassiana* er den taksonomiske betegnelse for det anamorfe (eller aseksuelle) stadie af svampen. Dvs. *Beauveria bassiana* reproducerer sig udelukkende ved mitotisk ved at danne konidier, som bærer et enkelt sæt kromosomer (haploide). Disse konidier er præcise genetiske kopier af den oprindelige svamp, som inficerede insektet. Svampen har også et seksuelt stadium, som taksonomisk benævnes *Cordyceps bassiana*. Dette stadium er dog kun kendt i naturen fra Østasien.

Nyere undersøgelser baseret på DNA sekvenser af *Beauveria* spp. har vist, at den traditionelle taksonomi baseret på morfologiske karakterer kun i nogen grad er støttet af genetiske karakterer (Rehner and Buckley, 2005). Især indenfor gruppen, som traditionelt kaldes *Beauveria bassiana*, har det vist sig,

at denne reelt består af to artskomplekser: en gruppe, som kan refereres til som *Beauveria bassiana* i den traditionelle form samt en genetisk afvigende gruppe, som indtil videre refereres til som *Beauveria* Clade C, men denne gruppe mangler endnu en formel beskrivelse og navngivning (Rehner et al., 2006b). Grupperne kan kun adskilles vha. genetiske markører. I begge grupper rummes der stor genetisk variation, så de to grupper kan principielt omtales som artskomplekser. Indenfor *Beauveria bassiana* er der ved at blive udviklet et eksplicit referenceapparat, så isolater kan henføres til specifikke grupperinger. Denne navngivning refererer til kontinent for første identifikation samt rækkefølgen, som gruppen er beskrevet i. Dvs. Eu\_1 henviser til den første gruppe beskrevet fra Europa, osv. (Rehner et al., 2006a).

### 2.2.3 Lecanicillium (Verticillium lecanii)

Der findes et godkendt produkt (Mycotal) i Danmark baseret på den insektpatogene svamp, som traditionelt betegnes *V. lecanii*. Denne art er imidlertid splittet op, så taksonomien for de insektpatogene arter er ændret. Nedenfor bruges betegnelsen '*V. lecanii*' til omtale af arter, som tidligere blev placeret i denne taksonomiske enhed, men hvor placeringen i den nye taksonomi ikke kendes.

Slægten *Verticillium* er for nyligt blevet grundigt revideret og siden opsplittet i flere nybeskrevne slægter. En stor monografi fremstiller den nye taksonomi, og de insektpatogene arter præsenteres i (Zare and Gams, 2001). De vigtigste implikationer efter revideringen for mikrobiologisk bekæmpelse er, at arten *Verticillium lecanii* er splittet op og hver ny art har fået nyt navn i slægten *Lecanicillium*. Dette betyder, at '*V. lecanii*' i produktet Mycotal faktisk nu tilhører arten *L. muscarium*, mens '*V. lecanii*' fra produktet Vertalec nu tilhører arten *L. longisporum* (Andersen et al., 2006; Zare and Gams, 2001). Dermed indeholder produktet Mycotal, som er godkendt i Danmark, egentlig svampen *L. muscarium*. Den nye taksonomi gør det vanskeligt at sammenligne resultater med gamle rapporter, især hvis den isolerede svamp betegnes *Verticillium* sp. Så ved man ikke hvilken af de nye slægter, som den pågældende svamp tilhører.

Generelt omtales '*V. lecanii*' som velegnet til infektion af bladlus. Den kan dog også af og til findes i jorden (Meyling and Eilenberg, 2006a). Svampen kan dog også inficere andre insekter, og muligvis er det bredere værtsspektrum forbundet med den taksonomiske forvirring. Ligesom *Beauveria bassiana* og *P. fumosoroseus* / *I. fumosorosea* er livscyklus for '*V. lecanii*' anamorf.

### 2.2.4 Paecilomyces fumosoroseus / Isaria fumosorosea

Slægten *Paecilomyces* er nu opsplittet i tre forskellige grupper, som er fordelt mellem alle tre familier indenfor den gamle familie *Clavicipitaceae* (Tabel 2.2).

Tabel 2.2. Opsplitning af arter, som tidligere blev henregnet til *Paecilomyces*. Alle inkluderede arter er patogene til invertebrater. Fra (Humber, 2007).

Familie	Slægt	Inkluderede arter
<i>Clavicipitaceae</i>	' <i>Paecilomyces</i> '*	<i>carneus</i> , <i>marquandii</i>
<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Isaria</i>	<i>amoenorosea</i> , <i>cateniannulata</i> , <i>cicadae</i> , <i>coleopterora</i> , <i>farinosa</i> , <i>fumosorosea</i>
<i>Ophiocordycipitaceae</i>	' <i>Paecilomyces</i> '*	<i>ghanensis</i> , <i>tenuipes</i>
		<i>Lilacinus</i>

\*Der er endnu ingen nye slægtsnavne for disse anamorfe svampe. Derfor kaldes de fortsat *Paecilomyces*.

De systematiske relationer mellem arterne, som tidligere henregnedes til *Paecilomyces*, er undersøgt af (Luangsa-ard et al., 2004; Luangsa-ard et al., 2005) og den nye taksonomi er gengivet i disse referencer.

Der er et kommercielt produkt, PreFeRal, som er baseret på *Paecilomyces fumosoroseus* / *Isaria fumosorosea*. Produktet er dog ikke godkendt til anvendelse i Danmark. Det markedsføres til brug mod mellus eller 'hvide fluer'. Arten findes almindeligt i danske økosystemer og kan isoleres fra jorden på relativt uforstyrrede steder (f.eks. levende hegn), men den findes stort set ikke i landbrugsjord (Meyling and Eilenberg, 2006b). Arten har en større tendens til at specialisere sig til infektion af særlige insektgrupper. Især sommerfuglelarver kan findes inficerede i naturen (N.V. Meyling, pers. obs.), ligesom mellus ofte inficeres under mere sydlige himmelstrøg. Livscyklus er generelt anamorf og foregår i store træk som beskrevet for *Beauveria bassiana*.

## 2.3 Mikroorganismer mod plantepatogene svampe

### 2.3.1 *Trichoderma* spp.

I mikrobiologiske bekæmpelsesmidler til beskyttelse af planter mod rådsvamp (bl.a. gråskimmel) anvendes svampespore af slægten *Trichoderma*. I Danmark er det tilladt at markedsføre plantebeskyttelsesprodukterne Supresivit, Alperto (Biofungus), Binab TF, Tri002 og Tri003, som er baseret på *T. harzianum* og *T. polysporum* (www.mst.dk). Produkterne anvendes til forebyggende frøbehandling og rodbehandling af stiklinger, men kan også doseres direkte til planternes rødder ved opblanding i spagnum eller via gartneriets vandingssystem. I agurke og tomatgartnerier kan sår på planterne påsmøres en pasta af produktet for at hindre vækst af sygdomsfremkaldende svampe.

*Trichoderma* er udbredt over hele kloden. Den lever primært i jorden, men kan også findes på organisk materiale under nedbrydning (Grondona et al., 1997b). Den forekommer ofte i høje koncentrationer, fordi den på mange måder er en stærk konkurrent til andre mikroorganismer i jorden, hvilket også gør den succesfuld som middel mod plantepatogene svampe. *Trichoderma* har en stor reproduktiv kapacitet, er i stand til at overleve under meget ugunstige forhold, er god til at udnytte næringsstoffer, kan ændre forholdene i planternes rodzone, og er meget aggressiv overfor andre (plantepatogene) svampe bl.a. ved afgivelse af antibiotika og ved mycoparasitisme (Benitez et al., 2004b). Tilsammen gør disse egenskaber *Trichoderma* i stand til at bekæmpe plantepatogene svampe og øge plantevækst og planters forsvarsmekanismer. Interaktionen imellem *Trichoderma* og plantepatogene svampe er kompleks og påvirkes af typen af værtsplante, typen af plantepatogen og faktorer i det omgivende miljø bl.a. pH, temperatur og jernkoncentration (Benitez et al., 2004a).

Svampeslægten *Trichoderma* (orden: Hypocreales, række: ascomycota) tilhører en gruppe af svampe, hvor det ukønnede (anamorfe) stadie kaldes *Trichoderma* og det kønnede (teleomorfe) stadie kaldes *Hypocrea*. Klassifikation af arter indenfor *Trichoderma*-slægten ud fra en klassisk morfologisk tilgang har tidligere været vanskelig pga. plasticitet i svampens karaktertræk (Druzhinina and Kubicek, 2005a). Indtil 1969 blev det formodet at *Trichoderma* kun inkluderede en art, *T. viride*. Det har siden vist sig at

denne art er forholdsvis sjælden, og det må derfor formodes at mange *Trichoderma* isolater er blevet fejlidentificeret (Druzhinina and Kubicek, 2005b). Udviklingen af molekylærbiologiske metoder i 1990erne har derfor været vigtig for identifikation af fylogenetiske arter (i dag 80 stk (Samuels, 2005)) og klarlægning af de enkelte arters relation til hinanden. Artsbegrebet indenfor *Trichoderma* er bredt, hvilket har resulteret i brugen af mange specifikke og subspecifikke taxa (Grondona et al., 1997a) som inkluderer sektioner og clader. For *T. hazianum* og *T. polysporum* gælder det, at de henholdsvis tilhører claderne Lixii-catoptron og Pachybasioides.

### 2.3.2 Streptomyces griseoviridis

I Danmark markedsføres produktet Mycostop<sup>®</sup>, som er baseret på aktinomyceten *Streptomyces griseoviridis* (stamme k61). Produktet bruges til at hæmme væksten af frø- og rodbårne svampe, som kan forårsage sygdom og forringet vækst hos kulturplanter (Jespersen and De Waard, 1993). Den hæmmende effekt skyldes *S. griseoviridis* evne til at udskille antibiotiske stoffer.

Mycostop<sup>®</sup> er formuleret som et pulver der kan bruges til bejdsning af frø eller til iblanding i spagnum. Det kan også blandes med vand og herefter anvendes til vanding eller spraying af planterne.



# 3 Bioaerosoler

## 3.1 Bioaerosol komponenter

En bioaerosol er en biologisk aerosol som består af luftbårne partikler, store molekyler eller flygtige forbindelser, der indeholder levende organismer eller partikler, som er frigivet fra levende organismer. Partiklerne er små og varierer i størrelse fra mindre end en mikrometer (e.g. vira) til hundrede mikrometer (e.g. pollen). I det nedenstående vil vi kort beskrive de bioaerosolkomponenter, som der er fokus på i denne rapport. Vi giver eksempler på eksponeringsniveauer i andre miljøer, som data i denne rapport kan sammenlignes med. Hvis det er muligt, er eksemplerne fra Danmark.

### 3.1.1 Partikelstørrelse

Den aerodynamiske diameter af en partikel har betydning for, om den kan inhaleres og hvor den deponeres i luftvejen. Den aerodynamiske diameter og form af en spore har indflydelse på dens evne til at blive aerosoliseret og til at forblive luftbåren.

I dette studium har vi med personbårne samplere målt eksponering for inhalerbare mikroorganismer og støv. Det vil sige den aerosolfraktion, som kan gå ind i næse og/eller mund ved indånding. Partikler over 100  $\mu\text{m}$  kan ikke indhaleres. Inhalerbare partikler kan underopdeles i thorakale partikler og respirable partikler. Den største del af de respirable partikler er under 3,5  $\mu\text{m}$ , og kan trænge ned i den alveolare del af lungerne. I tabel 3.1 er givet eksempler på den aerodynamiske diameter af svampesporer, herunder sporer af *Verticillum lecanii* og af *Trichoderma harzianum*. Både bakterier og svampesporer kan have en aerodynamisk diameter således, at de ville kunne findes i den respirable fraktion (Tabel 3.1). Endotoksin fra bakterier (se afsnit 3.1.3) kan også findes i den respirable fraktion, men i flere miljøer er den højeste koncentration fundet i den thorakale fraktion (Madsen and Nielsen, 2010).

Med stationære partikeltæller har vi i dette studium karakteriseret størrelsesfordelingen af de luftbårne partikler (afsnit 5.2.6).

Tabel 3.1. Eksempler på di metre eller størrelser og aerodynamisk di metre ( $d_{ae}$ ) af luftbårne mikrobielle partikler

	Art	Diameter af spore [m]*	$d_{ae}$ af sporer, klumper af sporer eller spore-bærende partikler [m]	Referencer
Svampe	<i>Aspergillus flavus</i>	3.5-4.5	3.3-3.8 <sup>4)</sup>	(Madelin and Johnson, 1992)
	<i>A. fumigatus</i>	2.5-3.0	3.1 <sup>5)</sup>	(Lacey and Dutkiewicz, 1976)
			1.9-2.2 <sup>4)</sup>	(Madelin and Johnson, 1992)
	<i>A. ustus</i>	3.2-4.5	2.6 <sup>4)</sup>	(Madsen et al., 2005)
	<i>Chaetomium globosum</i>	6.5-11	2.3 <sup>4)</sup>	(Madsen et al., 2005)
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2-11	2.3-2.5 <sup>4)</sup>	(Madelin and Johnson, 1992)
	<i>C. sphaerospermum</i>	3-7	3.3 <sup>4)</sup>	(Madsen et al., 2005)
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	2.8-4.0	2.8 <sup>4)</sup>	(Madsen et al., 2006a)
	<i>Stachybotrys chartarum</i> <sup>1)</sup>	7-12	4.5 <sup>4)</sup>	(Sorenson et al., 1987)
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	5-9	5.1-5.5 <sup>4)</sup>	(Madelin and Johnson, 1992)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	2.8-3.2	4.7 <sup>4)</sup>	(Madsen et al., 2006b)
<i>Verticillium lecanii</i> <sup>2)</sup>	1-10	1.2-1.9 <sup>4)</sup>	(Madsen et al., 2009)	
Bakterier	Bakterier	<1.5 (Palmgren et al., 1986)	1.1-2.1 <sup>5)</sup>	(Meklin et al., 2002)
		<1.5 (Eduard et al., 1990)	2.7 <sup>5)</sup>	(Lacey and Dutkiewicz, 1976)
			2.1-3.3 <sup>5)</sup>	(Laitinen et al., 1994)
			2.4-4.8 <sup>5)</sup>	(Shaffer and Lighthart, 1997)
			5-8 <sup>5)</sup>	(Lundholm and Rylander, 1983)
	<i>Bacillus subtilis</i>		7 <sup>5)</sup>	(Lighthart et al., 1993)
Aktinomyce ter	Aktinomyce ter		0.65-1.1 <sup>5)</sup>	(Meklin et al., 2002)
	<i>Micropolyspora faeni</i> <sup>3)</sup>	0.7-1.5 (Lacey, 1986)	1.9 <sup>5)</sup>	(Lacey and Dutkiewicz, 1976)
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	0.5-1.5 (Lacey, 1989)	0.58 <sup>5)</sup>	(Lacey and Dutkiewicz, 1976)

<sup>1)</sup> Synonym *Stachybotrys atra*, <sup>2)</sup> Synonym: *Lecanicilium lecanii*, <sup>3)</sup> Synonym *Saccharopolyspora rectivirgula*, <sup>4)</sup>  $D_{ae}$  målt med en APS (Aerodynamic Particle Sizer)

<sup>5)</sup> Peak antal af dyrkbare organismer målt med en Andersen sampler. \*Størrelse på svampesporer er efter (Domsch et al., 1993).



### 3.1.2 Mikroorganismer

Skimmelsvampe (i det følgende kaldet svampe) og bakterier er mikroorganismer, som altid er til stede i almindelig luft. Mikroorganismer kan være til stede i luften som enkelte sporer, klumper af sporer eller celler eller associerede med andre partikler. I eksemplerne i tabel 3.1. kan det ses at dyrkbare bakterier ofte findes i klumper af flere bakterieceller eller som associerede med andre partikler.

Aktinomycceter er Gram-positive bakterier, der på dansk også kaldes strålesvampe. De forekommer som en naturlig del af mikrofloraen i jord, og i fersk- og havvand, hvor de indgår i nedbrydningen af organisk materiale. Til forskel fra andre bakterier vokser aktinomycceter ved at danne hyfe-strukturer, der minder om svampes vækst (Anderson and Wellington, 2001). Når myceliet modnes kan der dannes sporer, som frigives til luften (Górny et al., 2003).

I ikke problematisk indeklima i Danmark findes svampe ofte i koncentrationer omkring 100-500 svampesporer  $m^{-3}$ . I miljøer hvor organisk materiale håndteres kan koncentrationer af hhv. svampe og bakterier være helt op til  $10^7 m^{-3}$  og  $10^9 m^{-3}$  (Madsen, 2006c). Eksponering for svampe er i landbrugsmiljøer fundet associeret med symptomer som øjenirritation, løbende næse og hoste (Eduard et al., 2001).

I arbejdsmiljøer hvor organisk materiale håndteres, f.eks. i kornproduktion og i biobrændselsanlæg, kan aktinomycceter forekomme i høje koncentrationer i luften (Halstensen et al., 2007). Personer der eksponeres for høje koncentrationer af luftbårne aktinomycceter kan udvikle luftvejssygdommen 'farmers lung'.

### 3.1.3 Endotoksin

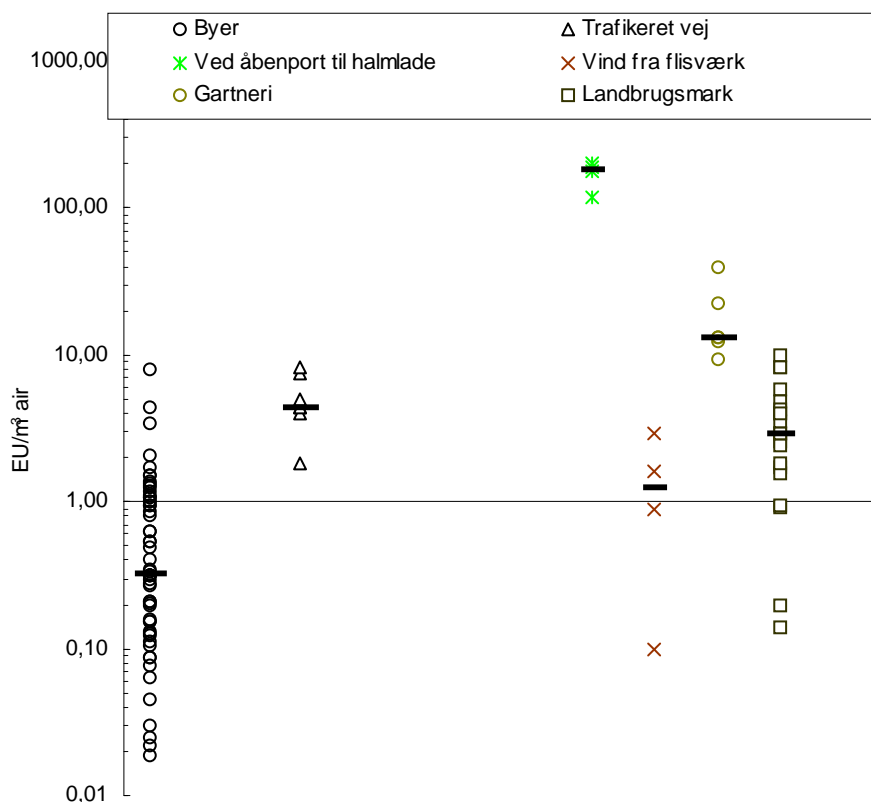
Endotoksin er en del af Gramnegative bakteriers cellemembran, og endotoksin forbindes med forskellige luftvejssygdomme. Endotoksin kan forstærke helbredseffekten af f.eks. udsættelse for svampesporer, og derfor er det i en risikovurdering af bioaerosoleksponering vigtigt at kende endotoksin eksponeringen. Vi har målt endotoksin koncentrationen i luftprøverne indsamlet i dette projekt. I tabel 3.2. er givet eksempler på eksponeringsniveauer målt med nøjagtig samme metoder, som er anvendt i vores studium. Disse værdier kan derfor sammenlignes med personbårne målinger af endotoksin eksponeringer foretaget i vores studium.

Tabel 3.2. Eksponering (personbåren) for endotoksin i forskellige miljøer hvor GSP-samlere er anvendt til sampling af inhalerbart støv og Limulus Kinetic Assay er brugt til at kvantificere luftbærent endotoksin.

Miljø	Eksponering EU m <sup>-3</sup>		Referencer
	Interval	Median eller geometrisk middelværdi	
Savværksarbejdere <sup>a</sup>	<2,5-348	21	(Dennekamp et al., 1999)
Svinefarmere <sup>a</sup>	10-8800	464	(Radon et al., 2001b) (Radon et al., 2002)
Svinefarmere <sup>a</sup>	0,08-16720	610	(Radon et al., 2002)
Kyllingefarmere <sup>a</sup>	152-13080	2060	(Radon et al., 2001a) (Radon et al., 2002)
Gartneriarbejdere <sup>a</sup>	0,4-101	2,8	(Monso et al., 2002) (Radon et al., 2002)
Biobrændselsarbejdere	In-119000	55	(Madsen, 2006b)
Isoleringsarbejdere <sup>b</sup>	In	2,3-1300	(Breum et al., 2003)
Skraldemænd	<4-7182	24-53	(Wouters et al., 2002)
Rensningsanlægsarbejdere	0,6-2093	27	(Smit et al., 2005)

<sup>a</sup> Data er konverteret fra ng to EU. <sup>b</sup> Kun median værdier er nævnt i artiklen. in=ikke nævnt.

I figur 3.1 er vist eksempler på koncentrationer af endotoksin målt med stationære samplere i Danmark. I miljøer hvor der ikke håndteres organisk materiale er koncentrationen af endotoksin omkring 0,5 til 2,5 EU m<sup>-3</sup>.



Figur 3.1. Koncentrationer af endotoksin i forskellige miljøer i Danmark, målt med stationære samplere (Madsen, 2006a).

### 3.1.4 $\beta$ -glucan fra svampe og pollen

Stoffet (1-3)--D-glucan findes i både cellevægge af svampe, i døde såvel som i levende svampesporer (Fogelmark and Rylander, 1997) og i små svampepartikler (Madsen et al., 2009) samt nogle bakterier og pollen (Foto et al., 2004). Stoffet (1-3)--D-glucan kan bruges som en indikator for svampeeksponering (Chew et al., 2001) og til at identificere boliger med skimmelp problemer (Foto et al., 2005). Undersøgelser har også vist, at (1-3)--D-glucan kan fremkalde inflammation i luftvejene (Bonlokke et al., 2006; Rylander, 1999; Sigsgaard et al., 2000; Thorn et al., 2001), derfor har vi kvantificeret  $\beta$ -glucan i luftprøver indsamlet i dette studium.

### 3.1.5 Enzymer og mykotoksiner

Mikroorganismer producerer ekstracellulære enzymer, og nogle mikrobielle enzymer tilsat produkter som f.eks. foder har vist sig at forårsage sundhedsskadelige virkninger. Undersøgelser i miljøer, hvor materialer der indeholder enzymer af svampeoprindelse håndteres viser, at mange enzymer kan forårsage luftvejsproblemer (Cullinan et al., 2001; Doekes et al., 1999; Hanzi et al., 1993; Houba et al., 1996; Jeffrey et al., 1999; Nieuwenhuijsen et al., 1999; Quirce et al., 1992; Vanhanen et al., 1996). Nogle planter er i stand til at producere endo-kitinaser som forsvar mod svampeangreb, og disse kitinaser kan være allergener i produkter fremstillet af plantematerialer (Blanco et al., 1999; Posch et al., 1999; Sowka et al., 1998). Almindeligt forekommende svampe som *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* og *Trichoderma* producerer kitinasen NAGase (N-acetyl--D-glucosaminidase) (Calonje et al., 1997; Draborg et al., 1995; Hearn et al., 1998; Lahoz et al., 1976). En signifikant sammenhæng er fundet mellem antallet af svampe i luftbærent støv

og NAGase aktivitet (Allermann et al., 2006;Madsen, 2003;Madsen and Würtz, 2005).

På trods af de allergene effekter af flere mikrobielle enzymer er enzymer fra svampe ikke kvantificeret i undersøgelser af forholdet mellem eksponering for svampe og sundhedsskadelige virkninger. Således er koncentrationer af svampeenzymer i luften ikke kendt. I dette studium blev eksponering for udvalgte enzymer målt.

Svampe kan producere sekundære metabolitter, der anses for at spille en afgørende rolle i deres naturlige miljø. De fleste af disse stoffer fungerer som toksiner overfor planter, bakterier og andre svampe. Svampemetabolitter, der forårsager en toksisk reaktion ved lave doser i vertebrater, anses for at være mykotoksiner (Nielsen, 2003). Der kendes over 400 mykotoksiner, og det er forventeligt, at mange flere endnu ikke er identificeret (Hardin et al., 2009).

Håndtering af svampeinficeret materiale kan frigive luftbårne partikler, der er kontaminerede med mykotoksin, hvorved arbejderes luftveje eksponeres for disse (De Lucca, 2007). Hos mennesker mener man, at mykotoksiner kan forårsage inflammation og deraf følgende irreversible skader på lungerne (De Lucca, 2007). Der findes kun begrænsede mængder toksikologiske data og kun for et lille antal af de kendte mykotoksiner. Disse data er oftest baseret på eksponering igennem fødevarer (Hardin et al., 2009).

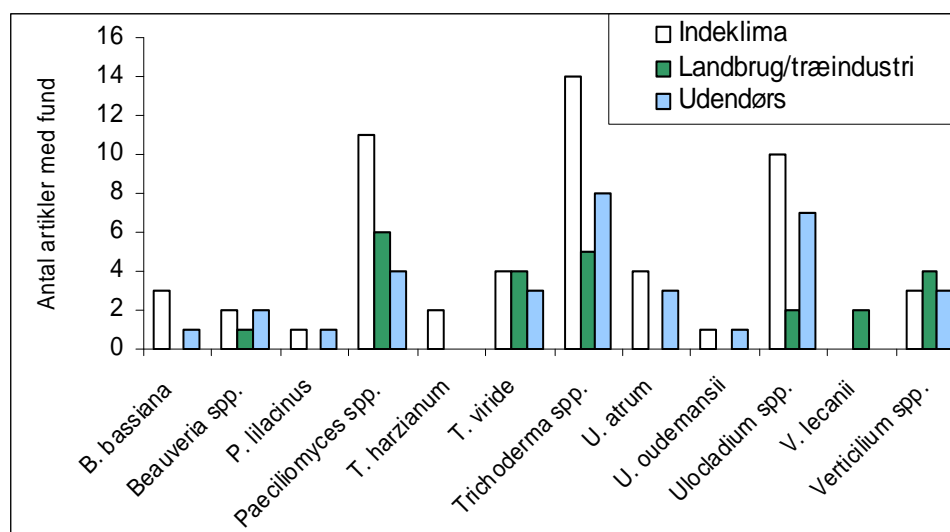
Studier relateret til produktion af grønsager i væksthuse har vist, at svampe isoleret fra mugne tomater og fra materialer fra agurkevæksthuse kan danne mykotoksiner *in vitro* (Harwig et al., 1979;Ruiz et al., 1996). Dyrkning af luftbårne svampe som f.eks. *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. og *Trichoderma* sp. har ligeledes vist, at disse kan danne mykotoksiner (Cvetnic and Pepeljnjak, 1997;Fischer et al., 2000). Desuden har forskere kunnet måle forekomst af mykotoksiner fra svampen *Stachybotrys chartarum* i luftprøver fra svampekontaminerede bygninger (Brasel et al., 2005;Gottschalk et al., 2008).

Selvom mykotoksiner er mistænkt for at spille en rolle i forhold til svampes skadevirkning ved inhalering, er den samlede viden om luftbårne mykotoksiner endnu lille, og yderligere forskning er nødvendig for at forstå mykotoksineres rolle i forhold til arbejdsrelaterede luftvejssygdomme. I denne rapport er to metoder blevet benyttet til at ekstrahere mykotoksiner fra luftprøver taget i et gartneri og to andre relevante miljøer, hvor der arbejdes med organisk materiale. Prøverne blev analyseret for 10 forskellige mykotoksiner, der kendes fra fødevarer og indendørsmiljøer.

### 3.1.6 Baggrundseksponering for mikroorganismer anvendt til biologisk bekæmpelse

Vi har publiceret et litteraturreview om naturlig udbredelse af og eksponering for svampe-slægter og -arter (*Beauveria*, *Lecanicillium/Verticillium*, *Paecilomyces/Isaria*, *Trichoderma*, *Ulocladium*) som er brugt til biologisk bekæmpelse (Madsen et al., 2007). I den refererede artikel har vi sammenstillet den nuværende viden om luftbårne svampesporer, der anvendes til biologisk bekæmpelse i forskellige miljøer. Artiklen bygger på en bred indsamling af litteratur og har eksempler på eksponeringsniveauer og helbredseffekter forårsaget af de udvalgte svampe (*Beauveria*, *Paecilomyces/Isaria*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Lecanicillium/Verticillium*). Metoder, anvendt til kvantificering af luftbårne svampe, er ikke

standardiserede, hvilket gør de mange data svære at sammenholde med hinanden. I figur 3.2. er antal artikler med fund af eksponering for slægter eller arter som anvendes til biologisk bekæmpelse, som funktion af miljø fremstillet.



Figur 3.2. Antal artikler med fund af eksponering for svampeslægter eller arter som anvendes til biologisk bekæmpelse. Artikler er opdelt i indeklima, landbrug+træindustri og udendørs miljøer. I alt blev 383 artikler vedrørende eksponering gennemgået.

Det blev fundet, at *Beauveria bassiana*, *L. lecanii* og *P. lilacinus* kun sjældent kan findes i luftprøver, og at *P. fumosoroseus* og *P. farinosus* ikke var rapporteret fundet. Dette tyder på at mennesker kun sjældent eksponeres for disse svampe. Til gengæld kunne det ses at *Beauveria bassiana* forekom i middelhøje koncentrationer, når den blev fundet ( $250 \text{ cfu m}^{-3}$ ). Ligeledes blev der kun i få artikler rapporteret om fund af *T. harzianum*, *T. polysporum* og *U. oudemansii* i luftprøver. Til gengæld kunne arterne *T. viride* og *U. atrum* ofte findes i luftprøver. Den manglende identifikation af svampesporene til artsniveau kan kamouflere, at svampearter anvendt i biologisk bekæmpelse er mere almindelige end det kan læses af undersøgelsen (Madsen et al., 2007).

### 3.2 Foreslåede grænseværdier og grænseværdier

Arbejdstilsynet har ingen grænseværdier for eksponering for mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse.

Grænseværdien for total organisk støv er  $3 \text{ mg m}^{-3}$  og for træstøv  $2 \text{ mg m}^{-3}$  (Arbejdstilsynet, 2007). Indholdet af mikroorganismer og endotoksin per mg støv varierer meget f. eks fandt (Lenhart et al., 1990)  $124 \text{ EU mg}^{-1}$  respirabel støv fra et kyllingeslagteri, mens (Sigsgaard et al., 1994) fandt omkring  $30 \text{ EU mg}^{-1}$  total støv fra affaldshåndtering. Denne variation gør, at det er vigtigt at måle indholdet af mikroorganismer og endotoksin i luftprøver og, at det ikke er nok at forholde sig til en grænseværdi for støv.

Der er ingen officielle grænseværdier for eksponering for endotoksin og mikroorganismer i arbejdsmiljøet, men der findes værdier baseret på

videnskabelige studier i forskellige arbejdsmiljøer (Tabel 3.3). Disse værdier er ret forskellige og det kan delvist skyldes, at de er baseret på forskellige typer studier dvs. både epidemiologiske studier med blandede eksponeringer og laboratorieforsøg, hvor endotoksin fra en bakterie er anvendt.

Idet der anvendes forskelligt prøvetagningsudstyr og strategier for prøvetagningen og de efterfølgende analyser, er det vanskeligt at sammenligne eksponeringsniveauet i forskellige undersøgelser. Dette medfører, at en sammenstilling af de dosis-respons forhold, som grænseværdifastsættelser skal baseres på, er vanskelig. Artssammensætningen af mikroorganismer i luften varierer i forskellige miljøer men den specifikke betydning af artssammensætningen kendes ikke nøje. Dette forhold gør det svært at fastsætte grænseværdier. Endelig skal det nævnes at nogle af de foreslåede grænseværdier er baseret på symptomer og koncentrationer af eksponeringskilder målt i f.eks. jordbruget mens andre er baseret på laboratorieforsøg med eksponering af andre befolkningsgrupper. Dette kan være et problem, idet der kan være sket en selektion, således at de der arbejder i jordbruget er de der rent faktisk kan tåle høje eksponeringer. Desuden har mange ansatte i jordbruget været højt eksponerede som børn, hvilket måske kan gøre dem mere tolerante som voksne.

En norsk undersøgelse af sammenhæng mellem forskellige symptomer og eksponering for svampe i jordbrug viste flg. sammenhænge mellem eksponering for svampe (i 8 timer) og symptomer:

20.000-500.000 svampe sporer  $m^{-3}$ : øjne og næse irritation  
 500.000-17.000.000 svampe sporer  $m^{-3}$ : hoste

Tabel 3.3. Foreslåede grænseværdier og beregnede ingen effekt værdier.

Eksponering	Foreslåede grænseværdier og beregnet ingen effekt værdi	Reference
	Enhed $m^{-3}$	
Inhalerbar endotoksin	50 EU	(Dutch Expert Committee on Occupational Standards, 1998)
Endotoksin	100 EU	ICOH
Total Endotoksin	614 EU	(Donham and Cumro, 1999)
Endotoksin	30-75 EU	(Smid, 1993)
Endotoksin	800 EU	(Haglund and Rylander, 1984)
Endotoksin	90 EU	(Castellan et al., 1987)
Endotoksin	<10-200 EU	(Kennedy et al., 1987)
Endotoksin	<150 EU	(Smid et al., 1992)
Endotoksin	330 EU	(Rylander et al., 1985)
Respirabel endotoksin	0,35 EU	(Donham and Cumro, 1999)
Mikroorganismer (bakterier+svampe)	50.000-430.000 Cfu	(Dutkiewicz, 1994)
Svampe	10.000 Cfu	(Heida et al., 1995)
Termofile actinomyceter	20.000 Cfu	(Dutkiewicz, 1994)
Total bakterier	5.000-10.000	(Malmros et al., 1992)
Total støv	2,4 Mg	(Donham and Cumro, 1999)
Respirabel støv	0,16 Mg	(Donham and Cumro, 1999)

## 4 Metoder

### 4.1 Gartnerier der er lavet eksponeringsmål i

Vi sendte invitationer ud til 21 gartnerier. Heraf blev seks efter samtale fravalgt, idet de ikke var relevante for projektet. Et antal på seks ønskede ikke at deltage, hovedsagelig pga. travlhed; ni ønskede at deltage. I 2007-2008 udførte vi målinger i disse gartnerier en til fire gange. Tre af gartnerierne (A, G og H) er tomatgartnerier, to er agurkegartnerier (C og E) og tre er kålgartnerier (B, D, F) og heraf havde F også bladselleri (Tabel 4.1). Gartneri I er et jordbærgartneri og i dette gartneri er der kun lavet stationære målinger. Ved ansøgning af projektet var det meningen, at vi kun skulle lave målinger i gartnerier på Sjælland og Fyn pga transportudgifter, men det var ikke muligt, så der er også lavet målinger i Jyske gartnerier.

Igennem vores interviews med gartnerierne erfarede vi, at produktet Dipel, der er baseret på bakterien *Bacillus thuringiensis*, er det mest benyttede mikrobiologiske bekæmpelsesmiddel i de gartnerier vi besøgte. Af tabel 4.1 fremgår datoer for måledage og forbruget af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

Tabel 4.1. Afgrøder og brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i gartneri A til I.

Gartneri	Måledage	Afgrøder	Brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler
A	22/05/07 12/11/07	Tomat	Supresivit er benyttet i et andet væksthuse end dem vi besøgte
B	22/08/07 (broccoli) 26/08/08 (hvidkål) 01/10/08 (hvidkål) 27/10/08 04/11/08 (hvidkål)	Broccoli, og hvidkål	01/08/07 Dipel ES, 2 l/ha 17/08/07 Dipel ES, 2 l/ha 15/08/08 Dipel ES, 2 l/ha 22/08/08 Dipel ES, 2 l/ha 29/08/08 Dipel ES, 2 l/ha 05/09/08 Dipel ES, 2 l/ha
C	13/06/07 9+11/10/07	Agurk	Nej
D	23/08/07	Hvidkål	Nej
E	26/06/07 08/08/07	Agurk	Nej
F	14-15/08/07 12/09/07	Broccoli og bladselleri	Bladsellerimark, Dipel, 22/07/07 Broccolimark ikke behandlet
G	19/06/07 14/11/07	Tomat	Dipel, hele sommeren, pletsprøjtning, observeret ved besøg 19/06/07. 5-6 liter anvendes ved behandling.
H	20/02/08 26/02/08 18/03/08 20/05/08	Tomat	Mycostop og Supresivit. Småplanter var fra producentens side behandlet med et <i>Trichoderma</i> baseret produkt.

I	18/06 08 23/06 08 03/07 08 06/08 08	Jordbær	Behandlet med <i>Trichoderma</i> (Binab) Behandlet med Dipel det foregående år.
---	--	---------	--

For at få et udtryk for eksponeringen for bioaerosoler er det vigtigt, at arbejdet i gartnerierne udføres på normalvis og at de ansatte forstyrres så lidt som muligt af arbejdet. Vi har målt eksponering over en arbejdsdag af gangen dvs. de ansatte kan have udført forskellige opgaver i løbet af dagen. Vi har noteret varigheden af de forskellige arbejdsopgaver (Tabel 4.2). Høst eller plukning af afgrøder var den arbejdsopgave der blev udført af flest af de personer vi målte på. I høst sæsonen var der ansat flere folk end uden for høstsæsonen. En del personer arbejdede også med pasning af planter, hvilket ofte var at afskære blade fra tomat eller agurkeplanter.

Tabel 4.2. Arbejdsopgave på måledage og hyppighed af hovedarbejdsopgaver\* i gartneri A til H.

Gartneri	Afgrøder	Måledage	Hovedarbejdsopgaver på måledag	Hyppighed af hovedarbejdsopgaver	Andre opgaver
A	Tomat	22/05/07	Høst af tomat	Dagligt forår, sommer og efterår	Pakning, pasning
		12/11/07	Rydning af tomatplanter	Få dage, efterår	
B	Broccoli, og hvidkål	22/08/07	Høst af broccoli	Sommer og efterår	
C	Agurk	13/06/07	Høst af agurk	Dagligt forår, sommer og efterår	Pakning, binde snore op, pasning
		9/10/07	Høst af agurk	Dagligt forår, sommer og efterår	
		11/10/07	Rydning af agurkeplanter	Få dage, efterår	
D	Hvidkål	23/08/07	Høst af hvidkål	Sommer og efterår	
E	Agurk	26/06/07	Høst af agurk	Dagligt forår, sommer og efterår	Pakning, pasning
		08/08/07	Høst af agurk	Dagligt forår, sommer og efterår	
F	Broccoli og bladselleri	15/08/07	Pakning af broccoli	Sommer og efterår	
		12/09/07	Høst af broccoli og bladselleri	Sommer og efterår	
G	Tomat	19/06/07	Høst af tomat	Dagligt forår, sommer og efterår	Pakning, pasning
		14/11/07	Rydning af tomatplanter	Få dage, efterår	
H	Tomat	20/02/08	Pasning af små tomatplanter	Vinter og tidligt forår	
		26/02/08	Pasning af små tomatplanter	Vinter og tidligt forår	
		18/03/08	Pasning af små tomatplanter	Vinter og tidligt forår	
		20/05/08	Høst af tomat	Dagligt forår, sommer og efterår	Pakning, pasning

\*Hovedarbejdsopgave er defineret som den opgave der blev udført over i 50 % af dagen og af over 50 % af medarbejderne i de målte arbejdsområder.



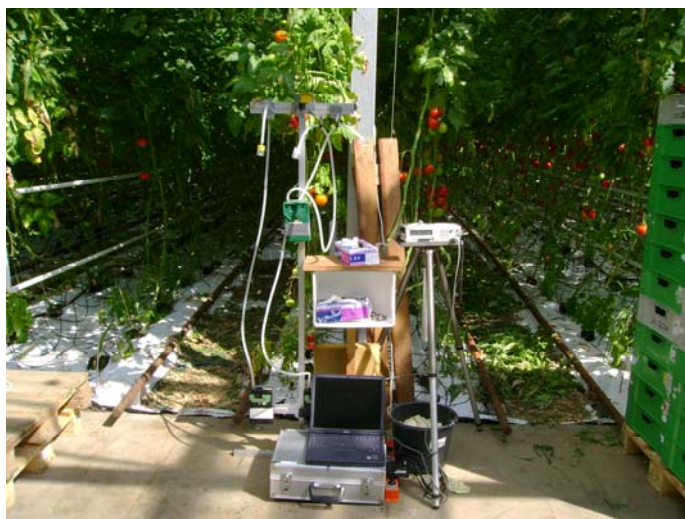
## 4.2 Luftprøver i gartnerier

Ansattes eksponering for inhalerbart støv og mikroorganismer blev målt med GSP (CIS, inhalerbar sampler, fra BGI, Waltham, MA, USA) samplers (flow  $3,5 \text{ l min.}^{-1}$ ) (Figur 4.1). Hver person bærer én sampler monteret med polycarbonatfilter og én monteret med teflonfilter. Målingerne blev foretaget for polycarbonat filtre foretaget i gennemsnitlig 272 minutter (median=296 minutter) og for teflon filtre i 278 minutter (median=286 minutter). Eksponeringsdata er tidsvægtede, dvs. et gennemsnit over eksponeringen i den målte periode. I hvert gartneri blev der målt på 4-10 personer. Dog blev der i jordbærgartneriet kun målt med stationært udstyr.



Figur 4.1. Gartneriansatte høster mens de bærer bioaerosol samplers, som senere analyseres for indhold af inhalerbart støv, mikroorganismer og mikroorganisme bestanddele.

Stationært måleudstyr blev placeret i arbejdsområder tæt på, hvor ansatte opholdt sig (Figur 4.2). Måleudstyret blev placeret i 1,5m højde for, at det skulle være i højde med indåndingszonen. Ved hver stationær opstilling var der én Millipore-sampler monteret med teflonfilter og én monteret med polycarbonatfilter (flow  $1,9 \text{ l min.}^{-1}$ ). Ved mindst en stationær måleopstilling i hvert gartneri og på hver måledag var der placeret en Grimm-partikeltæller og måler eller en APS (Aerodynamic Particle Sizer) - partikeltæller og måler. Målingerne blev foretaget over en arbejdsdag.



Figur 4.3. Stationært måleudstyr placeret i 1,5m højde. Ved hver stationær opstilling var der 2 Millipore-samlere. Ved en udvalgt stationær måleopstilling i hvert gartneri var der også placeret en Grimm-partikel tæller.

#### 4.3 Ude-reference mål

For at få et udtryk for, hvor stor en andel af eksponeringen for støv og mikroorganismer, der skyldtes selve arbejdet og opholdet i gartnerierne - og dermed ikke var baggrundseksponering blev stationært måleudstyr placeret uden for gartnerierne, således at udluftningsluften fra gartneriet ikke blæste ind i samplerne. Her blev der hver dag anvendt to Millipore-samlere; én monteret med teflon- og én med polycarbonatfilter.

#### 4.4 Analyser af luftprøver

Alle prøver på teflonfiltre blev først akklimatiseret og anvendt til gravimetri og efterfølgende til endotoksin-analyse. I forbindelse med den gravimetrisk bestemmelse blev der anvendt blindfiltre. Efter gravimetrisk bestemmelse blev filtrene udvasket, suspensionerne blev centrifugeret og supernatanten blev udportioneret og frosset ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . Efterfølgende blev prøverne analyseret for endotoksin indhold efter den kinetiske metode (Limulus Amøbocyt Lysat (LAL) testen) med QCL Endotoksin kit (Madsen et al., 2004). Endvidere blev enzymerne NAGase (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase),  $\alpha$ -amylase, xylanase og  $\beta$ -glucosidase kvantificeret ved en spektrofotometrisk metode (Madsen, 2003). Prøverne inkuberes med et substrat, hvor p-nitrophenol er koblet til og ved enzymaktivitet frigives P-nitrophenol og dette giver en gulfarvning som kvantificeres ved OD-måling ved 405 nm.

Mikroorganismer, opsamlet på polycarbonatfiltre, blev udvasket med ekstraktionsvæske og analyseret efter CAMNEA-metoden (Palmgren et al., 1986). Kimtællinger og tællinger i mikroskop blev udregnet som henholdsvis  $\text{cfu m}^{-3}$  (kolonidannende enheder, dvs. antal dyrkbare mikroorganismer pr.  $\text{m}^3$ ) og antal sporer pr.  $\text{m}^3$  luft. De dyrkbare mikroorganismer blev opdelt i:

Mesofile aktinomycceter  
 Termofile aktinomycceter  
 Mesofile svampe  
***Aspergillus fumigatus***

*Trichoderma* spp.  
*Beauveria* spp.  
*Bacillus cereus*-gruppen

*Beauveria* spp. (Meyling and Eilenberg, 2006a) og *Bacillus cereus*-gruppen (Hansen et al., 2010), som ikke er en del af CAMNEA metoden, blev kvantificeret på selektive medier (se også afsnit 4.8).

#### 4.5 Mykotoksin analyser

Luftprøver indsamlet med personbårne samplere i gartneri C-1 (tallet 1 henviser til måledag 1) under nedtagning af agurkeplanter i efteråret 2007 blev analyseret for mykotoksiner. Til sammenligning blev luftprøver fra et biobrændselsanlæg og en græsfrøfabrik også medtaget. Prøverne fra gartneriet var indsamlet og behandlet som beskrevet i 4.2 og 4.4.

Inden ekstraktion blev prøvemateriale afvejet. To forskellige ekstraktionsmetoder blev anvendt. Den 'klassiske' metode var at ekstrahere prøvefiltrerne i 5 ml metanol natten over. For ekstraktion vha. en ASE-unit blev prøvemateriale pakket i en ASE-unit med autoklaveret sand. Ekstraktionen forløb ved 40 °C og 2000 psi i 10 min med metanol som opløsningsmiddel. Efter hver ekstraktion blev metanolen bortdampet med N<sub>2</sub>, og prøver blev gemt ved 4 °C til videre analyse.

Analyse af mykotoksinerne blev foretaget i laboratoriet ved GS-MS analyse af Mirko Peitzsch i henhold til (Bloom et al., 2008; Bloom et al., 2009). Mykotoksiner blev kvantificeret som ng mg<sup>-1</sup> støv.

#### 4.6 Indsamling af grønsager

Der blevet indsamlet grønsager på fem gartnerier. Det drejede sig om to agurke-gartnerier, hvor indsamlingen er foregået i juni, et tomatgartneri, hvor der er indsamlet i juni og i november og to frilandsgartnerier, hvor der er indsamlet broccoli og bladselleri i august og september. Plantebeskyttelsesmidlet Dipel, som indeholder *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, er blevet anvendt på broccoli på gartneriet B, på bladselleri på gartneriet F og på tomat på gartneriet G. Der er blevet indsamlet 15 agurker, tomater, hele broccoli "hoveder" eller 10 hele bladselleri-planter ved hver indsamling. De indsamlede grønsager er alle blevet indsamlet fra et væksthuse eller en mark på en sådan måde, at de er repræsentative for hele væksthuset eller marken. Alle indsamlingerne foregik i forbindelse med indsamling af luftprøver.

I 2008 blev skæbnen af *Bacillus thuringiensis* HD1 (den aktive mikroorganisme i Dipel) på hvidkål efter udsprøjtning undersøgt. En mark (ca. 5 ha) på gartneriet B er blevet behandlet med Dipel fire gange i løbet af august og september (15/8, 22/8, 29/8 og 5/9) for at beskytte mod angreb af kålsommerfugle. Der blev indsamlet 10 tilfældige hele hvidkålplanter tre gange i løbet af efteråret (26/8; 1/10 og 4/11).

#### 4.7 Behandling af grønsagerne

Efter hjemtransport til laboratoriet blev grønsagerne opbevaret et eller to døgn på køl. Agurker og tomater blev skrællet, skrællerne blev overført til en stomacher pose og tilført 100 ml MQ-vand og stomachet i to gange 1 minut. Fra broccoli-”hovedet” blev der udtaget delprøver på ca. 25 g, delprøverne blev behandlet som agurk og tomat. Fra bladselleri blev der udtaget tre bladstilke, en placeret yderst på planten, en placeret inderst i planten og en midt mellem de to andre stilke; hvis den enkelte stilk vejede betydeligt mere end 25 g, så blev den delt på langs og den ene halvdel brugt som prøvemateriale; stilkene blev ellers behandlet som agurk og tomat. Fra hvert enkelt af de ti hvidkål blev antallet af *Bacillus cereus*-lignende bakterier opgjort på et ydreblad, på et blad fra selve kålhovedets overflade og på et blad inde i hovedet (det femte blad talt fra overfladen). Fra hvert blad blev en delprøve på ca. 20 g analyseret. Bladene blev iverigt behandlet som beskrevet for agurk og tomat. Væsken i stomacher poserne blev herefter udpladet på forskellige selektive dyrkningsmedier, eventuelt efter en passende fortynding. Væsken blev holdt på isbad under hele proceduren.

Forekomst og antal af *Bacillus cereus*-lignende bakterier og *Beauveria* spp. blev opgjort i alle prøverne, mens forekomst af *Trichoderma* spp. blev opgjort i alle prøver undtagen fra hvidkål. Forekomst af *Beauveria* spp. blev opgjort på delprøver af suspensionerne frosset i glycerol ved -20 °C. Undtaget herfra er 14 broccoliprøver fra en indsamling i august 2007, hvor der blev udpladet direkte på selektivt medium.

#### 4.8 Kvantificering af *Trichoderma* spp., *Bacillus cereus* og *Beauveria* spp.

##### 4.8.1 Karakterisering af *Beauveria* spp. ved mikroskopi

I alt er 17 isolater af *Beauveria* spp. indsamlet fra luft (14 isolater) og grønsagsoverflader (3 isolater). Isolaterne blev rendyrket på Sabouraud Dextrose Agar (SDA) og gemt ved -80 °C i stamkultursamlingen ved Institut for Jordbrug og Økologi, KU-LIFE. Hvert isolat blev dyrket i 4-5 uger på SDA v. 23 °C og konidier fra kulturerne blev placeret på objektglas i 90 % mælkesyre under dækglas. Dimensionerne af konidier (længde og bredde) blev målt ved lysmikroskopi i et Olympus PROVIS lysmikroskop ved 400x forstørrelse og målinger blev foretaget i programmet Cell A efter digitalisering af et synsfelt. I alt 21 repræsentative konidier blev målt for hvert isolat. Til sammenligning blev konidier fra det biologiske bekæmpelsesprodukt BotaniGard (baseret på stammen GHA) samt en repræsentant for *Beauveria brongniartii* målt. Målingerne blev registreret med en præcision af 1/100 µm. For hvert isolat blev længde/bredde forholdet af konidierne beregnet, da dette forhold konventionelt er den vigtigste morfologiske diagnostiske karakter for arterne inden *Beauveria*. Dette mål blev analyseret i Proc glm i SAS for identifikation af forskelle mellem isolater; disse blev identificeret vha. lsmeans optionen.

##### 4.8.2 Karakterisering af *Beauveria* spp. ved sekventering af DNA

Isolater ud fra enkelt sporer blev fremstillet af de 17 *Beauveria* spp. isolater indsamlet i gartnerier samt 10 gentagne isoleringer fra produktet BotaniGard (baseret på isolatet GHA). Hvert isolat blev dyrket i flydende vækstmedium ved at inokulere konidier fra kulturer på SDA i sterile koniske kolber med 20

ml vækstmedie. Kolberne blev inkuberet i 3 dage ved 20 °C på et rystebord v. 170 rpm. Vækstmediet blev filtreret fra svampematerialet, som derefter blev samlet i et 1,5 ml Eppendorfrør og frysetørret. DNA blev ekstraheret fra det frysetørrede materiale vha. ekstraktionskittet Nucleon Phytopure kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) ud fra instruktionen. Pellet blev efterfølgende resuspenderet i sterilt H<sub>2</sub>O. DNA sekvenser blev produceret for alle isolater af *Beauveria* spp. fra gartnerier for den komplette ITS (internal transcribed spacer mellem den store og lille subunit af rDNA og inkluderende 5.8S rDNA) region. Regionen blev amplificeret ved PCR vha. de generelle svampeprimere ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') og ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). PCR reaktionerne fandt sted i 25 µl reaktionsvolumen bestående af 17,87 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10X Dynazyme buffer, 0,5 µl 10mM dNTP, 1,25 µl af hver primer (10mM), 0,63 µl Dynazyme II polymerase og 1 µl DNA. PCR foregik ved indledende denaturering i 3 min ved 94 °C, derefter 35 cykler med denaturering i 1 min ved 94 °C, annealing i 1 min ved 55 °C og ekstension i 1.5 min ved 72 °C. Efter 35 cykler afsluttedes programmet med 7 min ekstension ved 72 °C. PCR produkterne blev oprenset med GFX PCR DNA og Gel band purification kit (GE Healthcare, UK) ud fra instruktionerne. 100 ng PCR produkt for hvert isolat blev inddampet i 1.5 ml Eppendorfrør og sendt til MWG, Tyskland, for at blive sekventeret. To sæt PCR produkt blev sendt for hvert isolat sammen med de to primere. Sekvenser blev korrigeret om nødvendigt, tilskåret og samlet i programmerne ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Australia) eller BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) og alle sekvenser blev samlet og en multipel 'alignment' blev konstrueret vha. proceduren ClustalW. Denne alignment inkluderede også referencesekvenser fra allerede publicerede studier, så der var mulighed for at sammenligne med kendt materiale. Disse sekvenser blev nedtaget fra GenBank. Den multiple alignment blev importeret i programmet PHYLIP (freeware tilgængeligt på nettet: <http://www.phylip.com/>), hvori sekvenserne blev sammenlignet vha. parsimoni i proceduren Dnapars på baggrund af 1000 computer-genererede 'bootstrapped' datasæt ud fra det originale datasæt, dannet vha. proceduren Seqboot. De genererede 'most-parsimonious trees' blev efterfølgende samlet i et enkelt 'majority rule consensus tree' i proceduren Consense og præsenteres som et rektangulært kladogram efter import i programmet TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

#### 4.8.3 Karakterisering af *Trichoderma* spp.

Til selektiv dyrkning af *Trichoderma* spp. ekstraheret fra luftfiltre og fra grønsagsoverflader blev anvendt *Trichoderma harzianum* selective media (THSM) (Williams et al., 2003). Mediet består af 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.9 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.15 g KCl, 0.15 g Rose Bengal, 3 g glucose og 20 g agar opløst i 950 ml MilliQ H<sub>2</sub>O der efter autoclaving (121 °C i 15 min) og afkøling er tilsat følgende antibiotika opløst i 40 ml MilliQ vand: 0.25 g chloramphenicol, 9.0 ml streptomycin (1% wt/vol), 0.2 g quintozone opløst i chloroform og 1.2 ml propamocarb (772 g l<sup>-1</sup>). Efter passende ti-folds fortynding i MilliQ vand blev triplikate agarplader i tre successive fortyndinger inokuleret med 100 µl. Efter 6-8 dages inkubering ved 20 °C i mørke blev svampekolonier optalt. Mediet er mindre selektivt end navnet angiver, og mange andre arter og slægter dannede kolonier på mediet. Derfor blev *Trichoderma* spp. identificeret ved sammenligning med positive kontroller ved 1) kolonimorfologi, 2) mikroskopi af dækglaspræparater og 3) *Trichoderma* spp. specifik PCR amplifikation af DNA (se nedenunder). De afrapporterede data er således baseret på såvel fremvækst på agarmediet og efterfølgende positiv identifikation baseret på morfologi og selektiv PCR.

DNA blev ekstraheret fra kolonier på agarplade med fryse-tø-koge metoden: Fryse-tø-koge metoden: Svampe ekstraheret fra filtre eller grønsager i MilliQ vand eller svampehyfer skrabet af agarplader og suspenderet i TE-buffer fryses ved  $-80^{\circ}\text{C}$  i minimum 5 minutter, optøs ved stuetemperatur, placeres ved  $102^{\circ}\text{C}$  i 10 minutter og centrifugeres ved 15.000 g i 10 minutter. Til slut overføres supernatanten til et nyt 1.5 ml Eppendorfrør. Prøven opbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$  eller  $-80^{\circ}\text{C}$ .

DNA fra ekstrakter fra filtre blev ekstraheret med to forskellige kit: Fast DNA Spinkit for Soil, katalog nr. 6560 (Q-BIOgene) og Ultra Clean Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Inc. katalognr. 12888). Brugsanvisningen for de to kit blev fulgt.

Da der blev fundet intet eller meget lidt svampe DNA i prøverne ekstraheret ved metode i), blev 39 prøver yderligere oprenset med MoBio PowerClean DNA Clean-up kit (MoBio Laboratories, Inc. katalognr. 12877) ifølge brugsanvisningen.

Da ingen *Trichoderma* spp. kolonier blev fundet på grønsager, blev der ikke foretaget yderligere molekylære undersøgelser af dette.

Specifik molekylær detektion af *Trichoderma* spp. blev udført med metode beskrevet af Hagn et al. (2007) med primerne uTf og uTr (Tabel 4.3). Ved meget lav forekomst af *Trichoderma* spp. blev der anvendt nested PCR: Initieelt blev *Trichoderma* spp. amplificeret med Tri18S-F/uTr, hvorefter produktet blev oprenset med QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, katalog nr. 28106) så primere og andre korte DNA fragmenter blev fjernet. Derefter blev *Trichoderma* spp. DNA amplificeret med uTf/uTr.

Til specifik detektion af svampen, der indgår i bekæmpelsesmidlet Supresivit blev der udviklet en specifik PCR-baseret metode. *T. harzianum* Su er valgt, da Supresivit var det eneste *Trichoderma*-baserede bekæmpelsesmiddel, der blev anvendt i de besøgte gartnerier.

Indledningsvist blev det DNA stykke, der amplificeres med de *Trichoderma* spp.-specifikke primere (uTf/uTr) sekventeret og sammenlignet med andre sekventerede nukleotidsekvenser i BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dette viste, at denne sekvens ikke er unik nok til at identificere robuste primere specifikke for en enkelt stamme af *T. harzianum*. Det antyder, at slægtskabet mellem forskellige stammer af *T. harzianum* er meget tæt. Det område af genomet, der sædvanligvis har stor variation og hvor specifikke primere ofte ligger, har stort set identisk sekvens for de forskellige *Trichoderma* spp. herunder *T. harzianum* stammer i tabel 4.3. Det er derfor heller ikke muligt at designe primere indenfor dette område.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) metoden (Hansen og Winding 1997) blev derefter anvendt til amplifikation af tilfældige DNA fragmenter. Båndmønstret fra PCR amplifikation med primerne OPA03, OPA09 og OPA10 (Eurofins MWG Operon's RAPD 10mer Kits) blev testet på renkulturer af 12 *Trichoderma* spp., deriblandt *T. harzianum* Su (Tabel 5.1). Med OPA03 blev det mest unikke bånd på ca. 650 bp for Su fundet. Derfor blev dette bånd klonet med TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen No. K450001) og sekventeret (MWG Operon). Ud fra sekvensen af det specifikke bånd og ved anvendelse af primer3 software (<http://sourceforge.net/projects/primer3/files/>) blev specifikke primere identificeret (SuOPA03+F/SuOPA03+R). Specificiteten af primerne blev indledningsvist testet med BLAST software

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Derefter blev PCR-betingelser for disse primere optimeret (Tabel 4.3.) og primernes specificitet testet mod de øvrige *Trichoderma* spp.

Tabel 4.3. Oversigt over DNA primere anvendt til PCR af *Trichoderma* spp., svampe generelt og udvikling af specifikke primere til *T. harzianum* Su. Alle primere var indkøbt hos MWG Operon.

Target	Primer navn	Primer sekvens	PCR betingelser	Referencer
<i>Trichoderma</i> spp.	uTf/uTr	5'-AACGTTACCAAAGTGT TG-3'/5'-AAGTTCAGCGG GTATTCCT-3	95° C 3'; 94° C 30", 58° C 30", 72° C 30", 30 cykler; 72° C 10'	Hagn et al. 2007
Svampe generelt	EF3/EF4	5'- TCCTCTAAATGACCAAGTTTG -3'/ 5'- GGAAGGG(AG)TGTATTTATT AG-3'	94° C 3'; 94° C 30", 48° C 1', 72° C 3', 40 cykler; 72° C 10'	Smit et al. 1999
Svampe generelt	Fung5/EF4	5'- GTAAAAGTCCTGGTTCCCC- 3'/5'- GGAAGGG(AG)TGTATTTATT AG-3'	94° C 3'; 94° C 30", 51.5° C 30", 72° C 30", 30 cykler; 72° C 10'	Smit et al. 1999
Tilfældige	OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'	94° C 3'; 94° C 1', 32° C 1', 72° C 2', 45 cykler; 72° C 10'	Operon Tech., CA, USA
Tilfældige	OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	94° C 3'; 94° C 1', 32° C 1', 72° C 2', 45 cykler; 72° C 10'	Operon Tech., CA, USA
Tilfældige	OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'	94° C 3'; 94° C 1', 32° C 1', 72° C 2', 45 cykler; 72° C 10'	Operon Tech., CA, USA
<i>Trichoderma</i> spp.	Tri18S-F/uTr	5' CTCCCAAACCCAATGTGA- 3'/ 5'- AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3	94° C 3'; 94° C 30", 65° C 30", 72° C 30", 30 cykler; 72° C 10'	egen/ Hagn et al. 2007
<i>T. harzianum</i> Supresivit	SuOPA3+F/ SuOPA3+R	5'- AGTCAGCCACGAACATAGAA GG-3'/5'- AGTCAGCCACCTCAGCAATAT G-3'	94° C 3'; 94° C 30", 69° C 30", 72° C 30", 30 cykler; 72° C 10'	egen

#### 4.8.4 Kvantificering af *Bacillus cereus*-lignende bakterier og *Beauveria* spp. på grønsager

En lille del mængde af væsken i stomacher-poserne blev efter varmebehandling (30 minutter ved 65°C) udpladet på tre 14 cm T3-agar plader (Travers et al., 1987). T3-plader er et sporuleringsmedium, hvor det er muligt at identificere *Bacillus cereus*-lignende kolonier ved deres morfologi (rugose kolonier med et is-krystal lignende udseende, som har en diameter som er større end 1 mm). Kolonier med denne morfologi blev talt, og de blev isoleret og renstrøget på T3-plader (dog blev maksimalt fem fra hver plade renstrøget).

Til kvantificering af *Beauveria* blev der i alle tilfælde udpladet 3 x 100 µl af den optøede suspension på det selektive BSM medium. Broccoli indsamlet på gartneri F 12/9 2007 blev dog også vasket på overfladen for at sammenligne isoleringsmetode. Ved denne procedure blev 2 vilkårlige småbuketter skåret af hovedet og placeret i en kolbe. Der blev tilsat 20 ml 0.05 % Triton X og stillet på rystebord i 30 min v. 300 rpm. Derfra blev udpladet 3 x 200 µl suspension på BSM. Pladerne blev inkuberet ved 23 °C i mørke

#### 4.8.5 Artsbestemmelse af *Bacillus cereus*-lignende bakterier isoleret fra grønsager

Artsbestemmelse af de isolerede *Bacillus cereus*-lignende bakterier blev foretaget ved hjælp af følgende metoder. Isolaterne blev undersøgt for tilstedeværelse af δ-endotoksin krystaller ved fasekontrast mikroskopi. DNA blev oprenset fra isolaterne efter vækst på LB-agar ved 30°C natten over. En koloni blev overført til 200 µl Tris-EDTA buffer og bakterierne blev lyseset ved inkubation ved 102°C i 10 minutter, hvorefter debris blev fjernet ved centrifugering (15.000 x g i 3 minutter). DNA blev overført til et rent rør og opbevaret ved 4°C. DNA-kvalitet blev vurderet ved en PCR-analyse af 16S-23S rRNA gen (rDNA) spacer regionen (Willumsen et al., 2005). Multiplex-PCR analyserne for hvorvidt isolaterne tilhører *Bacillus cereus*-gruppen, er meso- eller psychrotolerante (tilhører arten *Bacillus weihenstephanensis*) eller besidder *Bacillus anthracis*-specifikke gener, blev gennemført som beskrevet af Cheun et al., 2001, Francis et al. 1998, Hansen et al., 2001 og von Stetten et al. 1998. Primersættene fremgår af tabel 4.5. PCR produkterne blev analyseret ved 1.5% agarose gel elektroforese.

#### 4.8.6 Enterotoksisk potentiale af *Bacillus cereus*-lignende bakterier isoleret fra grønsager

Det enterotoksiske potentiale blev undersøgt ved hjælp af nogle forskellige PCR-analyser på det DNA som blev oprenset i forbindelse med artsbestemmelsen. Analyserne for generne *hblD* og *nheA* blev gennemført som beskrevet af Hansen og Hendriksen (2001), mens analyserne for den non-ribosomale peptid syntetase og for *zmaR* blev gennemført som beskrevet af Ehling-Schulz et al. (2004) og Raffel et al. (1996) Multiplex-PCR-analysen for CytK1 og CytK2 blev gennemført som beskrevet af Guinebretiere et al. (2006). Primersættene fremgår af tabel 4.5. PCR produkterne blev analyseret ved 1.5% agarose gel elektroforese.

#### 4.8.7 Verifikation af forekomst af *Bacillus thuringiensis* HD1 fra Dipel på bladselleri og forskellige kål.

Alle isolater blev undersøgt for hvorvidt de producerer et brunligt pigment i agar mediet (T3 se ovenfor), idet *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 i modsætning til de allerfleste *Bacillus cereus*-gruppe isolater ikke producerer et sådant pigment (Hendriksen, upubliceret). En stor del af isolaterne blev desuden ved fasekontrast mikroskopi undersøgt for tilstedeværelse af bipyramidale krystaller, som er et kendetegn for *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Endelig blev nogle isolaters tilhørsforhold til *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 verificeret ved hjælp af metodikken udviklet af Hendriksen og Hansen (2006). Denne metodik består af en PCR baseret verifikation af tilstedeværelse af et *cry1*-gen (hvilket giver ophav til aktiviteten overfor sommerfugle), en specifik variant af et flagellin gen samt et specifikt mønster ved "tilfældig amplificering af polymorft DNA". De overordnede resultater af denne verifikation fremgår af tabel 4.4.



Tabel 4.4. Verifikation af isolater fra Dipel-sprøjtede bladcelleri og forskellige kål til *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1.

	Brunt pigment i agar	Uden brunt pigment og med bipyramidal krystal	PCR analyser for cry1 og flagellin gen (krystal-dannere)	Specifikt RAPD mønster (krystal dannere)
Positive	26 / 920= 2.8%	252/252=100%	45/45=100%	44/45=97.8%

Det fremgår af tabel 4.4., at 2.8% af de undersøgte isolater producerer et brunt pigment, mens ingen af disse isolater producerede den bipyramidale krystal. Det ses også at alle undersøgte isolater, som ikke danner pigment danner krystaller og at den delmængde af disse som er undersøgt ved hjælp af PCR alle er positive for *cry1* og for det specifikke flagellin-gen; af disse havde 97.8% det specifikke RAPD-mønster.

Tabel 4.5. Primer-sekvenser for de i undersøgelserne anvendte primere til karakterisering af *Bacillus cereus*-lignende isolater.

Gen (fænotype)	Primer	Primersekvens (5'-3')*	Position (5'-3')	Produkt størrelse (bp)	Sekvens reference (accession number)	Primer reference
hblD (L1)	L1A	AATCAAGAG	2854-2873	430	Ryan et al. (1997) (U63928)	Hansen og Hendriksen (2001)
	L1B	CTGTACGAA TCACCAATTG AC CATGCTAAT	3283-3264			
nheA	nheA 344	TACGCTAAG	344-360	500	Granum et al. (1999) (Y19005)	Hansen og Hendriksen (2001)
	S	GAGGGGCAG	843-823			
	nheA 843 A	TTTTT ATTGCTTCAT CGGCT				
zmaR	A0678	ATGTGCACTT	191-210	1000	Milner et al. 1996b (U57065)	Raffel et al. (1996)
	A0677	GTATGGGCA GTAAAGCTC GTCCC TCTTCAG	1142-1123			
cytK-1	CK1F	CAATTCCAGG	314-333	426	-	Guinebretiere et al. (2006)
	CK1R	GGCAAGTGT CCCTCGTGC ATCTG TTTCATGAG	740-719			
cytK-2	CK2F	CAATCCCTG	314-333	585	-	Guinebretiere et al. (2006)
	CK2R	GCGCTAGTG CAGTGNAGC CTGGAC GAAGTTGG	899-879			
Non-ribosomal peptid syntetase	EM1F	GACAAGAGA	-**	635	-	Ehling-Schulz et al. (2004)
	EM1R	ATTTCTACGA GCAAGT GCAGCCTTC CAATTACTCC TTCTGCCACA GT				
		GAGGAAATA	-**			
		ATTATGACAG TTCTTY TTGGCCTTCT				
cspA (psyc hrotrofisk signatur)	BcAPF1	GAGGAAATA	-**	284	-	Francis et al. (1998)
	BcAPR1	ATTATGACAG TTCTTY TTGGCCTTCT				

cspF (mesofil og psychroto fisk signatur)	BcFF2 BcAPR1	TCTAA GAGATTTAAA -** TGAGCTGTA ACTTYT TGGCCTTC TTCTAA	160	-	Francis et al. (1998)
16S rDNA (psychroto lerant 16S rDNA signature)	Bc-uf bc-pr	CAAGGCTGA -** AACTCAAAG GA GAGAAGCTC TATCTCTAGA	130	-	Von Stetten et al. (1999)
16S rDNA (mesofil 16S rDNA signature)	Bc-mf bc-ur	ATAACATTTT -** GAACCGCAT GCTTCAT CACTCACGC GGC	250	-	Von Stetten et al. (1999)
16S rDNA (Bacillus cereus- gruppe specifik signature)	S-S-Bc- 200-a-S- 18 S-S- Bc-470-a- A-18 S-* -Univ- 518-b-S- 18S-* - Univ1492 -b-A-19	TCGAAATTGA 200-217 AAGGCGGCG 487-470 GTGCC 518-535 AGCTTATTCA 1510-1492 ACCAGCA GCCGCGGTA ATACGGTTAC CTTGT TACGACTT	288 993	Bavykin et al. (1999, unpublishe d) (AF176322)	Hansen et al. (2001)
16S-23S rDNA ITS	ITS-16S- 1392-S-15 ITS-23S- 206-A-21	GNACACACC -** GCCCGT NCTTAGATG TTTCAGTTCV CY	-	-	Willumsen et al. (2005)

\*N=A/G/C/T; V=A/C/G; K=G/T; W=A/T; S=G/C; M=A/C; R=A/G;  
Y=C/T

\*\* primer bindings position ikke specificeret i referencen

## 5 Resultater

### 5.1 Udvikling af metode til til detektion af *Trichoderma* spp. og *T. harzianum* Su

Specificiteten af en molekylærbiologisk metode til specifik detektion af *Trichoderma* spp. ved PCR-amplificering af DNA, baseret på litteraturen (Hagn et al., 2007) er blevet verificeret. Metoden blev indledningsvist verificeret ved tjek af de specifikke DNA-sekvenser i databaser. Dette viste, at sekvenserne udelukkende matchede *Trichoderma* spp. Desuden er PCR-amplificeringen af såvel 7 *Trichoderma* spp. fordelt på 12 stammer som 9 arter af nærtbeslægtede svampe fordelt på 15 stammer blevet tjekket. Disse tjek gav i alle tilfælde de forventede resultater. Derfor anses denne metode for specifik for detektion af *Trichoderma* spp. Specificiteten af de nyudviklede primere til specifik detektion af *T. harzianum* Su blev testet mod de samme svampe som de generelle *Trichoderma* spp. primere (Tabel 5.1). Udelukkende *T. harzianum* Su resulterede i et PCR produkt, og primerne blev derfor anset som meget specifikke (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Svampeisolater testet for amplifikation med *Trichoderma* spp. specifikke PCR-primere

Svamp	Stamme	Reference	PCR produkt med <i>Trichoderma</i> spp. primere (uTf/uTr)
<i>T. longibrachiatum</i>	DSMZ 768		+
<i>T. virens</i>	DSMZ 1963	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	+
<i>T. hamatum</i>	DSMZ 63055		+
<i>T. harzianum</i>	DSMZ 63059		+
<i>T. koningii</i>	DSMZ 63060		+
<i>T. polysporum</i>	DSMZ 63062		+
<i>T. viride</i>	DSMZ 63065		+
<i>T. harzianum</i>	Supresivit		Supresivit
<i>T. harzianum</i>	TRIO02	TRI 002	+
<i>T. harzianum</i>	TRI 003 batch 0031	TRI 003	-
<i>T. harzianum</i>	TRI 003 batch 0043	TRI 003	-
<i>T. harzianum</i> og <i>polysporum</i>	Binab (ATCC20475 og 20476)	Binap	+
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Rotstop		-
<i>Verticillium lecanii</i>	Mycotal		-
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec	N. Meyling KU-LIFE	-
<i>Beauveria bassiana</i>	Botany Gard 22WP		-
<i>Beauveria bassiana</i>	Botany Gard GHA-5		-
<i>Beauveria bassiana</i>	Botany Gard KVL 07-172		-
<i>Paecilomyces fumascroceus</i>	KVL 04-35		-
<i>Metarhizium anisopliae</i>	KVL 07-83		-
<i>Clonostachys rosea</i>	IBT 7519 GR1		-
<i>Clonostachys rosea</i>	IBT 7839 GR3	M. Lübeck KU-LIFE	-
<i>Fusarium langsethiae</i>	IBT 9955 F26		-
<i>Fusarium langsethiae</i>	IBT 8051 F27		-
<i>Epichloe typhina</i>	E8		-
<i>Neonectria galligena</i>	418		-
<i>Neonectria galligena</i>	420		-

## 5.2 Eksponering af Luftvejene

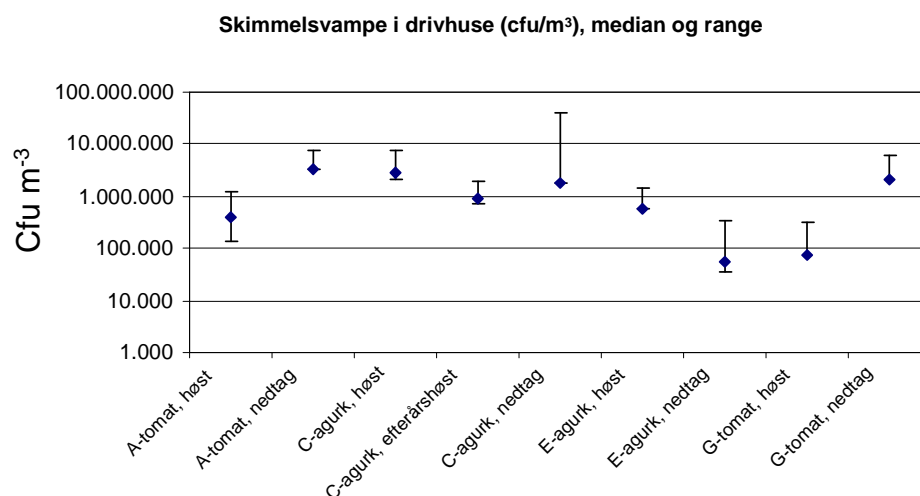
Generelt blev de laveste koncentrationer af mikroorganismer fundet i udendørsreferencerne og de næsthøjeste koncentrationer i stationære målinger. De højeste koncentrationer af mikroorganismer blev målt med personbårne samplere i gartneriarbejdernes indåndingszone. I det følgende afsnit præsenteres en opgørelse af data indsamlet vha. samplere båret af ansatte i gartnerierne. Optællingen af levedygtige mikroorganismer i luften er opgjort som medianværdier, da data ikke er normalfordelte. Desuden er resultaterne opgjort som intervaller for at illustrere maksimum og minimum niveauer af mikroorganismer. Hvert gartneri er blevet tildelt en identifikationskode bestående af bogstaverne A til I.

### 5.2.1 Eksponering for skimmelsvampe, bakterier og aktinomycceter

Skimmelsvampe er den gruppe af mikroorganismer, som forekom i de højeste koncentrationer i gartnerierne (Figur 5.1, 5.2 og 5.3). Skimmelsvampe blev fundet i alle prøver og kunne i væksthuse nå op over koncentrationer på 1 million spore  $m^{-3}$  luft. Enkelte prøver nåede op over 10 millioner spore  $m^{-3}$  luft. Der ses en tendens til at skimmelsvampe forekommer i højere koncentrationer i agurkegartnerier end i tomatgartnerier i forbindelse med høst. Under nedtagning af gamle planter blev der i tomatgartnerier målt koncentrationer af skimmelsvamp, der var log 1 – log 1,5 højere end under høst, og som oversteg de høje værdier målt i agurkegartnerierne under agurkehøst. Fremgangsmåden til at nedtage gamle planter varierede imellem grønsagsproducenterne, hvilket havde en effekt på eksponeringen i hvert enkelt væksthuse. I agurkegartnerierne blev planternes stængel og støttesnore skåret over inden planterne blev placeret manuelt på en vogn og kørt ud. Nedtagningen af planter i agurkegartneri C foregik under kraftig udluftning, hvor alle planter i væksthuse blev taget ned. I agurkegartneri E blev kun en mindre del af dagen brugt på at nedtage planter, og kun en sektion i væksthuse blev taget ned. Der blev ikke åbnet døre eller vinduer for at lufte ud under nedtagningen. I tomatgartneri blev plantestængler og støttesnore ligeledes skåret over. Metalbøjler, der havde været brugt til at holde plantestænglerne blev herefter fjernet, og de lange plantestængler (omkring 13 m) blev samlet. En ”kørende juletræsmaskine” lagde et net om stængelbundterne, hvorefter bundterne kunne ruller på en stor spole på en traktor. Traktoren transportererede de store ruller af plantestængler ud. Arbejdet med at passe planter og plukke grønsager under høst var mere ensartet gartnerierne imellem, og gør disse data mere sammenlignelige (Figur 5.2).

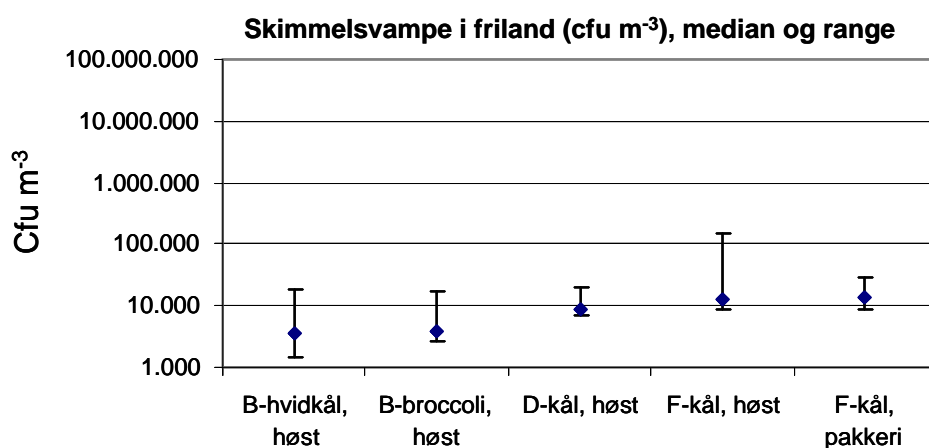
De laveste værdier blev målt i frilandsgartnerierne under høst, samt under pakning af broccoli (indendørs i pakkehal) (Figur 5.2). Værdierne ligger omkring 10.000 cfu  $m^{-3}$  luft, hvilket minimum er en log 2 under eksponeringerne i væksthusegartnerierne. Målingerne i frilandsgartneri B og D blev foretaget på dage, hvor det ikke regnede, men hvor luftfugtigheden var høj (> 90% relativ luftfugtighed). I frilandsgartneri F blev målingerne i marken foretaget på en dag, hvor der i perioder var fygning af støv fra markerne. Disse målinger viser da også en lidt højere koncentration af skimmelsvampe i luften. Medianværdien for udendørsreferencerne ligger på ca.  $1 \times 10^3$  cfu  $m^{-3}$  (interval 389- $8.9 \times 10^3$ ) som er under eller omkring det samme niveau som gartneriarbejderne eksponeres for under arbejde på friland.

Alle svampe blev ikke identificeret, men blandt de identificerede slægter var *Penicillium* og *Aspergillus* arter dominerende.



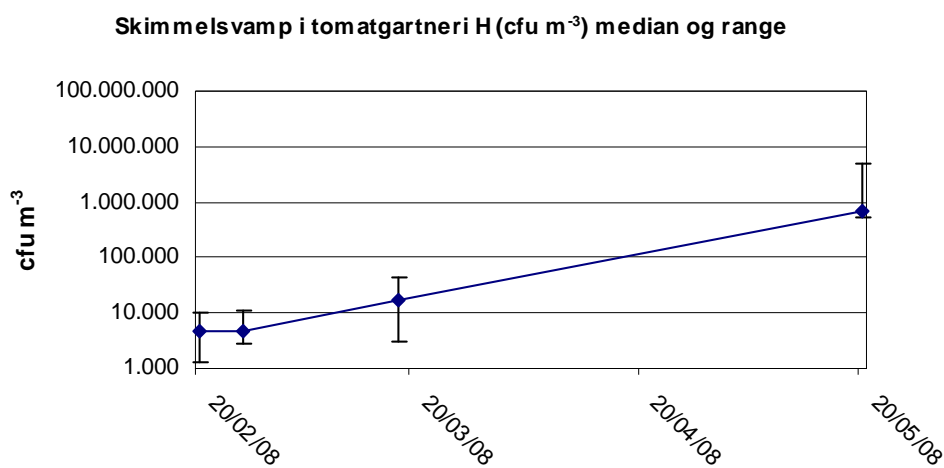
Figur 5.1. Medianværdier og interval for eksponering (personbåren) for luftbårne skimmelsvampe målt i væksthusegartnerierne på forskellige måledage.

I 2008 fik vi mulighed for at tage prøver fire gange i et økologisk tomatgartneri (H) fra februar til maj. Dette gav mulighed for at følge udviklingen i eksponeringen fra planterne var små (ca. 150 cm) til de var fuldvoksne (flere meter høje). Som det fremgår af figur 5.3, så blev prøver taget den 20. februar og en uge, tre uger og tre måneder efter den første målegang. Det ses at koncentrationen af skimmelsvampe tidligt i året er omkring  $5 \times 10^3$  cfu m<sup>-3</sup> hvilket er på niveau med koncentrationen af luftbårne skimmelsvampe på friland. Hen over foråret øges koncentrationen af skimmelsvampe m<sup>-3</sup>, og ved målingen i maj er koncentrationen af svampesporer nået op på omkring  $10^6$  sporer m<sup>-3</sup>, hvilket ligner hvad vi fandt i 2007 for andre væksthuse under høst.



Figur 5.2. Medianværdier og interval for eksponering (personbåren) for luftbårne skimmelsvampe målt i frilandsgartnerier på forskellige måledage.

**A. fumigatus** er en termotolerant skimmelsvamp, der klarer sig godt i miljøer, hvor temperaturen er forhøjet pga. mikrobiologisk omsætning af organisk materiale. I denne undersøgelse blev **A. fumigatus** kun fundet i koncentrationer på op til 384 cfu m<sup>-3</sup> og aldrig i alle prøver fra et gartneri (Tabel 5.2). På friland blev **A. fumigatus** ikke observeret og ej heller i tomatgartneri G. For gartneri H blev **A. fumigatus** ikke fundet i februar, men blev til gengæld fundet i maj under høst. I gartneri C, som havde de højeste koncentrationer af svampen, blev **A. fumigatus** isoleret både ved høst og ved nedtagning. Men ved efterårshøst-besøget i gartneri C, blev svampen ikke observeret. I gartneri A og gartneri E blev **A. fumigatus** ligeledes kun isoleret ved høst og nedtagning. Under pakningen af broccoli i frilandsgartneri F blev 2/3 af arbejderne eksponeret for **A. fumigatus** i koncentrationer op til 130 cfu m<sup>-3</sup>. I uendørsreferencerne blev der ikke detekteret **A. fumigatus**.



Figur 5.3. Medianværdier og interval for eksponering (personbåren) for luftbårne skimmelsvampe målt i et tomatgartneri (H) på forskellige måledage.

Tabel 5.2. Eksponering (personbåren) for *A. fumigatus* (medianværdi og interval) i de gartnerier hvor svampen blev detekteret.

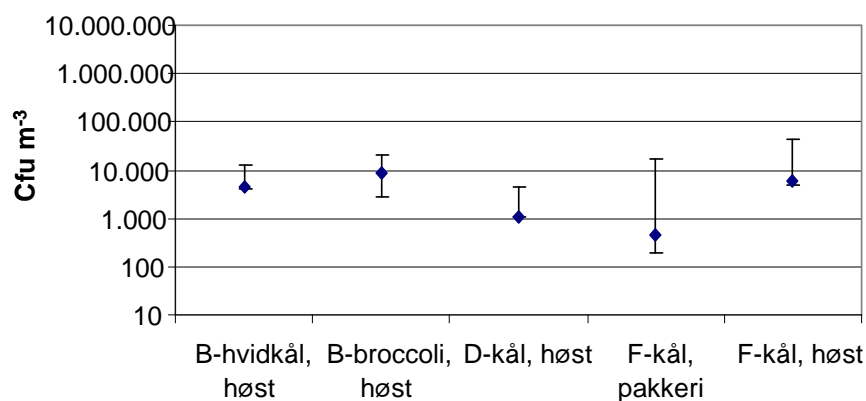
Gartneri	n	% positive prøver	Median (cfu m <sup>-3</sup> )	Interval (cfu m <sup>-3</sup> )
A, væksthuse, tomat, høst	6	17	ud	ud-61
C, væksthuse, agurk, høst	10	50	36	ud-384
C, væksthuse, agurk, nedtagning	8	13	ud	ud-247
E, væksthuse, agurk, nedtagning	6	17	ud	ud-67
F, indendørs, broccoli, pakning	3	66	100	ud-130
H, væksthuse, tomater, høst	9	22	ud	ud-92

ud=under detektionsgrænsen.

Undersøgelsen af bakteriekoncentrationer i grønsagsgartnerier viser at bakterier forekommer i høje koncentrationer i luften og at de i nogle tilfælde når op mod en værdi på 10<sup>6</sup> cfu m<sup>-3</sup> luft. I væksthusegartnerierne A, C, G og H kan forekomsten af luftbårne bakterier være underestimeret, da svampevækst (cyclohexamid-resistente *Penicillium*-stammer) på de bakterie-selektive agarplader formodes at have kunnet hæmme væksten af bakterier.

Bakterietællingerne må derfor ses som minimumsværdier. I gartneri E, på friland (Figur 5.4), samt i pakkeri var der ikke problemer med svampevækst på bakteriepladerne, ligesom vi heller ikke tidligere har observeret vækst af cyclohexamid-resistente svampe ved eksponeringsmålinger af bakterier i andre arbejdsmiljøer.

**Bakterier friland (cfu m<sup>-3</sup>), median og range**



Figur 5.4. Medianværdier og interval for eksponering (personbåren) for luftbårne bakterier målt på friland på forskellige måledage.

Mesofile aktinomyccer blev detekteret i de undersøgte gartnerier, væksthussåvel som frilands, men blev ikke observeret i alle prøver. Målingerne foretaget i agurkegartneri E viste værdier af mesofile aktinomyccer på op til  $2,6 \times 10^5$  cfu m<sup>-3</sup> luft med en medianværdi på  $3,8 \times 10^4$  cfu m<sup>-3</sup> under høst og en værdi på op til  $2,8 \times 10^4$  med en medianværdi på 43 cfu m<sup>-3</sup> ved målingen foretaget på dagen for nedtagning af planter. Personer, der arbejdede på friland blev udsat for lavere koncentrationer af mesofile aktinomyccer (medianværdier på 75-828 cfu m<sup>-3</sup>) end i væksthussgartneri E. I frilandsgartneri F, hvor det var tørt og blæsende under målingerne, og i pakkeriet på gartneri F, kunne de målte koncentrationer af mesofile aktinomyccer i nogle prøver nærme sig de laveste koncentrationer målt i agurkegartneriet under høst. Sammenlignet hermed var koncentrationen af mesofile aktinomyccer på frilandsgartnerier, hvor målingen var foretaget på dage med høj relativ luftfugtighed, lave (maksimalt 319 cfu m<sup>-3</sup>). I udendørsreferencen var medianværdien for mesofile aktinomyccer under detektionsgrænsen cfu m<sup>-3</sup> og den maksimale koncentration var 146 cfu m<sup>-3</sup>.

Biokontrol produktet Mycostop, der indeholder aktinomyccen *Streptomyces griseoviridis*, blev vandet ud i tomatgartner H. Det var dog ikke muligt at detektere luftbårne kolonidannende enheder af den i luften i gartneriet.

Tabel 5.3. Niveauer for eksponering (personbåren) for luftbårne mesofile aktinomyccer (medianværdi og interval) i de gartnerier hvor mikroorganismen blev detekteret.

Gartneri	n	% positive prøver	Median (cfu m <sup>-3</sup> )	Interval (cfu m <sup>-3</sup> )
B, friland, broccoli, hvidkål, høst	5	100	161	77 - 292
D, friland, hvidkål, høst	4	50	75	ud - 319

E, væksthuse, agurk, høst	7	100	$3,9 \times 10^4$	$5,4 - 2,5 \times 10^5$
E, væksthuse, agurk, nedtagning	6	50	43	ud - $2,9 \times 10^4$
F, indendørs, broccoli, pakning	3	66	273	ud - 1.417
F, friland, broccoli, selleri, høst	8	100	828	291 - 5.659
B, Friland, hvidkål, høst	4	75	1.228	ud - 2484

Ud=under detektionsgrænsen

I frilandsgartneri D og i pakkeriet (gartneri F) blev der ikke observeret termofile aktinomyketer. Koncentrationen af termofile aktinomyketer målt i gartnerierne var generelt lav og kom ikke over  $1.000 \text{ cfu m}^{-3}$  luft. Målingerne foretaget i agurkegartneri E viste værdier af termofile aktinomyketer på op til  $69 \text{ cfu m}^{-3}$  luft med en medianværdi under detektionsgrænsen under høst og en værdi på op til  $87 \text{ cfu m}^{-3}$  luft med en medianværdi under detektionsgrænsen ved målingen foretaget på dagen for nedtagning af planter. Folk der arbejdede på friland blev udsat for lavere koncentrationer af termofile aktinomyketer (medianværdier på ud-46  $\text{cfu m}^{-3}$ ) end i væksthusegartneriet. I udendørsreferencen var medianværdien for aktinomyketer under detektionsgrænsen og den maksimale koncentration var  $191 \text{ cfu m}^{-3}$ .

Tabel 5.4. Niveauer for eksponering (personbåren) for luftbårne termofile aktinomyketer (medianværdi og interval) i de gartnerier hvor disse blev detekteret.

	n	% positive prøver	Median ( $\text{cfu m}^{-3}$ )	Interval ( $\text{cfu m}^{-3}$ )
B, friland, broccoli/hvidkål, høst	5	80	146	0-696
E, væksthuse, agurk, høst	7	14	ud	0-69
E, væksthuse, agurk, nedtagning	6	33	ud	0-87
F, friland, broccoli/selleri, høst	8	50	49	0-440
B, Friland, hvidkål, høst	4	25	ud	0-226

Ud=under detektionsgrænsen

### 5.2.2 Eksponering for *Bacillus* spp.

Insektbekæmpelsesmidlet Dipel blev rapporteret anvendt i tre af de besøgte gartnerier, frilandsgartnerierne B og F og tomatgartneri G, hvor planterne blev pletbehandlet på måledagen under høst. Midlets aktive mikroorganisme *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 kunne isoleres fra luften i hvert af disse gartnerier under høst, men også på dagen for nedtagning i tomatgartneriet (Tabel 5.5). I høstperioden blev 33–89 % af målepå personerne eksponeret for detekterbare niveauer af HD1. I tomatgartneriet blev 89 % af målepå personerne eksponeret for HD1 på dagen for udbringning af Dipel, hvorimod kun 28 % blev eksponeret under nedtagningen af planter 5 måneder senere. De højeste eksponeringsniveauer blev målt i væksthuse på dagen for udlægning ( $5,2 \times 10^3 \text{ cfu m}^{-3}$ ) og på dagen for nedtagning ( $1.419 \text{ cfu m}^{-3}$ ). På friland, hvor Dipel havde været anvendt blev der observeret lave koncentrationer af HD1 sammenlignet med i væksthusegartneriet. I gartnerier, hvor *Bacillus*-baserede produkter ikke var udbragt, blev HD1 ikke detekteret.

Andre *Bacillus* sp. stammer end HD1 kunne isoleres fra luftprøver i to af de undersøgte tomatvæksthuse. I væksthuse G blev en arbejder eksponeret for  $2,0 \times 10^2 \text{ cfu m}^{-3}$  ved nedtagning af planter, og i væksthuse H blev en koncentration på  $1,7 \times 10^2 \text{ cfu m}^{-3}$  målt i en stationær prøve. I



jordbærgartneriet hvor Dipel var brugt i den foregående dyrkningssæson blev *Bacillus* sp. også målt i en stationær prøve (Tabel 5.5). PCR analyse viste, at alle disse *Bacillus* sp. isolater tilhørte *cereus*-gruppen. *Bacillus* sp. blev ikke observeret i udendørsreferencemål.

I jordbærgartneriet hvor Dipel var brugt i den foregående dyrkningssæson blev *Bacillus* fra *cereus* gruppen fundet (Tabel 5.15).

Tabel 5.5. Niveauer for eksponering (personbåren) for luftbårne *Bacillus* spp. (medianværdi og interval) i de gartnerier hvor bakterien blev detekteret.

Gartneri	n	% positive prøver	Median (cfu m <sup>-3</sup> )	Interval (cfu m <sup>-3</sup> )
B, Friland, broccoli/hvidkål, høst	4	75	87	bd-407
F, Friland, selleri, høst	3	33	Bd	bd-160
G, væksthushus, tomat, høst	8	100	474	79-5272
G, væksthushus, tomat, nedtagning	7	28	Bd	bd-1419

Ud=under detektionsgrænsen

### 5.2.3 Eksponering for *Beauveria* spp. og *Lecanicillium* spp.

Det blev rapporteret fra de undersøgte gartnerier at insektbekæmpelsesmidler baseret på svampene *Beauveria* spp. og *Lecanicillium* spp. ikke blev benyttet. På trods af dette, blev *Beauveria* spp. isoleret fra luftprøver i to væksthushusgartnerier, der begge producerede agurker (Tabel 5.6). For begge gartnerier blev de højeste koncentrationer observeret under høst (henholdsvis 80 cfu m<sup>-3</sup> og 94 cfu m<sup>-3</sup>) sammenlignet med målinger under nedtagning af planter (henholdsvis 34 cfu m<sup>-3</sup> og 44 cfu m<sup>-3</sup>). Kolonier af *Lecanicillium* spp. blev ikke observeret ved pladespredning af materiale fra gartnerierne. Hverken *Beauveria* spp. eller *Lecanicillium* spp. blev detekteret i udendørsreferenceprøver.

Tabel 5.6. Niveauer for eksponering (personbåren) for luftbårne *Beauveria* spp. (medianværdi og interval) i de gartnerier hvor svampen blev detekteret.

Gartneri	n	% positive prøver	Median (cfu m <sup>-3</sup> )	Interval (cfu m <sup>-3</sup> )
C, Væksthushus, agurk, høst	10	10	Ud	0-80
E, Væksthushus, agurk, høst	7	43	Ud	0-34
C, Væksthushus, agurk, nedtagning	4	50	20	0-44
E, Væksthushus, agurk, nedtagning	7	29	Ud	0-96

Ud=under detektionsgrænsen

### 5.2.4 Eksponering for *Trichoderma* spp.

I de undersøgte gartnerier kunne *Trichoderma* spp. isoleres fra luftprøver (Tabel 5.7). *T. harzianum* Su fra biokontrol produktet Supresivit blev dog kun isoleret fra tomatgartneri H, hvor Supresivit var blevet udvandet.

Naturligt forekommende *Trichoderma* spp. blev detekteret med personbårne samplere fra kål og broccoli mark (D, F), et agurkevæksthushus (C), og et grønsagspakkeri (F). Når *Trichoderma* spp. blev detekteret, var eksponeringsniveauet forholdsvis højt.

Tabel 5.7. Eksponering (personbåren) for naturlig forekommende luftbårne *Trichoderma* spp. (medianværdi og interval) i de gartnerier hvor svampen blev detekteret.

Gartneri	n	% positive prøver	Median (cfu m <sup>-3</sup> )	Interval (cfu m <sup>-3</sup> )
C, væksthuse, agurk, nedtagning	4	25	Ud	ud - 7,7×10 <sup>4</sup>
D, mark, kål, høst	4	75	1,2×10 <sup>4</sup>	ud - 1,7×10 <sup>4</sup>
F, pakkeri, broccoli, pakning	3	33	1,3×10 <sup>3</sup>	ud - 4,3×10 <sup>3</sup>
F, broccoli, høst	8	12,5	7,1×10 <sup>2</sup>	-

Ud=under detektionsgrænsen

I tomatgartneri H blev *Supresivit* udvandet i februar måned. Det kunne måles, at personen, som blandede produktet med vand inden udvandingen var eksponeret til en høj koncentration af svampen *T. harzianum* Su (Table 5.8). Ligeledes blev luftbårne sporer isoleret fra en stationær sampler, som stod i området (3,7×10<sup>3</sup> cfu m<sup>-3</sup>). Inden udvanding kunne *Trichoderma* spp., ikke detekteres i væksthuset. Luftprøvemålinger blev foretaget 1 uge, 3 uger og 3 måneder efter udvanding, men her blev ingen *Trichoderma* spp. isoleret.

Tabel 5.8. Eksponering (personbåren) for luftbårne *T. harzianum* Su (medianværdi og interval) målt med personbårne samplere i gartneri H.

Gartneri	n	% positive prøver	Median (cfu m <sup>-3</sup> )	Interval (cfu m <sup>-3</sup> )
H, væksthuse, tomat, blanding af <i>Supresivit</i>	1	100	1,0×10 <sup>5</sup>	-
H, væksthuse, tomat, Pasning af planter efter udvanding af <i>Supresivit</i>		50	19	ud - 2,9×10 <sup>2</sup>

Ud=under detektionsgrænsen

Direkte detektion af *Trichoderma* spp. ved PCR amplifikation af ekstraheret DNA var kun muligt i ganske få (5 prøver) efter yderligere DNA oprensning og nested PCR. Det var i ingen tilfælde muligt at detektere *T. harzianum* Su direkte i luftprøver. De positive målinger af *Trichoderma* svampe er således i alle tilfælde baseret på den kolonidannende fraktion, hvor kolonier blev bestemt til hhv. *Trichoderma* spp. og *T. harzianum* Su ved PCR amplifikation.

### 5.2.5 Eksponering for (1-3)--D-glucan

Eksponering for β-glucan er præsenteret i tabel 5.9. Den højeste eksponering blev målt under rydning af tomat og agurkeplanter efter høst. De personer der var mindst eksponerede, var dem, der arbejdede på friland eller med pasning af unge tomatplanter.

Tabel 5.9. Eksponering (personbåren) for inhalerbar (1-3)--D-glucan (ng m<sup>-3</sup>) igennem fire hovedaktiviteter i agurk, tomat og kål gartnerier.

		Eksponering for inhalerbar (1-3)--D-glucan igennem 4 hovedaktiviteter							
		Sommer høst		Sensommer høst		Rydning efter høst		Pasning	
Gartneri	Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval N	Median (gns)	Interval N	Median (gns)	Interval n	
									Agurk
	E	301 <sup>bc</sup> (290)*	[49-508] 4		-	-	-		
	A	82 <sup>cd</sup> (99)	[25-189] 4		-	690 <sup>ab</sup> (536)	[178-2155] 8		
Tomat	G	70 <sup>cd</sup> (92)	[44-215] 6		-	683 <sup>a</sup> (741)	[589-951] 4		
	H				-	-	-	13 <sup>d</sup> (33) [6-74] 15	
	B		-	54 <sup>d</sup> (45)	[19-61] 4		-	-	
	D			57 <sup>d</sup> (71)	[29-139] 4			-	
Kål	F		-	83 <sup>cd</sup> (117)	[20-493] 11		-		

Mediane eksponeringsværdier efterfulgt af det same bogstav er ikke statistiske forskellige på 95 % niveau. \*Arbejder også med potning af julestjerner.

Det mediane udendørs referencemål var 14 ng m<sup>-3</sup>.

## 5.2.6 Eksposering for støv og partikler

I Danmark har vi en arbejdsmiljøgrænseværdi for organisk støv. Grænseværdien for total organisk støv er  $3 \text{ mg m}^{-3}$  (se også tabel 3.3).

Tabel 5.10. Eksposering (personbåren) for inhalerbart støv ( $\text{mg m}^{-3}$ ) igennem fire hovedaktiviteter i agurk, tomat og kålgartnerier.

Gartneri	Eksposering for inhalerbart støv								
	Sommer høst		Sensommer høst		Rydning efter høst		Pasning		
	Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval n	
Agurk	C	2.9 <sup>a</sup> (4.2)	[1.6-12] 10	1.8 <sup>ab</sup> (1.7)*	[0.82-2.2] 7	7.4 <sup>a</sup> (6.4)	[0.31-15] 11		
	E	1.8 <sup>a</sup> (1.8)*	[0.86-2.7] 7			1.7 <sup>a</sup> (2.1) <sup>x</sup>	[0.56-4.2] 7		
Tomat	A	0.43 <sup>c</sup> (0.50)	[0.3-0.9] 6			1.3 <sup>b</sup> (1.2)	[0.4-1.8] 9		
	G	0.49 <sup>c</sup> (0.52)	[0.2-0.9] 8			3.3 <sup>a</sup> (4.8)	[1.8-8.7] 11		
	H							0.18 <sup>d</sup> (0.09)	[0.13-0.90] 20
Kål	B			0.16 <sup>d</sup> (0.19)	[0.05-0.31] 5				
	D			0.21 <sup>d</sup> (0.20)	[0.09-0.30] 4				
	F			0.18 <sup>d</sup> (0.20)	[0.09-0.32] 11				

Mediane eksponeringsværdier efterfulgt af det samme bogstav er ikke statistiske forskellige på 95 % niveau. \*Arbejder også med potning af julestjerner.

Eksposering for inhalerbart støv er målt på 135 personer og den mediane eksponering var  $0,8 \text{ mg m}^{-3}$  og gennemsnitseksposeringen var  $2,1 \text{ mg m}^{-3}$ . Et antal på 24 personer blev eksponeret for mere end  $3 \text{ mg m}^{-3}$  inhalerbart støv. I tabel 5.10 er støveksposering vist, og det ses, at eksponeringen er meget forskellig i de forskellige gartnerier. De højeste eksponeringer blev målt i agurkegartnerier, og vi har derfor vist eksponeringsniveauerne for individuel eksponering i de to agurkegartnerier i figur 5.5. Som det fremgår af figuren er der stor forskel i hvor meget støv, hver enkelt person eksponeres for, selv om hovedaktiviteten for de fleste var høst af agurker.

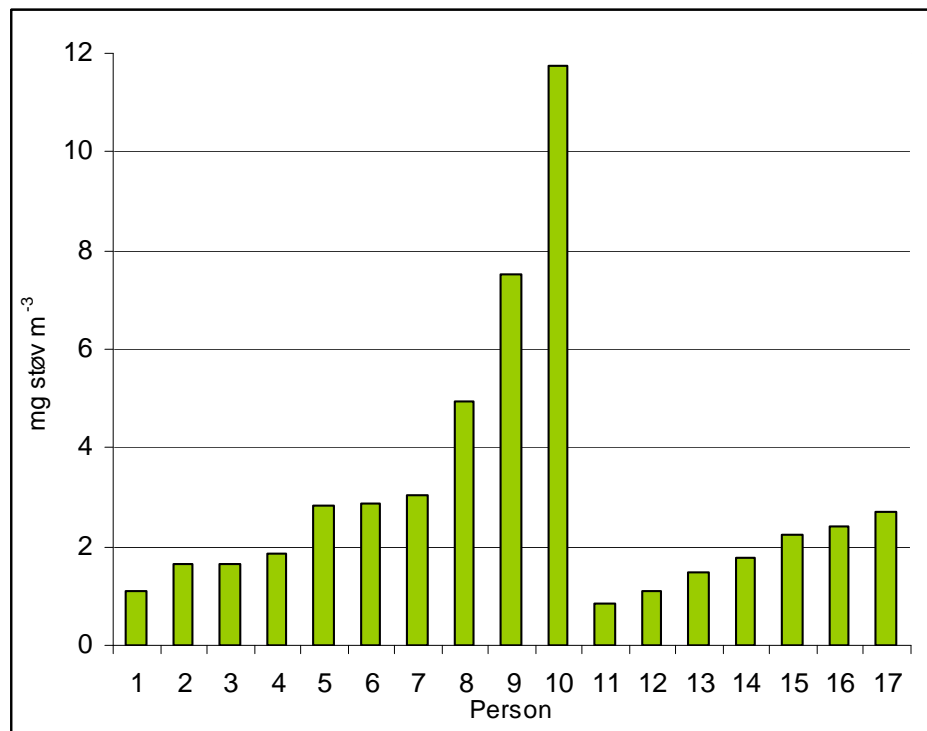


Fig. 5.5. Eksempler på individuel eksponering for inhalerbart støv i to agurkegartnerier. Person 1-10 arbejdede i gartneri C (den 13.6 2007) og person 11-17 i gartneri E (den 26.6. 2007). Person 1 binder snore op. Person 2-6 og 8 arbejder kun med plukning. Person 7, 9, 10 og 13 arbejder med plukning + beskæring. Person 11, 14 og 15 plukker + pakker agurker. Person 16 beskærer og person 17 beskærer og pakker. Person 12 pakker og vander.

I gartneri H, som er et økologisk tomatgartneri blev der også arbejdet med pasning af tomatplanter, hvorfra der endnu ikke blev høstet – og for disse personer var eksponeringen ikke høj (Tabel 5.10).

Høje eksponeringer blev fundet for både personer, der arbejder med agurkehøst og afrydning af planter efter høstsæsonen. Stationære målinger viste lave støvkoncentrationer og udendørsreferencemålene var ofte under detektionsgrænsen (eksempler i Tabel 5.11). Ingen stationære målinger var over arbejdstilsynets grænseværdi for støveksposering. En stationær måling, foretaget ved en pottemaskine, var under detektionsgrænsen, men det skyldes ikke, at der ikke var støv, men at en del af støvet ikke var på filtret men på indersiden af sampleren. Dette har vi også tidligere set ved sampling i et område i et gartneri hvor spagnum blev håndteret.

Tabel 5.11. Eksponering for 'total støv' (median (gns) og interval) målt med stationære samplere i agurke og tomatgartnerier udtrykt som mg m<sup>-3</sup>.

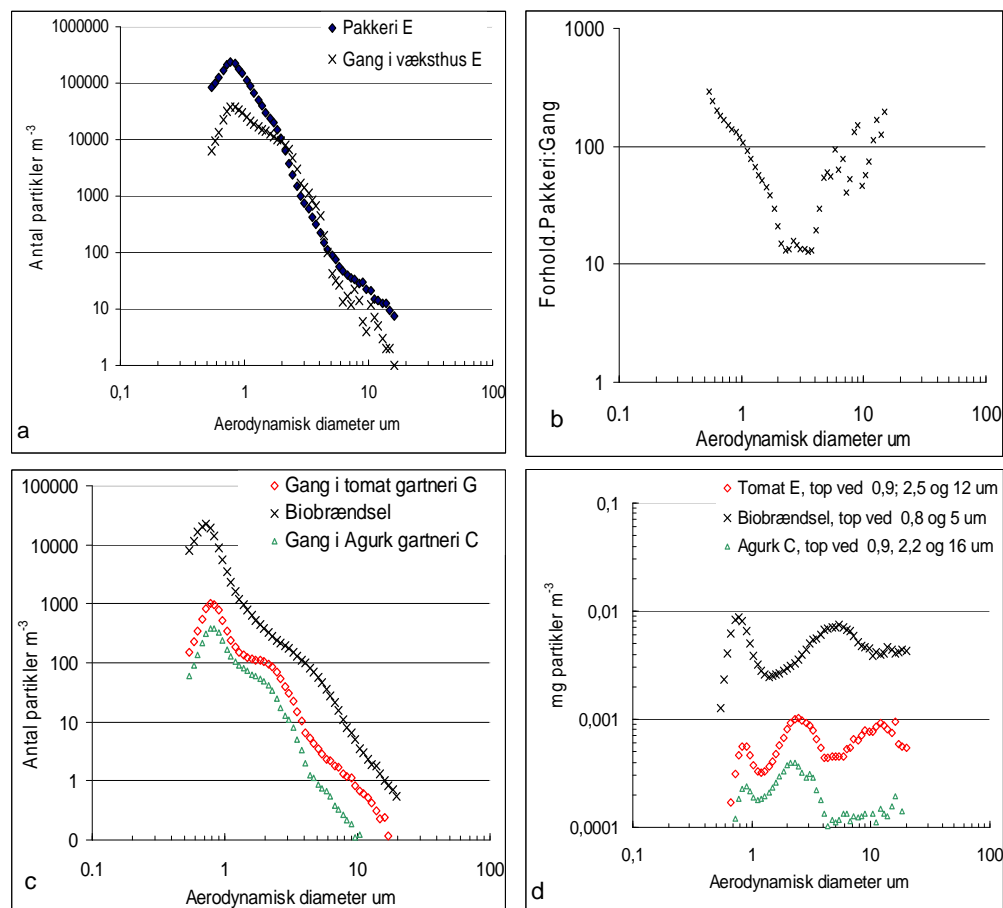
Gartneri	Stationær sampling, 'total støv'				
	Sommer høst	Sensommer høst	Rydning af planter efter høst	Pakke afdeling	Udendørs referencemåling
C	ud [ud-0,036]	ud [ud-0,039]	0,12 (0,12) [0,087-0,15]	0,047 (0,047)	ud [ud-0,036]
E	0,066 (0,066) [ud-0,12]		0,054 (0,054)	0,27 (0,27)	Ud [ud-0,038]
A	ud [ud-0,030]		0,29 (0,29) [0,10-0,50]		0,042 (0,050) [0,042-0,067]
G	0,057 (0,056) [ud-0,083]		0,045 (0,076) [0,04-0,17]		ud [bd-0,034]

Ud=under detektions grænsen

Med en stationær partikelmåler (APS) har vi målt koncentrationen af partikler i luften som funktion af partiklernes aerodynamiske diameter.

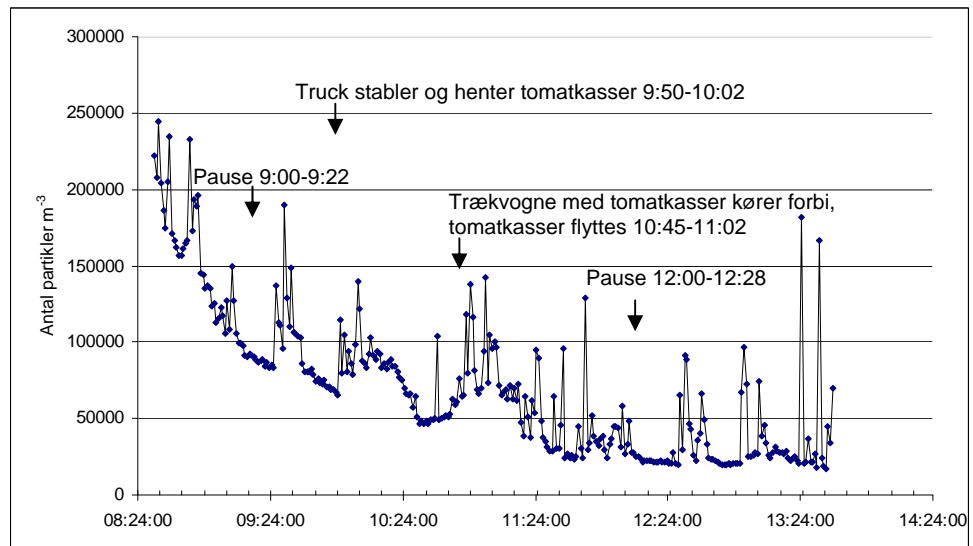
Koncentrationen af partikler (0,6-20µm) var lavere i en gang i et agurkevæksthus under høst end i agurkepakkeriet i samme gartneri (Figur 5.6a). Partikler under 1 µm og partikler over 12 µm var der således mindst 100 gange flere af i pakkeriet end i væksthuset (Figur 5.6b). Partikler mellem 2,5 og 3,8 µm var der kun omkring 12 gange flere af i pakkeriet end i væksthuset.

Af figur 5.6c fremgår det, at eksponering for partikler antalsmæssigt som funktion af aerodynamisk diameter følger ca. samme mønster i en gang i et tomatvæksthus som i et agurkevæksthus under høst. Dvs. der er maksimum antal partikler omkring 0,8-0,9 µm og omkring 1,8 til 3,5 µm. Mht. masse af partikler er der også i begge miljøer et stort bidrag fra partikler omkring 1,8 til 3,5 µm. Dog er der i tomatvæksthuset en stigning af partikler omkring 16 µm.



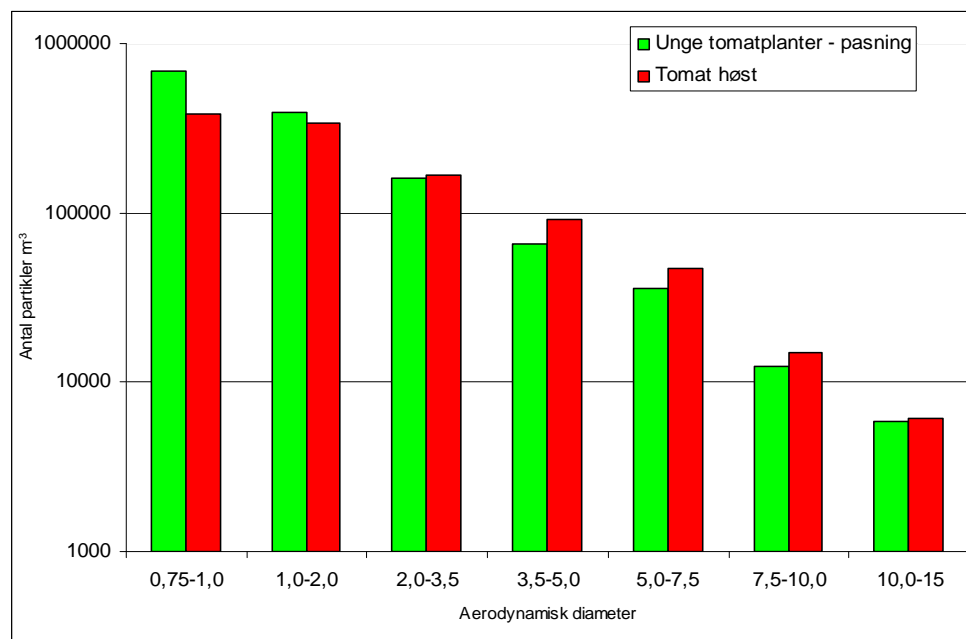
Figur 5.6. Antal partikler i pakkeri og gang i et væksthuse i gartneri E (a). Forholdet mellem partikler i pakkeri og gang i gartneri E (b). Antal partikler i gang i et væksthuse i gartneri C og G og i halmodtagelse på et biobrændsel anlæg (c). Masse (mg) af partikler i gang i et væksthuse i gartneri C og G og i halmodtagelse på et biobrændsel anlæg (d) alle som funktion af partiklernes aerodynamiske diameter.

I eksemplet i Figur 5.7 ses det, at partikelkoncentrationen stiger, når der er aktiviteter og falder i pauser. De ansattes aktivitet, f.eks. med stabling og transport af tomatkasser under tomat høst har således en væsentlig betydning for koncentrationen af luftbårne partikler i gangarealer.



Figur 5.7. Koncentration af partikler (0,8-5,0 m) i gangareal i et tomatvæksthus (G). Koncentrationen af støv stiger, når tomatkasser stables og køres af sted på vogne. Tomathøsten gik i gang kl. 6:30 om morgenen og sluttede ca. 13:30. Målt med GRIMM partikelmåler.

I figur 5.6 vises eksempler på partikelkoncentrationer i gangareal i tomatgartnerier under pasning af unge planter og under høst. Under høst stiger antallet af partikler større end 1  $\mu\text{m}$  relativt til partikler under 1  $\mu\text{m}$ .



Figur 5.8. Luftbårne partikler i tomatgartneri under pasning af unge planter og under høst af tomater som funktion af partiklernes aerodynamiske diameter. Målt med GRIMM partikelmåler.

Et eksempel på partikelstørrelsesfordeling under pasning af tomatplanter og under høst af tomatplanter er vist i figur 5.8. Under høst stiger antallet af partikler større end 2  $\mu\text{m}$ ; en del af disse partikler er sikkert bakterier associeret med hinanden eller med andre partikler og svampesporer.



## 5.2.7 Eksposering for endotoksin

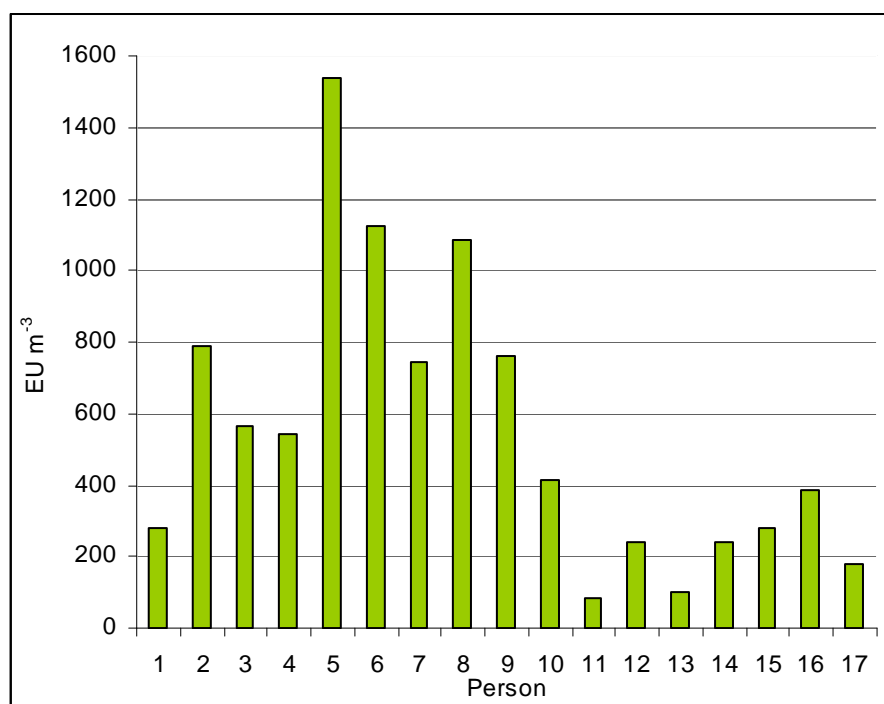
Alle eksponeringer for endotoksin var over detektionsgrænsen. Den mediane eksponering var 90 EU m<sup>-3</sup> og den gennemsnitlige eksponering var 522 EU m<sup>-3</sup>. En andel på 41 % var eksponeret for mindst 150 EU m<sup>-3</sup>. Der blev fundet høje eksponeringer i forbindelse med alle gartnerityper. I kålgartneri B blev de ansatte eksponeret for mellem 1,4 og 309 EU m<sup>-3</sup> (Tabel 5.12).

Tabel 5.12. Eksposering (median, (middel), interval og antal personer) for inhalerbar endotoksin (EU m<sup>-3</sup>) igennem fire hovedaktiviteter i agurke, tomat og kålgartnerier.

Gartneri		Eksposering for inhalerbar endotoksin igennem fire hovedaktiviteter							
		Sommer høst		Sensommer høst		Rydning efter høst		Pasning	
		Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval n	Median (gns)	Interval n
Agurk	C	751 <sup>a</sup> (785)	[280-1540] n=10	765 <sup>ab</sup> (843)	[233-1650] n=7	1128 <sup>a</sup> (1439)	[115-3339] n=11		
	E	241 <sup>b</sup> (216) <sup>*)</sup>	[83-386] n=7			413 <sup>ab</sup> (719) <sup>]</sup>	[120-3416] n=7		
Tomat	A	113 <sup>c</sup> (114)	[59-219] n=6	-	-	143 <sup>b</sup> (20)	[75-519] n=9		
	G	26 <sup>cd</sup> (28)	[7,7-55] n=8	-	-	1191 <sup>a</sup> (1398)	[476-4022] n=11		
	H			-	-	-	-	5,3 <sup>d</sup> (19)	[0,9-174] n=20
Kål	B		-	20 <sup>d</sup> (50)	[5,7-162] n=5	-	-	-	
	D		-	24 <sup>d</sup> (90)	[1,4-309] n=4	-	-	-	
	F		-	38 <sup>d</sup> (35)	[6,9-84] n=11	-	-		

Mediane eksponeringsværdier efterfulgt af det samme bogstav er ikke statistisk forskellige på 95 % niveau. \* Der blev også arbejdet med potning af julestjerner.

Som for støv blev de højeste eksponeringer målt i agurkegartnerier, og vi har derfor vist eksponeringsniveauerne for individuel eksponering i de to agurkegartnerier i figur 5.9. Som det fremgår af figuren er der stor forskel i hvor meget endotoksin hver enkelt person eksponeres for, selv om hovedaktiviteten for de fleste var høst af agurker. Ud fra dette studie kan det ikke konkluderes hvad forskellen i eksponering i de to gartnerier skyldes.



Figur 5.9. Eksempler på individuel eksponering for inhalerbart endotoksin i to agurkegartnerier. Person 1-10 arbejdede i gartneri C (den 13.6 2007) og person 11-17 i gartneri E (den 26.6. 2007). Person 1 binder snore op. Person 2-6 og 8 arbejder med plukning. Person 7, 9, 10 og 13 arbejder med plukning + beskæring. Person 11, 14 og 15 plukker og pakker agurker. Person 16 beskærer og person 17 beskærer og pakker. Person 12 pakker og vander.

Tabel 5.13. Koncentrationer af total endotoksin (median (gns) og interval) målt med stationære samplere i agurkegartnerier udtrykt som EU m<sup>-3</sup>.

Gartneri	Stationære samplinger					
	Gang Sommer høst	Gang Efterårs høst	Gang Afrydning	Pakkeri	Pottemaskine	Reference
	EU m <sup>-3</sup>	EU m <sup>-3</sup>	EU m <sup>-3</sup>	EU m <sup>-3</sup>	EU m <sup>-3</sup>	EU m <sup>-3</sup>
C	22 (39) [19-79]	23 (25) [19-30]	210 209 [202-212]	91		2,5 (2,9) [0,5-5,8]
E	10 (10) [5,8-15]		19	81	121*	3,3 (3,9) [4,1-5,9]

\*Støvet fra denne sampler opførte sig anderledes, sandsynligvis fordi det bl.a. bestod af spagnum, og en del af støvet var ikke på filtret men på væggene i sampleren og derfor kan endotoksin eksponeringen være højere end målt.

I tabel 5.13 præsenteres endotoksin eksponeringer målt i forskellige arbejds- og gennemgangsområder i to agurkegartnerier. Eksponeringerne for endotoksin i disse områder var højere end udendørs referencemål, men eksponeringerne kan kun betragtes som høje ved afrydning af planter i gartneri C og ved pottemaskine. Lokalt omkring personerne, der arbejder i gartnerierne, er der en meget højere eksponering for endotoksin end f.eks. i gangene. I pakkeriet ser det ud som om endotoksin, som sandsynligvis frigives ved håndtering af agurker, spredes i rummet, idet der er målt højere koncentrationer på pakkeriet end i gangene i væksthuset under afrydning (Tabel 5.13). Under høst var endotoksin koncentrationen også lavere i gangen i

væksthuset end i pakkeriet (68 EU m<sup>-3</sup> versus 5,8 EU m<sup>-3</sup>). På en dag med høst i agurkegartneri C var eksponeringen for endotoksin højere end på en dag med høst i agurkegartneri E (Tabel 5.9).

### 5.2.8 Kilde til endotoksineksponering

Da vi fandt høje endotoksineksponeringer i agurkegartnerierne har vi undersøgt om agurkebladene (fra gartneri C) kan være kilder til endotoksineksponering. Til sammenligning har vi medtaget data fra et andet projekt, hvor vi har undersøgt mængde af endotoksin på blade af ca. 1-2 år gamle pottedplanter (*Sansevieria trifasciata*, *Ficus benjamin*, *Kalanchoë blossfeldiana*, *Euphorbia pulcherrima*, *Grassula aborescens*) og halm. Fra Tabel 5.14 fremgår det, at endotoksin koncentrationen er væsentlig højere på agurkeblade end på blade af pottedplanter.

Tabel 5.14 Endotoksin per mg plantemateriale og per overfladeareal af agurkeplanter og andet plantemateriale.

		Endotoksin EU mg <sup>-1</sup>			Endotoksin EU m <sup>-2</sup> overflade	
		n	Median	Interval	Median	Interval
Agurkeblade	Gamle	2	695 <sup>a</sup>	29-109	9596 <sup>a</sup>	6798-12383
	Unge	2	62 <sup>a</sup>	59-69	7695 <sup>a</sup>	6395-8975
Halm	Byg	4	18 <sup>b</sup>	9-38	2882 <sup>b</sup>	3152-6465
Pottedplanter	Blade	10	0,143 <sup>c</sup>	0,12-0,17	453 <sup>c</sup>	301-4009

Median værdier efterfulgt af det same bogstav er ikke statistisk forskellige.

De fire agurkeblad-prøver er statistisk behandlet som fire gentagelser.

### 5.2.9 Eksponering i en jordbærmark

Eksponering i en jordbærmark behandles samlet, idet der kun er lavet stationære målinger i jordbærmarken. I juni, juli og august 2008 blev der taget luftprøver på en økologisk drevet jordbærmark på Sjælland. Ved analyse af disse blev der kvantificeret (1-3)--D-glucan (β-glucan), endotoksin, cfu m<sup>-3</sup> svampe, og den totale mængde pollen, svampesporer og -hyfer (Tabel 5.15).

Koncentrationen af dyrkbare *Cladosporium* sp. varierede betydeligt ( $p \leq 0,05$ ) mellem prøvetagningsdage bortset fra den anden og tredje dag (Tabel 5.15). For det totale antal svampesporer var der ingen signifikant forskel mellem prøvetagningsdage. Det totale antal pollen for dag 1 var signifikant højere ( $p \leq 0,05$ ) end de tre andre dage. En signifikant forskel i β-glucan koncentration ( $p \leq 0,05$ ) mellem dag 3 med en høj eksponering og dag 4 med lav eksponering blev fundet (Tabel 5.15). Vi fandt en signifikant højere eksponering for endotoksin på den tredje dag end på den første dag.

Indholdet af β-glucan havde en medianværdi på 44 ng mg<sup>-3</sup>.

Endotoksinniveauet lå mellem 3 og 25 EU m<sup>-3</sup> (median=4,5 EU m<sup>-3</sup>).

Medianværdien for dyrkbare svampe var 6.672 cfu m<sup>-3</sup>. Ved totaltælling fandt vi en medianværdi på 1x10<sup>5</sup> svampesporer m<sup>-3</sup>. En stor andel af svampesporerne var *Cladosporium* sp. (median=64.616 sporer m<sup>-3</sup>). For hyefragmenterne var medianværdien 3x10<sup>4</sup> hyfer m<sup>-3</sup>. Den mediane totale mængde pollen var 3.500 pollen m<sup>-3</sup>.

Endelig havde der både været og blev der på tidspunktet gjort brug af biologisk bekæmpelse med *T. harzianum*, *T. polysporum* og *Bacillus thuringiensis* baserede produkter i marken, men vi kunne ikke genfinde nogen af dem.

Det kan konkluderes, at jordbærplukkere i denne jordbærmark blev eksponeret for højere niveauer af svampesporer, *Cladosporium* sp. sporer, hyfefragmenter, pollen og -glucan, end man ofte ser i udendørsluft. Ydermere så vi, at tidligere og igangværende behandlinger med biologisk bekæmpelse ikke gav eksponering for disse.

Tabel 5.15. Koncentrationer af luftbårne bioaerosolkomponenter i en jordbærmark (gartneri G) målt igennem fire arbejdsdage.

	Enhed m <sup>-3</sup>	Sampling dag 1 Juni 18 <sup>th</sup>		Sampling dag 2 Juni 23 <sup>rd</sup>		Sampling dag 3 Juli 3 <sup>rd</sup>		Sampling dag 4 August 6 <sup>th</sup>	
		Median (gns) n	Interval (S*)	Median (gns) n	Interval (S*)	Median (gns) n	Interval (S*)	Median (gns) n	Interval (S*)
Totaltællinger, Pollen	Antal	1,6x10 <sup>4</sup> (1,7x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[1,3x10 <sup>4</sup> -2,3x10 <sup>4</sup> ] (1,12)	2,0x10 <sup>3</sup> (5,3x10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> 3	[bd-1,2x10 <sup>4</sup> ] (2,81)	5,1x10 <sup>3</sup> (5,5x10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> 3	[bd-9,5x10 <sup>3</sup> ] (2,18)	2,0x10 <sup>3</sup> (3,5x10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> 5	[bd-7,9x10 <sup>3</sup> ] (1,83)
Totaltællinger Svampesporer	Antal	1,0x10 <sup>5</sup> (1,2x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup> 3	[1,0x10 <sup>5</sup> -1,7x10 <sup>5</sup> ] (1,34)	9,0x10 <sup>4</sup> (8,3x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[6,1x10 <sup>4</sup> -9,7x10 <sup>4</sup> ] (1,28)	8,2x10 <sup>4</sup> (9,8x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[8,1x10 <sup>4</sup> -1,3x10 <sup>5</sup> ] (1,32)	1,0x10 <sup>5</sup> (1,1x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup> 5	[6,3x10 <sup>4</sup> -1,5x10 <sup>5</sup> ] (1,42)
Totaltællinger Hyfefragmenter	Antal	Im 0		3,8x10 <sup>4</sup> (4,0x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[2,1x10 <sup>4</sup> -6,0x10 <sup>4</sup> ] (1,69)	3,3x10 <sup>4</sup> (4,4x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[2,6x10 <sup>4</sup> -7,4x10 <sup>4</sup> ] (1,73)	3,1x10 <sup>4</sup> (3,1x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 5	[7,9x10 <sup>3</sup> -5,7x10 <sup>4</sup> ] (2,04)
Totaltællinger <i>Cladosporium</i> sp. sporer	Antal	6,3x10 <sup>4</sup> (6,7x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[4,7x10 <sup>4</sup> -9,2x10 <sup>4</sup> ] (1,38)	4,6x10 <sup>4</sup> (5,0x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[3,0x10 <sup>4</sup> -7,2x10 <sup>4</sup> ] (1,19)	7,7x10 <sup>4</sup> (8,6x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 3	[6,7x10 <sup>4</sup> -1,2x10 <sup>5</sup> ] (1,33)	4,0x10 <sup>4</sup> (5,2x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 5	[3,5x10 <sup>4</sup> -9,8x10 <sup>4</sup> ] (1,51)
Dyrkbare <i>Cladosporium</i> sp.	CFU	5,0x10 <sup>2</sup> (1,4x10 <sup>3</sup> ) <sup>c</sup> 13	[1,1x10 <sup>2</sup> -8,1x10 <sup>3</sup> ] (3,17)	7,5x10 <sup>3</sup> (8,2x10 <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> 12	[5,3x10 <sup>3</sup> -1,2x10 <sup>4</sup> ] (1,20)	8,3x10 <sup>3</sup> (8,8x10 <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> 15	[3,6x10 <sup>3</sup> -2,5x10 <sup>4</sup> ] (1,63)	4,8x10 <sup>3</sup> (6,2x10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> 17	[1,5x10 <sup>3</sup> -1,6x10 <sup>4</sup> ] (1,90)
Total dyrkbare Mesofile svampe	CFU	1,0x10 <sup>3</sup> (1,7x10 <sup>3</sup> ) <sup>c</sup> 13	[2,2x10 <sup>2</sup> -8,2x10 <sup>3</sup> ] (2,57)	7,8x10 <sup>3</sup> (8,3x10 <sup>3</sup> ) <sup>ab</sup> 12	[5,4x10 <sup>3</sup> -1,2x10 <sup>4</sup> ] (1,24)	9,5x10 <sup>3</sup> (1,0x10 <sup>4</sup> ) <sup>a</sup> 15	[3,7x10 <sup>3</sup> -3,0x10 <sup>4</sup> ] (1,69)	5,6x10 <sup>3</sup> (6,4x10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> 17	[1,5x10 <sup>3</sup> -1,6x10 <sup>4</sup> ] (1,90)
-Glucan	ng	43,4 (45,5) <sup>ab</sup> 3	[38,6-54,5] (1,19)	36,6 (39,1) <sup>ab</sup> 3	[36,2-44,5] (1,12)	95,3 (109,3) <sup>a</sup> 3	[62,6-1,7x10 <sup>2</sup> ] (1,62)	28,9 (35,1) <sup>b</sup> 3	[9,3-52,6] (2,22)
Endotoksin	EU	3,0 (3,7) <sup>b</sup> 3	[2,9-5,2] (1,39)	6,8 (12,5) <sup>ab</sup> 3	[2,7-27,8] (3,16)	14,1 (16,3) <sup>a</sup> 3	[9,7-25,2] (1,58)	2,6 (3,0) <sup>b</sup> 3	[2,5-3,7] (1,14)
<i>Bacillus cereus</i> - gruppe	CFU	Ud 13		ud 12		126 (435) 15	[ud-1,9x10 <sup>3</sup> ] (2,95)	ud 17	

Tal i samme række efterfulgt af det same bogstav er ikke signifikant forskellige, p>0.05. im=ikke målt. ud=under detektions grænsen. n= antal prøver.

\*S= standard afvigelse.

## 5.2.10 Eksposering for luftbårne enzymer og mykotoksiner

Luftprøver fra agurkegartneri (C) og andre udvalgte prøver blev analyseret for ti mykotoksiner og mykotoksinderivater (Tabel 5.16). I gartneri C kunne der under agurkehøst, måles personlig eksposering for stachybotrylactam, trichodermol og verrucarol. Næste dag, hvor de gamle planter blev nedtaget i det samme væksthuse, var disse mykotoksiner under detektionsgrænsen. Analyserne blev foretaget med 1,56 mg, 1,77 mg og 0,9 mg støv fra høst dagen og 9,01 mg, 6,48 mg og 8,85 mg støv fra og dagen for nedtagning.

I en luftprøve fra en græsfrøfabrik blev der fundet gliotoksin, sterigmatocystin, meleagrín, roquefortine C og trichodermol. Ved en sammenligning mellem den klassiske ekstraktionsmetode med ASE-protokollen fandt vi et større udbytte ved ASE-ekstraktionsmetoden for de fleste detekterbare mykotoksiner. Efter ekstraktion med ASE-metoden kunne der dog ikke detekteres roquefortine C. Målingerne blev foretaget på henholdsvis 4,7 mg støv og 32 mg støv.

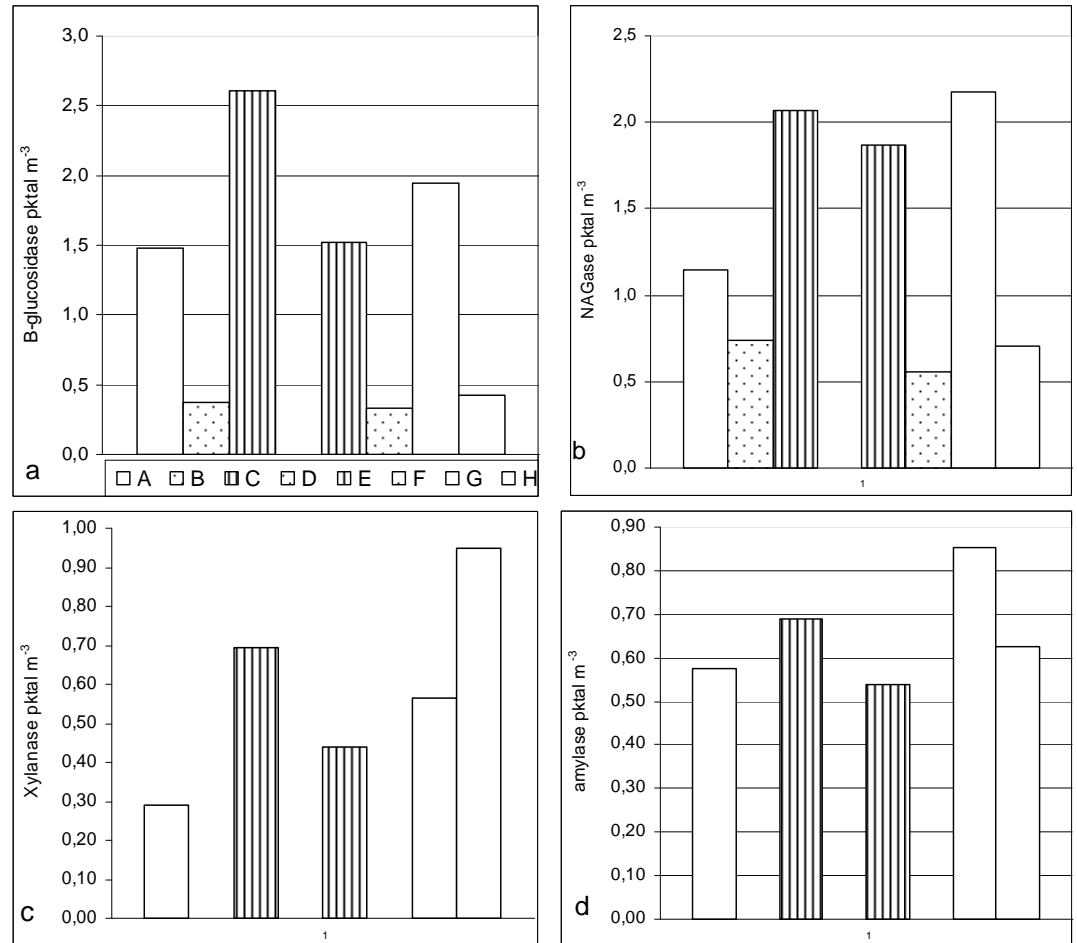
Ved brug af ASE-protokollen for ekstraktion af mykotoksiner fandt vi verrucarol i en luftprøve fra et biobrændselsanlæg, hvilket ikke var påviseligt med den klassiske metode. Målingerne blev foretaget med henholdsvis 6,7 mg støv og 42 mg støv.

Tabel 5.16. Luftbårne mykotoksiner fundet i agurkegartneri C og i andre støvede miljøer. Median [interval] (ng mykotoksin mg<sup>-1</sup> støv)

	Græsfrø-fabrik <sup>a</sup> (n =1c)	Græsfrø-fabrik <sup>b</sup> (n =1c)	Biobrænd-selsanlæg <sup>a</sup> (n =1c)	Biobrænd-selsanlæg <sup>b</sup> (n =1c)	Høst <sup>a</sup> Gartneri C (n =3d)	Nedtagning <sup>a</sup> Gartneri C (n =3d)
Aflatoksin B1	Ud	Ud	Ud	ud	ud	ud
Gliotoksin	2,59	4,9	Ud	ud	ud	ud
Saratoksin G/H <sup>e</sup>	Ud	Ud	Ud	ud	ud	ud
Sterigmatocystin	0,37	1,23	Ud	ud	ud	ud
Meleagrín	0,27	1,70	Ud	ud	ud	ud
Roquefortine <sup>c</sup>	0,51	Ud	Ud	ud	ud	ud
Stachybotrylactam	Ud	Ud	Ud	ud	ud [ud – 3,11]	ud
Citrinin	Ud	Ud	Ud	ud	Ud	ud
Trichodermol	0,01	0,03	Ud	ud	ud [ud – 0,02]	ud
Verrucarol	Ud	Ud	Ud	0.01	ud [ud – 0,02]	ud

<sup>a)</sup> mykotoksiner ekstraheret ved den klassiske metode, <sup>b)</sup> mykotoksiner ekstraheret ved ASE-metoden, <sup>c)</sup> stationær sampler, <sup>d)</sup> personbårne sampler, <sup>e)</sup> kan ikke kvantificeres, men verrucarol er et hydrolyseprodukt af saratoksin G/H, som kan kvantificeres. ud: under detektionsniveau.

Eksposering for  $\beta$ -glucosidase og NAGase var generelt højere i tomat og agurke-gartnerier end i frilandsgartnerier. Kun en andel af personerne var eksponeret for  $\alpha$ -amylase (44 ud af 132 personer) og xylanase (45 ud af 132 personer), i figur 5.10 er kun medtaget eksponerede personer. De fleste af de  $\alpha$ -amylase og xylanase eksponerede personer arbejdede med høst eller afrydning i tomat og agurke-gartnerier.



Figur 5.10. Mediane eksponering for de fire enzymer  $\beta$ -glucosidase, NAGase, Xylanase og  $\alpha$ -amylase [pkatal m<sup>-3</sup>] i gartneri tomat (A, G, H), kål (B, D, F) og agurkegartnerier (C, E). Personbårne målinger.

### 5.2.11 Korrelation mellem forskellige eksponeringsmål

Korrelationer mellem forskellige personbårne eksponeringsmål er udregnet og signifikante korrelationer nævnes i det følgende.

Eksposering for NAGase og for  $\beta$ -glucosidase korrelerede signifikant ( $r=0,71$ ,  $p=0,001$ ). Eksposering for  $\beta$ -glucosidase korrelerede endvidere signifikant med eksposering for dyrkbare svampe ( $r=0,52$ ,  $p=0,02$ ). Eksposering for endotoksin korrelerede signifikant med eksposering for støv ( $r=0,73$ ,  $p=0,001$ ).

### 5.3 Potentiel eksponering fra grønsager

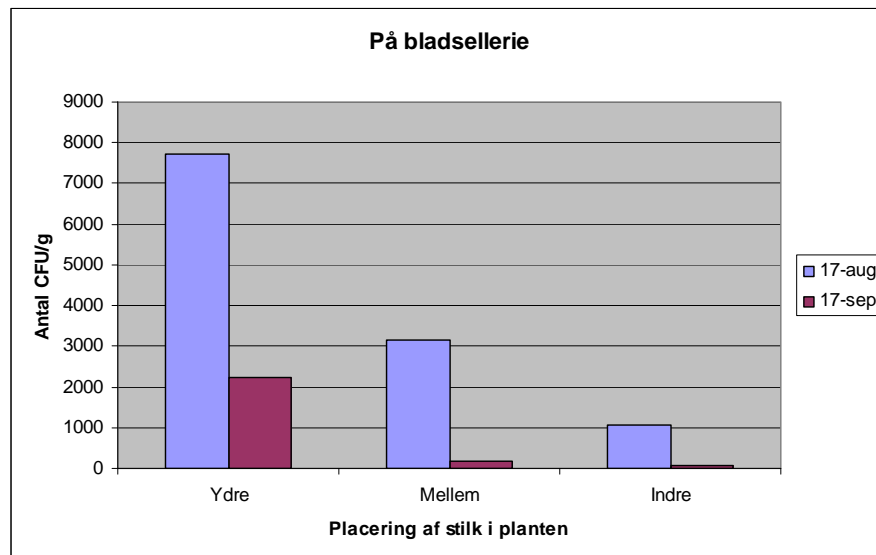
#### 5.3.1 Eksponering for *Bacillus* spp.

Der blev fundet *Bacillus cereus*-lignende bakteriesporer på grønsager fra alle gartnerier (Tabel 5.17). På agurk og på broccoli, hvor der ikke var blevet anvendt Dipel (gartnerierne C, E og F), er koncentrationerne ganske lave og bakterierne blev kun fundet på mellem 20 og 67% af grønsagerne. På bladselleri og broccoli, som er blevet sprøjtet med Dipel (gartnerierne B og F), er koncentrationer derimod høje, på broccolien omkring 20.000 sporer/sporer/g og på bladsellerien 7600 sporer/g i august (ca. 1 måned efter sprøjtningen) og omkring 2000 sporer/g i september (ca. 2 måneder efter sprøjtningen). 40 af 41 isolater fra broccolien er blevet verificeret til at være identiske med *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1, alle 51 isolater fra bladsellerien indsamlet i august var også identiske med *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1, mens det kun var 38 af 59 (64,4%) som var identiske med denne bakterium ved indsamlingen i september. Det betyder, at de *Bacillus cereus*-lignende bakterier isoleret fra broccoli og fra bladselleri i august sandsynligvis primært stammer fra Dipel. På bladselleri indsamlet i september er det kun ca. 2/3 del af bakterierne som stammer fra Dipel. I tomatgartneriet G, hvor der anvendes begrænsede mængder af Dipel, blev der kun fundet en meget lav koncentration af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på tomaterne.

Tabel 5.17. Forekomst af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på grønsager. Af tabellen fremgår gartneri hvor grønsagen er indsamlet, datoen for prøvebehandlingen, den beregnede detektionsgrænse, procentdelen af grønsager hvorpå der blev identificeret *Bacillus cereus*-lignende bakterier, koncentration af *Bacillus cereus*-lignende bakterier/ g ww (beregnet som det geometriske gennemsnit af koncentrationen på de planter hvorpå bakterierne er detekteret).

Bacillus cereus-gruppe lignende bakterier							
Gartneri	Afgrøde	Dato	Detektionsgrænse (cfu/g)	% med <i>Bacillus cereus</i> -lignende bakterier.	Geo. mean	St.dev.	
C	Agurk	14-06 07	0,25	27	0,42	1,77	hele grønsagen
E	Agurk	28-06 07	0,25	33	0,86	3,89	hele grønsagen
G	Tomat	19-06 07	0,55	20	0,72	1,2	hele grønsagen
G	Tomat	14-11 07	0,65	47	1,31	1,96	hele grønsagen
F	Broccoli	16-08 07	2,93	50	5,58	1,73	ift. prøvemængde
B	Broccoli	22-08 07	3,63	100	20277	2,02	ift. prøvemængde
F	Broccoli	18-08 07	3,2	67	4,31	1,62	ift. prøvemængde
F	Bladselleri	17-08 07	3,25	100	7630	2,05	ift. ydre prøvemængde stilk
F	Bladselleri	17-09 07	15	100	2239	1,96	ift. ydre prøvemængde stilk

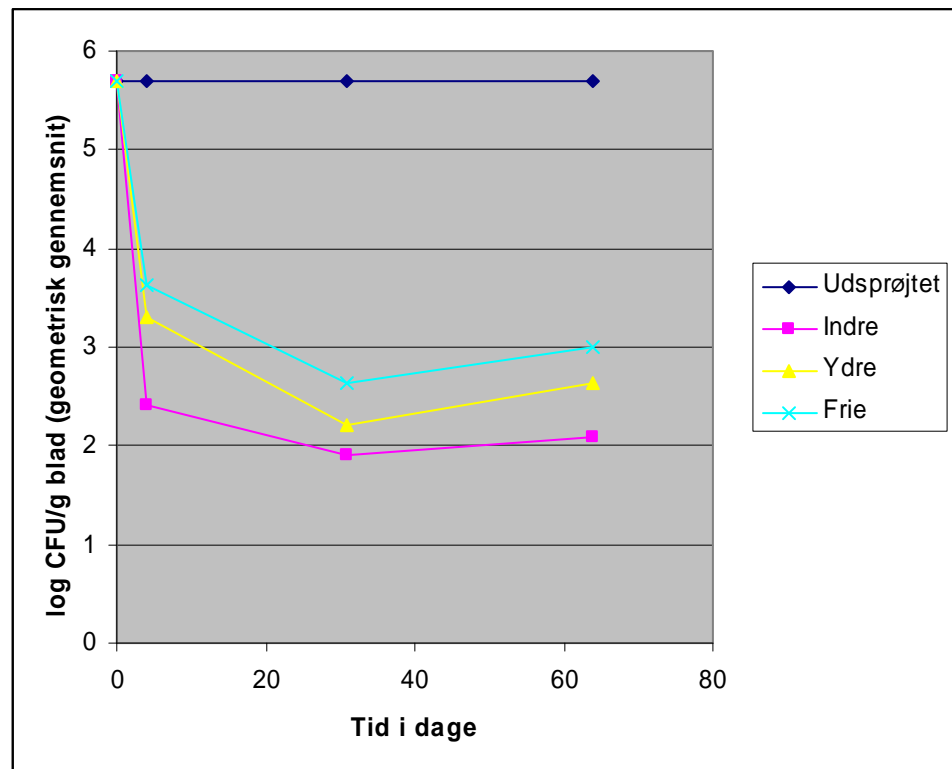




Figur 5.11. Forekomst (geometrisk gennemsnit/g ww) af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på bladsellerie på to indsamlings dage i august og september. Koncentrationen er angivet for stilke fra planternes ydre, indre og der imellem.

Det ses af figuren, at der er flest *Bacillus cereus*-gruppe bakterier på de ydre stilke, og færrest på den indre, som også er de yngste. Disse forskelle er statistisk signifikante. Denne forskel findes på begge prøvetagnings dage, som der er en måned imellem, men er mest udtalt ved den anden prøveindsamling i september. Ved den anden prøveindsamling er forskellen kun statistisk signifikant mellem de ydre stilke og de to andre stilke. På de ydre stilke er antallet ved den anden prøveindsamling blevet reduceret med ca. trefjerdedele i forhold til den første indsamling, mens reduktionen på de mellemste og de indre stilke er omkring en faktor 15.

Skæbnen af *Bacillus thuringiensis* HD1 på hvidkål er blevet undersøgt i 2008. En mark (ca. 5 ha) er blevet sprøjtet med Dipel fire gange i løbet af august og september for at beskytte mod angreb af kål-sommerfugle. Antallet af *Bacillus thuringiensis*-lignende bakterier er blevet opgjort på et ydreblad, på et blad fra kålhovedets overflade og et blad inde i hovedet. Resultater fremgår af figur 5.12. Den udsprøjtede mængde er beregnet på basis af koncentrationen af bakterien i sprøjtevæsken, antal sprøjtninger, en beregning af bladarealet (bestemt for 10 planter) pr. ha og dette bladareals vægt.



Figur 5.12. Forekomst af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på hvidkålssblade efter marken er blevet sprøjtet med Dipel. (Frie blade: et blad som er frit i forhold til hvidkålshovedet; Ydre blade: Blad fra hvidkålshovedet overflade; Indre blad: Det femte blad talt fra hvidkålshovedets overflade. Det udsprøjtede antal er beregnet.

Det ses af figuren, at koncentrationen af bakterier på de ydre og frie blade meget hurtigt falder og derefter forbliver relativt konstant (Fig. 5.12). Der er et statistisk signifikant fald fra den første til den anden indsamling, men ikke mellem den anden og tredje for de frie og ydre blade. Det udsprøjtede antal er baseret på en beregning og kan derfor ikke direkte sammenlignes med de øvrige værdier vha statistik. Det kan også ses at bakterier kan findes på blade inden i kålhovedet og at de her findes i et relativt konstant antal (ingen statistisk signifikant forskel). I alt 701 isolater blev isoleret fra hvidkålssbladene, kun 4 (0.6%) af disse isolater kunne ikke henføres til *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1, alle fire isoleret fra den samme kålplante ved den første indsamling. Det betyder, at stort set alle bakterierne med stor sandsynlighed stammer fra Dipel.

I sammenhæng med den første indsamling på hvidkålsmarken blev der også indsamlet fem rødkålplanter, som ikke var sprøjtet med Dipel, på et markestykke beliggende ca. 15-35 m syd for og parallelt med hvidkålen. På de ydre blade fra disse fem rødkålplanter blev der talt 273 *Bacillus cereus*-lignende cfu/g (geometrisk gennemsnit) med en total variation mellem 31 og 3999 cfu/g. Alle 26 isolater fra rødkål kunne henføres til *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1. Det må sandsynligvis betyde, at der sker en spredning af Dipel til en nærliggende afgrøde under udspreningen, denne spredning giver udtryk i en meget uensartet fordeling af bakterier på planterne. På samme måde blev der i forbindelse med den tredje indsamling indsamlet ti blomkålplanter fra et markestykke placeret ca. 110-120 meter syd for og parallelt med hvidkålen; blomkålen var heller ikke sprøjtet med Dipel. På disse blomkål (på selve blomkålshovedet) blev der talt 21,5 *Bacillus cereus*-lignende

CFU/g (geometrisk gennemsnit) med en total variation mellem 16 og 34 cfu/g. 15 af de i alt 16 isolater herfra kan henføres til *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1. Det betyder, at der sandsynligvis også spredes Dipel i en ret lav koncentration til blomkålsplanterne, som er placeret mere end 100 meter fra hvidkålen.

I alt 75 isolater isoleret i 2007 fra grønsager fra gartnerierne C, E, G og F er blevet karakteriseret med hensyn til art. Artsbestemmelsen af isolaterne fremgår af tabel 5.18.

Tabel 5.18. Arts bestemmelse af *Bacillus cereus*-lignende isolater fra grønsager.

Analyse	Formål	Resultat (antal isolater som er positive for analysen)	Konklusion
Multiplex-PCR-analyse med primerne 16S-518-S + 16S-1492-A+16S-Bc-200-S+16S-Bc-470-A	Analysen er en specifik analyse som afgør hvorvidt isolatet tilhører <i>Bacillus cereus</i> -gruppen baseret på genet for 16S rRNA	75 (100%)	Alle isolaterne tilhører <i>Bacillus cereus</i> -gruppen
Mikroskopi efter - endotoksin krystaller	Isolater som producerer krystaller skal henføres til <i>Bacillus thuringiensis</i>	16 (21%)	21% af isolaterne skal henføres til <i>Bacillus thuringiensis</i>
Multiplex PCR-analyse med primerne BcFF2+BcAPF1+BcAPR1	Analysen påviser tilstedeværelsen af genet for et cold-shock-protein, som er specifik for <i>Bacillus weihenstephanensis</i> – en kulde-tolerant art indenfor <i>Bacillus cereus</i> -gruppen	9 (12%)	12% af isolaterne skal henføres til <i>Bacillus weihenstephanensis</i>
Multiplex PCR-analyse med primerne bc-uf+bc-pr+bc-mf+bc-ur	Analysen påviser en 16S rDNA signatur specifik for <i>Bacillus weihenstephanensis</i> .	9 (12%)	Bekræfter at 12% af isolaterne skal henføres til <i>Bacillus weihenstephanensis</i>
Multiplex PCR-analyse med primerne PA6+PA7+MO11+MO12+BA813R1+BA813R2	Analysen analyserer for tilstedeværelse af tre gener (Ba813, pagA og capA) som er specifikke for <i>Bacillus anthracis</i> . Generne er hos <i>Bacillus anthracis</i> placeret på henholdsvis kromosomet (Ba813), og de to plasmider pXO1 (pagA) og pXO2 (capA)	0 (ingen af isolaterne er positive for alle tre gener, men to er positive for Ba813 og pagA).	Ingen af isolaterne skal henføres til <i>Bacillus anthracis</i>

Det fremgår af tabellen, at alle 75 isolater som forventet tilhører *Bacillus cereus*-gruppen. 21% skal henføres til *Bacillus thuringiensis* og 12% til *Bacillus weihenstephanensis*. De resterende isolater (50) skal så henføres til *Bacillus*

**cereus**. Alle 14 af *Bacillus thuringiensis* isolaterne er indsamlet i et gartneri hvor Dipel anvendes, og det er også blevet verificeret, at de producerer bipyramidale krystaller og dermed med stor sandsynlighed stammer fra Dipel. Kun to af *Bacillus weihenstephanensis* isolaterne stammer fra væksthuse. Stammernes enterotoksiske potentiale fremgår af tabel 5.19.

Tabel 5.19. PCR-analyser til bestemmelse af enterotoksisk potentiale af *Bacillus cereus*-lignende isolater fra grønsager.

Analyse	Formål	Resultat	Konklusion
PCR- analyse med primerne EM1F+EM1R	Primerne er rettet mod genet for en synthetase som medvirker til produktion af et emetisk toksin – et cyklisk peptid, der består af 12 aminosyrer	0	Ingen af stammerne producerer det emetiske toksin
PCR-analyse med primerne nheA344S+nheA843A	Primerne er rettet mod genet for nheA, som koder for en af de tre komponenter i det ikke hæmolytiske enterotoksin	75 (100%)	Alle isolaterne har potentiale for at danne det ikke hæmolytiske enterotoksin
PCR-analyse med primerne L2A+L2B	Primerne er rettet mod genet hblD, som koder for en af de tre komponenter i Hæmolysin BI, som er et enterotoksin	20 (27%)	27% af isolaterne har potential for at danne Hemolysin BI
Multiplex PCR-analyse med primerne CK1F+CK1R+CK2F+CK2R	Primerne er rettet mod to varianter af genet cytK. Genet koder for et cytotoxisk enterotoksin. CytK1 er væsentligt mere toksisk end CytK2.	27 (36%) af isolaterne er positive for cytK2. Ingen for cytK1	36% af stammerne har potentiale for at danne cytotoxisk K2.
PCR-analyse med primerne AO677+A0678	Primerne er rettet mod genet zwi, som udtrykker en resistens mod antibiotikaet Zwittermicin A	20 (27%)	20% af stammerne kan udtrykke en antibiotika-resistens rettet mod Zwittermicin A

Det fremgår af tabellen, at ingen af isolaterne kan producere det emetiske toksin, mens alle har potentiale for at producere det ikke hæmolytiske toksin. En egenskab som er meget udbredt blandt *Bacillus cereus* stammer. 27% af isolaterne har potentiale for produktion af Hemolysin BI og det samme antal kan udtrykke en antibiotika resistens rettet mod Zwittermicin A. 6% af stammerne har potentiale for produktion af Cytotoxisk K2, mens ingen har potentiale for produktion af Cytotoxisk K1. Cytotoxisk K1 anses for at være et væsentlig kraftigere virkende toksin end K2.

### 5.3.2 Eksponering for *Beauveria* spp.

Der blev ikke fundet CFU af *Beauveria* fra suspensioner af agurk eller tomat fra gartneri C og G. Kun grønsager indsamlet på friland gav positiv detektion, og af disse stammede alle fra gartneri F (Tabel 5.20). En CFU blev isoleret fra ydre blade af en bladselleri, og der blev isoleret en CFU fra hver af to forskellige broccoli buketter ved vask, mens der ikke blev isoleret nogle CFU fra stomach-behandlet materiale fra samme plante.

Tabel 5.20. Grønsager med CFU af *Beauveria*. For hver grønsag blev udpladet 3 plader.

Grønsag og gartneri	Indsamlingsdato	Antal CFU
Bladselleri, F	17/8 2007	1
Broccoli, F	12/9 2007	1
Broccoli, F	12/9 2007	1

Totalt blev der isoleret 3 isolater af *Beauveria* spp. fra grønsager

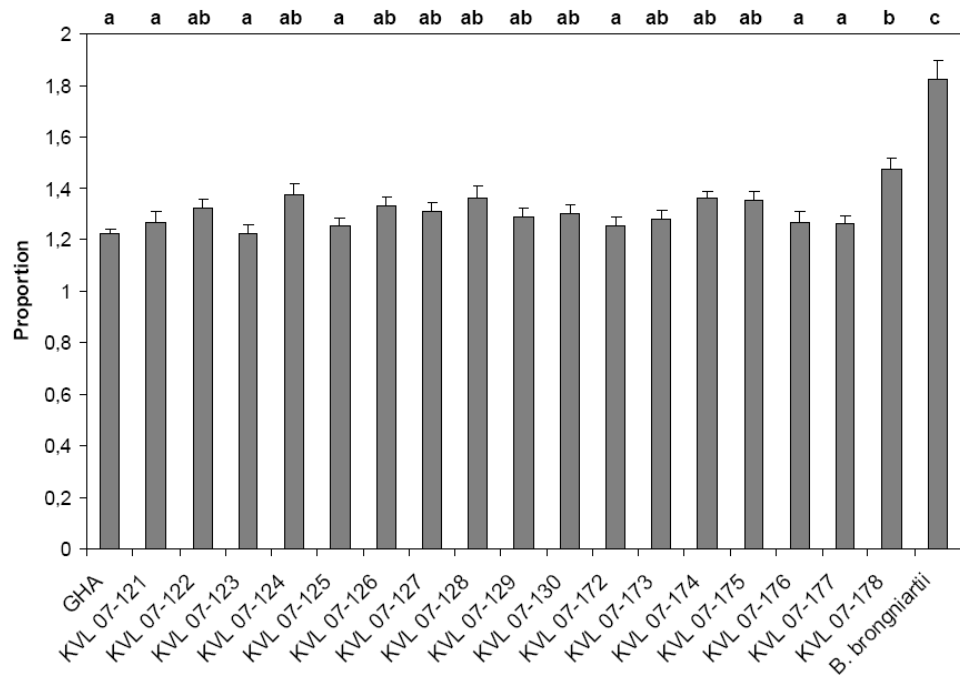
Det kan dermed konkluderes, at der er meget lave niveauer af *Beauveria* spp. på de undersøgte afgrøder. Fra bladselleri fra gartneri F blev forekomsten af *Bacillus cereus*-lignende bakterier undersøgt på stilke fra tre forskellige steder i planten (ydre, indre og der imellem (mellem)).

### 5.3.3 Karakterisering af *Beauveria* spp.

De indsamlede 17 isolater af *Beauveria* spp. blev karakteriseret for at afgøre diversiteten i baggrundseksponeringen af *Beauveria* spp. samt for at sammenligne karakteristika med det kommercielle produkt BotaniGard (GHA), som er baseret på *B. bassiana*. Isolaterne blev morfologisk karakteriseret ved deres konidieproportioner (længde/bredde forhold), som er den traditionelle måde at bestemme arterne i denne svampeslægt. Til sammenligning blev konidier dyrket målt fra det kommercielle produkt BotaniGard (GHA) målt, samt af arten *B. brongniartii*, som er morfologisk anderledes end *B. bassiana*.

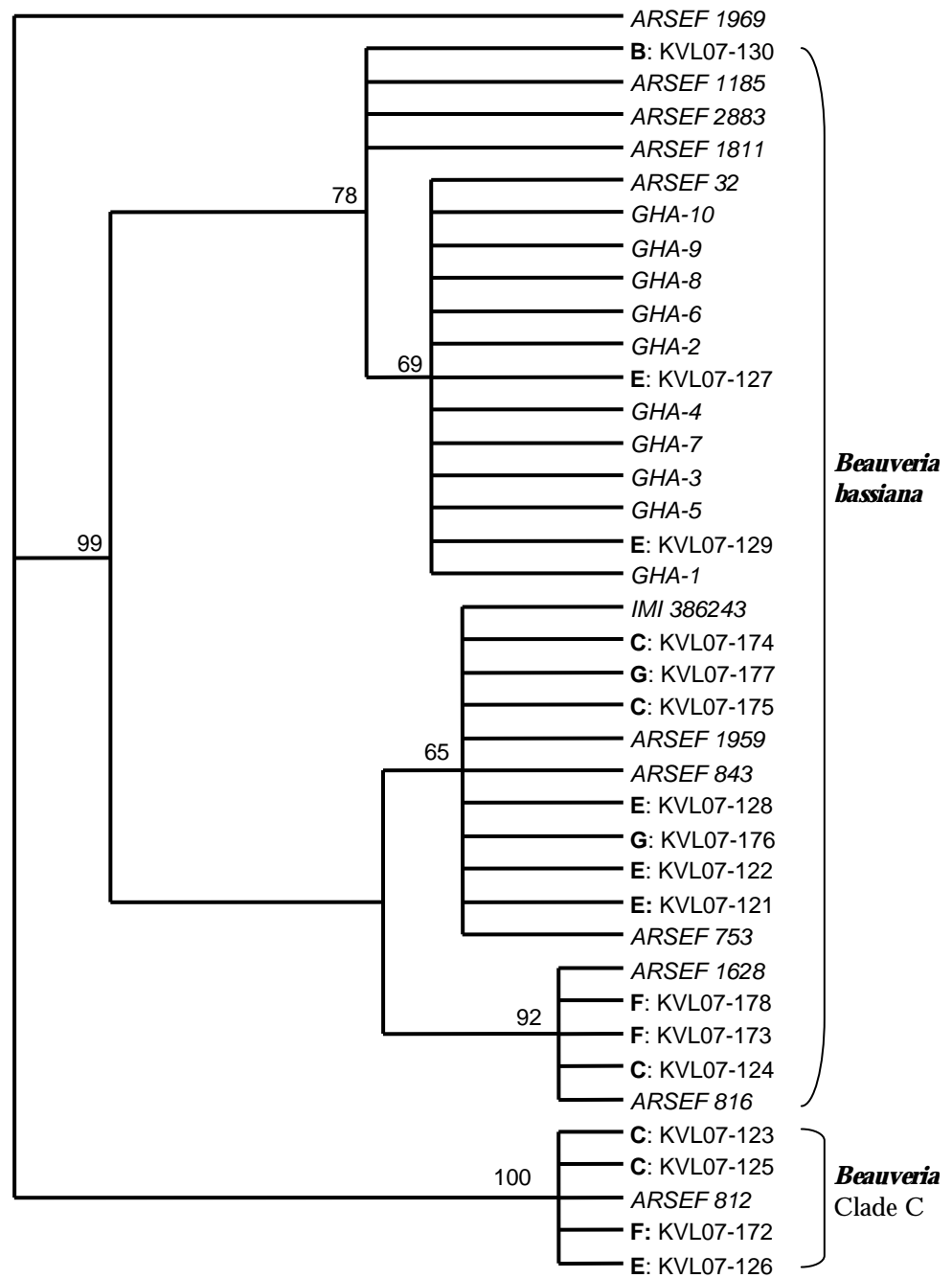
Som det fremgår af figur 5.13 er alle isolater fra gartnerier inden for samme variation undtagen isolatet KVL 07-178 (signifikansgruppe b), som har et større længde/bredde forhold end seks af de øvrige isolater (i signifikansgruppe a). Sporer fra det kommercielle produkt BotaniGard (GHA) faldt også i gruppe a. Konidieproportioner for alle isolater fra gartnerier samt GHA var forskellige fra tilsvarende proportioner af *Beauveria brongniartii* (gruppe c) og de falder alle indenfor den variation, som man finder i litteraturen for *Beauveria bassiana*.

Isolaterne blev desuden karakteriseret ved deres DNA sekvenser i den komplette ITS region (ITS1-5.8S-ITS2). Denne region anvendes typisk som en "stregkode" for svampeidentifikation, så det bliver muligt at sammenligne med kendt materiale. DNA sekvenserne giver også et bedre indblik i den indsamlede diversitet end de morfologiske karakterer baseret på mikroskopi.



Figur 5.13. Gennemsnitlige længde/bredde forhold (+ standard error) for hvert *Beauveria* spp. isolat (KVL-numre). Til sammenligning er længde/bredde forhold givet for hhv. det biologiske bekæmpelsesmiddel BotaniGard (GHA) samt for en repræsentant for *Beauveria brongniartii*. Forskellige bogstaver øverst på figuren angiver signifikante forskelle mellem isolaterne (Ismearns;  $p < 0,05$ ). Hvis der er forskellige bogstaver over to søjler (eks. a over en og c over en anden) er de statistisk forskellige.

I figur 5.14 er afbildet et stamtræ beregnet på baggrund af sekvenser af den komplette ITS region for de 17 indsamlede *Beauveria* isolater fra gartnerierne samt produktet BotaniGard (GHA). Disse sekvenser er desuden sammenholdt med kendte referencesekvenser. Ud fra placeringen i forhold til referencesekvenserne ses det, at materialet fra gartnerier rummer isolater både fra den egentlige monofyletiske gruppe *Beauveria bassiana* samt fra den genetisk afvigende monofyletiske gruppe *Beauveria* Clade C, som er morfologisk identisk med *Beauveria bassiana*, men som indtil videre ikke har fået sit eget taksonomiske navn. Disse isolater kan ikke identificeres vha. den morfologiske karakterisering angivet i figur 5.14. Blandt *Beauveria bassiana* faldt isolaterne fra midlet BotaniGard (isolatet GHA, ti replikerede isolater) sammen med et isolat fra Nordamerika (betegnelserne for de følgende referencegrupper er hentet fra Rehner et al., 2006), og produktet er da også udviklet i USA. Der er dog også repræsentanter for denne gruppe blandt de danske isolater fra gartneriet E, hvor der blev dyrket agurk (KVL 07-127 og KVL 07-129). Der var ikke blevet brugt BotaniGard i det pågældende gartneri. Derudover var der få repræsentanter for to velkendte grupper fra Danmark, hhv. med referenceisolaterne ARSEF 1811, gruppen Eu\_2, som blev isoleret fra frilandsgartneriet B, og ARSEF 1628, gruppen Eu\_1, fra frilandsgartneri F og agurkegartneri C. Det største antal isolater ( $n=7$ ) faldt dog i en gruppe, hvis mest identiske reference-repræsentant er beskrevet fra Sydamerika. Disse isolater kom fra agurke- og tomatgartnerierne C, E og G. Repræsentanter for gruppen *Beauveria* Clade C blev isoleret fra gartnerierne C, E og F. Af de tre isolater fra grønsager viste de to (KVL 07-130 og KVL 07-173) sig at være *Beauveria bassiana*, hhv. Eu\_2 og Eu\_1, mens det sidste isolat, KVL 07-172, tilhørte *Beauveria* Clade C (Fig. 5.14).



Figur 5.14. Stamtræ ('majority rule consensus cladogram') baseret på DNA sekvenser for den komplette ITS region fra alle 17 *Beauveria* isolater fra gartnerier (KVL-nr.) med angivelse af gartneri-kode. Det biologiske bekæmpelsesmiddel BotaniGard (GHA) samt referenssekvenser fra den globale database GenBank (ARSEF og IMI nr.) er inkluderet. Ti replikerede isolater af GHA blev lavet for at tjekke ensartetheden i det kommercielle produkt. Tal ved forgreninger viser bootstrappværdier, som er >60 % (et mål for statistisk støtte for den pågældende gren i stamtræet). ARSEF 1969 (*Beauveria amorpha*) fungerer som udgruppe.



#### 5.3.4 Eksposering for *Trichoderma* spp.

Der er ikke detekteret ***Trichoderma*** svampe i de undersøgte grønsager (som er identiske med grønsager undersøgt for ***Bacillus*** spp). I alt er 155 prøver undersøgt fordelt på tomat og agurk dyrket i væksthuse samt broccoli og bladselleri dyrket på friland.



# 6 Diskussion

## 6.1 Eksponering af Luftvejene

I dette afsnit vil resultater vedrørende eksponering af luftvejene for mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse, baggrundseksponering for arter anvendt i biologisk bekæmpelse og eksponering for andre svampe, bakterier, aktinomyceiter, støv, partikler og endotoksin blive diskuteret og blive relateret til andre studier og til kapitel 2 og 3.

### 6.1.1 Mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse

Kvantificering af gartneriarbejderes eksponering til anvendte biologiske bekæmpelsesmidler er ikke tidligere offentliggjort, selvom det er blevet foreslået at eksponeringsmålinger kan udgøre en del af evalueringen af bekæmpelsesmidlers farlighed (Mensink and Scheepmaker, 2007). Arbejdernes eksponering til *Bacillus thuringiensis* efter udbringningen var i dette studium sammenligneligt med niveauer målt under sprøjtning med et *Bacillus* produkt fra flyvemaskine i Canada (Teschke et al., 2001). En samtidig undersøgelse af helbredssymptomer kunne ikke påvise, at mikroorganismen udgjorde en risiko for borgerne i det sprøjtede område. Ligeledes har der ikke kunnet måles helbredssymptomer i forbindelse med andre sprøjtninger fra fly (Green et al., 1990; Petrie et al., 2003). Det er dog i en undersøgelse blevet vist at gentagen brug af et *Bacillus* produkt i gartnerier kan gøre gartneriarbejdere sensitive overfor mikroorganismen (Doekes et al., 2004). Forsøg med mus viser at gentagen eksponering for et *Bacillus* produkt kan forårsage lunge inflammation i mus (Barfod et al., 2010a) og at *Bacillus* kan spredes i indre organer af eksponerede mus (Barfod et al 2010b).

I jordbærmarken havde der været og/eller blev på tidspunktet gjort brug af biologisk bekæmpelse med *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* og *Bacillus thuringiensis* baserede produkter i marken, men vi genfandt ikke nogen af dem. Eksponering til *T. harzianum* og *S. griseoviridis* kunne ikke detekteres dage efter mikroorganismene var vandet ud i et tomatdrivhus. På dagen med blandingen af *Trichoderma* produktet med vand var eksponeringsniveauet højt, dog ikke højere end et målt 'no-effect-level' for kort tids eksponering (6 minutter) for et *T. harzianum* isolat på  $1,0 \times 10^5$  cfu m<sup>-3</sup> (Meyer et al., 2005). Generelt var gartneriarbejderne eksponering til de undersøgte biologiske bekæmpelsesmidler lav, og koncentrationen af disse organismer i luften var under de grænseværdier, der er blevet foreslået for mikroorganismer af forskellige forskere. Det skal dog understreges at beskyttelsesudstyr under håndtering og udbringning af biologiske bekæmpelsesmidler anbefales.

### 6.1.2 Baggrundseksponering for mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse

I afsnit 3.1.6 er et litteraturstudie om baggrundseksponering for arter og slægter anvendt til biologisk bekæmpelse gennemgået.

Eksposteringsmålinger i dette studium viste, at *Beauveria bassiana* kun sjældent blev fundet og *L. lecanii* ikke blev fundet. I litteraturstudiet blev det også fundet, at *Beauveria bassiana* og *L. lecanii* kun sjældent kan findes i luftprøver (Tabel 3.2). Dette tyder derfor på at mennesker kun sjældent eksponeres for disse svampe via luften. Til gengæld kunne det i litteraturstudiet ses at *Beauveria bassiana* forekom i middelhøje koncentrationer, når den blev fundet (250 cfu m<sup>-3</sup>) (Madsen et al., 2007). I denne undersøgelse blev *Beauveria bassiana* fundet i koncentrationer omkring 90 cfu m<sup>-3</sup> når den blev fundet. Det er bemærkelsesværdigt at de positive fund alle var i agurkegartnerier.

Det er uklart hvorfra de detekterede sporer af *Beauveria bassiana* i indendørsmiljøerne stammer. Sporene hvirvles sandsynligvis op fra overflader hvorpå de er deponeret. Generelt anses jordbunden som værende et reservoir for sporer af *Beauveria bassiana* (Meyling og Eilenberg 2006a), men i agurkegartnerierne blev planterne dyrket i kunstmateriale og ikke i jord. Sporer kan potentielt også stamme fra inficerede insekter, som ligger døde og sporulerende i gartneriet. Mængden af insekter i et gartneri søges holdt på et minimum og *Beauveria bassiana* har ikke været anvendt til biologisk bekæmpelse i de undersøgte gartnerier. Til gengæld anvendes rovlevende og parasitiske insekter rutinemæssigt til biologisk bekæmpelse i grønsagsgartnerier, inklusiv agurk, så potentielt kunne de detekterede sporer stamme fra naturligt inficerede insekter i gartneriet. Det kræver yderligere undersøgelser at belyse dette.

Den morfologiske karakterisering af *Beauveria* sporer, som traditionelt er den anvendte identifikationsmetode, har dog vist sig at være utilstrækkelig til at identificere den variation, som genetiske markører kan afdække (Rehner og Buckley, 2005). Derfor blev der også foretaget en analyse af specifikke DNA sekvenser for alle indsamlede isolater. Grupperingen på baggrund af signifikansgrupper ved sporemåling og ved molekylære metoder stemte da heller ikke overens i den nærværende undersøgelse. Dette er det første studium, hvor *Beauveria* isolater fra luftprøver er blevet karakteriseret molekylært. Molekylær karakterisering af isolaterne giver også mulighed for at identificere isolaterne til genetiske grupper etableret på baggrund af den nyeste viden (Rehner og Buckley 2005). Generelt blev der identificeret stor genetisk diversitet mellem de i alt 14 isolater fra luftprøver. To grupper, hvortil der ikke kunne identificeres referenceisolater fra Europa, blev fundet i agurkegartnerier. Det kan ikke udelukkes, at denne gruppe også findes i det fri i Danmark, men endnu har vi ikke fundet den. Det kunne også tænkes, at det er en eksotisk gruppe, som kun trives indendørs, men det kræver yderligere studier at afdække dette. Det skal påpeges, at i gartneri E, hvor i alt fem isolater blev fundet, faldt disse i tre forskellige grupper. Så isolater fra samme gartneri har dermed ikke samme oprindelse og kan stamme fra forskellige kilder. De tre isolater, som kom fra frilandsgartnerier var alle i grupper, som tidligere er kendt fra Danmark (Meyling et al., 2009), så disse stammer sandsynligvis fra reservoiret i jorden.

Ligeledes blev der i litteraturstudiet kun i få artikler rapporteret om fund af *T. harzianum* og *T. polysporum* i luftprøver. Til gengæld kunne arterne *T. viride* i litteratur studiet ofte findes i luftprøver (Madsen et al., 2007). I nærværende studium blev *Trichoderma* spp. detekteret i personbårne samplere i et agurkegartneri, et grønsagspakkeri og 2 marker. Forekomsten af *Trichoderma* spp. var således sporadisk, men når *Trichoderma* spp. blev fundet, var eksponeringsniveauet relativt højt. I det ene gartneri hvor Supresivit blev anvendt, blev *T. harzianum* Su detekteret, mens ingen andre *Trichoderma* arter blev fundet.

### 6.1.3 Andre svampe, bakterier og aktinomyketer

Udendørs referencemål for  $\beta$ -glucan var  $14 \text{ ng m}^{-3}$  (median værdi) og således var eksponeringerne i væksthuse og ved arbejde på friland højere end referencemålet. I svenske hjem med og uden svampeproblemer er der fundet imellem  $0$  og  $19 \text{ ng m}^{-3}$  (Thorn and Rylander, 1998) og i canadiske hjem er der fundet et gennemsnit på  $4,3 \text{ ng m}^{-3}$  (Salares et al., 2009). Det er således meget højere eksponeringer der er fundet i gartnerier. For canadiske træarbejdere er der fundet en positiv sammenhæng mellem  $\beta$ -glucan eksponering (GM mellem  $0,38$  og  $3,48 \text{ ng m}^{-3}$ ) og arbejdsrelateret kronisk bronkitis (Mandryk et al., 2000).

I jordbærmarker havde indholdet af  $\beta$ -glucan en medianværdi på  $44 \text{ ng mg}^{-3}$ , hvilket ligger højere, end hvad der tidligere er fundet for komposteringsarbejdere (Hryhorczuk et al., 2001). Medianværdien for dyrkbare svampe var  $6.672 \text{ cfu m}^{-3}$ , hvilket er højere end i f.eks. almindeligt indeklima (jvf. Afsnit 3.1.2), men under de  $10.000 \text{ cfu m}^{-3}$ , Heida et al. (1995) henviser til, som niveauet hvor de begynder at udgøre en trussel mod arbejdernes helbred (Tabel 3.3). Ved totaltælling fandt vi en medianværdi på  $98.925$  svampesporer  $\text{m}^{-3}$ , hvilket ligger indenfor de  $20.000$ - $500.000$  sporer  $\text{m}^{-3}$ , Eduard et al. (2001) vurderede som niveauet, hvor øje- og næsesymptomer begynder. En stor andel af svampesporerne var *Cladosporium* sp. (median= $64.616$  sporer  $\text{m}^{-3}$ ), som således ligger over den tærskel på  $3.000$  *Cladosporium* sporer  $\text{m}^{-3}$ , som (Gravesen, 1979) vurderede som niveauet, hvor allergiske symptomer kan fremkaldes. For hyfefragmenterne var medianværdien  $33.333$  hyfer  $\text{m}^{-3}$ , hvilket er højt sammenlignet med andre studier; fx fandt (Pady and Kramer, 1960)  $1.811$  hyfer  $\text{m}^{-3}$ , og (Delfino et al., 1997) fandt  $416$  hyfer/ $24$ -hr  $\text{m}^{-3}$ .

### 6.1.4 Støv, partikler og endotoksin

Et antal på  $24$  personer blev eksponeret for mere støv end arbejdstilsynets grænseværdi på  $3 \text{ mg m}^{-3}$  (jvf Tabel 3.3). Kun få studier har undersøgt eksponeringen for støv og endotoksin af ansatte i gartnerier. I en undersøgelse af ansatte i gartnerier ( $n = 39$ ) der arbejdede med blomster og prydpflanter i Spanien, blev arbejderne udsat for  $0,08$ - $0,21 \text{ mg støv m}^{-3}$  (median =  $0,09 \text{ mg m}^{-3}$ ) (Monsó, 2004). I en hollandsk undersøgelse af personer, der arbejdede i et agurke og paprikagartneri, var eksponeringsniveauet for inhalerbart støv mellem  $<0,1$  og  $2,4 \text{ mg m}^{-3}$  (GM =  $0,3 \text{ mg m}^{-3}$ ,  $n = 14$ ) (Spaan et al., 2006). Derfor blev de ansatte i agurke- og tomat-gartnerier i denne undersøgelse udsat for højere niveauer af støv end tidligere rapporteret. I andre miljøer hvor plantemateriale håndteres, er både højere og lavere eksponeringsniveauer fundet. For eksempel er citrus- (median =  $41,8 \text{ mg m}^{-3}$ ,  $n = 11$ ) og druehøst-arbejdere (median =  $3,2 \text{ mg m}^{-3}$ ,  $n = 10$ ) (Lee et al., 2004) og hampbearbejdningsarbejdere (geometrisk gennemsnit =  $22,9 \text{ mg m}^{-3}$ ,  $n = 7$ ) (Fishwick et al., 2001) udsat for høje niveauer af inhalerbart støv. I modsætning hertil er champignon-arbejdere, udsat for lave mængder af inhalerbart støv (median =  $0,68 \text{ mg støv m}^{-3}$ ,  $n = 30$ ) (Simpson et al., 1999). I undersøgelsen af citrus- og druehøst-arbejdere, var citrusfrugt-arbejdere udsat for mere støv end druehøst-arbejdere. I denne undersøgelse blev agurkehøst-arbejdere, udsat for betydeligt mere støv end tomathøst-arbejdere. Dette kan være relateret til, at agurkeplanter har store blade, hvorpå støvet kan akkumuleres.

Koncentrationen af partikler var lavere i en gang i et agurkevæksthus end i agurkepakkeriet i samme gartneri (Figur 5.6a). Partikler under  $1 \mu\text{m}$  og

partikler over 12 µm var der således mindst 100 gange flere af i pakkeriet end i væksthuset (Figur 5.6b). Partikler mellem 2,5 og 3,8 µm var der kun omkring 12 gange flere af i pakkeriet end i væksthuset. Mikroorganismer findes ofte som partikler af netop denne størrelse (jvf. Tabel 3.1) og der blev fundet flere dyrkbare mikroorganismer i luften i gangarealet i væksthuset end i pakkeriet. Endotoksin koncentrationen var derimod højere i pakkeriet end i gangområdet. Dette indikerer, at endotoksin frigives under pakning af agurker, og/eller at det endotoksin, der frigives under pakning af agurker, findes som mindre partikler og dermed forbliver luftbærent i en længere periode, end det endotoksin der frigives i væksthuse under høst og under nedrivning.

Som det fremgår af tidligere afsnit var koncentrationen af mikroorganismer målt med stationære samplere væsentligt lavere end målt med personbårne samplere. Koncentrationen af partikler er målt med stationært udstyr og er således ikke, hvad personer, der arbejder med f.eks. høst eksponeres for, men hvad man eksponeres for f.eks. ved ophold i et væksthuse. Af figur 5.6c og d fremgår det, at koncentrationen af partikler og massen af partikler er lavere end i en halmodtagelse på biobrændselsanlæg. Målingen på biobrændselsanlægget er også foretaget med en stationær måler, og er medtaget til sammenligning med niveauer fundet i gartnerier.

I både tomat og agurke-gartnerier er der et højt antal af partikler omkring 1,8-3,5 µm, dvs. i det størrelsesinterval, hvor mikroorganismer ofte findes (jvf. Tabel 3.1). F.eks. er *Trichoderma* spp. fundet i et tomatgartneri og sporer afgivet fra *T. harzianum* kan have en aerodynamisk diameter på 2,8-3,2 µm (jvf. Tabel 3.1). To andre svampe, som er fundet i væksthuse, er *Penicillium* og *Aspergillus* arter; sporer fra disse arter ligger også inden for størrelsesintervallet 1,8-3,5 µm (jvf. Tabel 3.1). I tomatgartnerier sker der en forskydning af partikelstørrelsesfordelingen under vækstsæsonen (Figur 5.8). Således er der flere større partikler i luften under høst end under pasning. Dette stemmer overens med, at der er flere mikroorganismer i luften under høst end under pasning.

Partikelkoncentrationen kan ikke risikovurderes i sig selv, men som det fremgår af tabel 3.3, har (Donham and Cumro, 1999) foreslået en grænseværdi for respirabelt støv. Vi har derfor ud fra APS data udregnet, eksponeringen for respirabelt støv ved at opholde sig i gangen i et tomatvæksthuse (gartneri G). Eksponeringen for respirabelt støv er 0,14 µg m<sup>-3</sup> og således væsentligt under den foreslåede grænseværdi (jf. Tabel 3.3).

En andel af arbejderne på 41 % var eksponeret for mindst 150 EU m<sup>-3</sup>. Dvs. at eksponeringen er så høj, at der kan forventes helbredseffekter jf. tabel 3.3. Endotoksineksponeringen for ansatte i tomat- og agurke-gartnerier var højere end eks. eksponering af savværks- og rensningsanlægsarbejdere. Eksponering for endotoksin (medianværdi) på friland var på niveau med den eksponering af savværks- og rensningsanlægsarbejdere (medianværdi). Eksponeringen af personer, der høster agurker eller afrydder agurke og tomatplanter, var på niveau med eksponering af svinefarmere (Tabel 3.2 versus Tabel 5.12). Koncentrationer af endotoksin i vinden omkring gartnerier (referenceværdier i Tabel 5.13) ligger inden for normalniveauer præsenteret i figur 3.1. Endotoksinniveauet i jordbærmarker lå mellem 3 og 25 EU m<sup>-3</sup> (median=4,5 EU m<sup>-3</sup>) og var på linje med, hvad der ellers er målt som baggrundseksponering f.eks. i byer (se figur 3.1). Både de højeste og de laveste niveauer var lavere end det niveau, hvor effekter på luftvejene kan forventes (jvf. Tabel 3.3).

Eksposeringen for de málte enzymer kan ikke risikovurderes, men som det fremgár af afsnit 3.1.5 kan enzymeksposering være forbundet med udvikling af allergi. Vi har ikke fundet andre studier, hvor der er mált eksposering for luftbárent  $\beta$ -glucosidase, xylanase og  $\alpha$ -amylase. NAGase og  $\beta$ -glucosidase var ligesom eksposeringen for de øvrige bioaerosolkomponenter højt for ansatte i tomat og agurkegartnerier.

## 6.2 Potentiel eksposering fra grønsager

Forbrugere kan potentielt eksposeres for mikroorganismer gennem fødevarerne. Disse mikroorganismer kan tænkes at stamme fra baggrundseksponering eller fra et udbragt biologisk bekæmpelsesmiddel. For at vurdere eksposeringen for mikroorganismer blev udvalgte grønsager undersøgt for forekomst af specielt de arter, som anvendes i biologisk bekæmpelse.

### 6.2.1 Mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse

Bakterier identiske med *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 blev fundet i særdeles varierende tætheder på grønsager i gartnerier hvor sprøjtemidlet Dipel, som indeholder denne bakterie, var blevet anvendt. Tæthederne varierede mellem ganske få cfu i et tomatgartneri, hvor Dipel var blevet anvendt til pletvis bekæmpelse af tomatuglen, over tætheder på mellem  $10^3$  og  $10^4$  cfu/g på hvidkål og bladselleri, henholdsvis 3 dage og 1 måned efter anvendelsen af sprøjtemidlet, til tætheder som er højere end  $10^4$  på broccoli sprøjtet tre uger før prøve-indsamlingen. Disse tætheder er ikke forskellige fra hvad der tidligere er blevet rapporteret fra hvidkål i et dansk feltforsøg (Pedersen et al., 1995), og fra en række forskellige grønsager indsamlet i Danmark i detail-ledet (Hendriksen og Hansen, 2006; Frederiksen et al., 2006). Det er derimod overraskende, at der på bladselleri og broccoli blev fundet tætheder på helt op til ca.  $2 \times 10^4$  cfu/g tre til fire uger efter anvendelsen af Dipel; den generelle antagelse har hidtil været, at kun et meget begrænset antal sporer ville overleve så længe som fire uger på planteoverflader (Glare og O'Callaghan, 2000). Dette kan måske skyldes bladselleris og broccolis komplicerede morfologi, da den hidtidige viden har været baseret på overlevelse på simple planteoverflader. Det er også en ny observation at *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 sporer kan findes på bladoverflader inden i et kålhovede; dette kan måske skyldes, at de kan følge vandfilm ind i hovedet fra hovedets underside. Dette betyder, alt i alt, at der kan ske en human eksposering for bakterier identiske med *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 i tætheder der overstiger  $10^4$  cfu/g efter anvendelse af plantebeskyttelsesmidlet Dipel.

I det ene tomatgartneri hvor det mikrobiologiske bekæmpelsesmiddel Supresivit blev anvendt, blev der ikke detekteret *Trichoderma* svampe på de høstede tomater. Baseret på dette resultat kan det vurderes, at den humane eksposering via grønsager til *T. harzianum* fra bekæmpelsesmidlet er lav.

### 6.2.2 Baggrundseksponering for arter anvendt i biologisk bekæmpelse

De tre isolater af *Beauveria*, som stammede fra grønsager, var alle fra frilandsgartnerier. Der blev ikke anvendt *Beauveria bassiana* til biologisk bekæmpelse i nogle af de gartnerier, hvor grønsager blev indsamlet, derfor må det antages, at de tre isolerede CFU fra grønsager stammer fra naturligt forekommende svampe. Dette stemmer også med de molekylære grupper,

som de tre isolater faldt i. Alle tre grupper er tidligere påvist i Danmark (Meyling et al., 2009). De to isolater fra broccoli blev indsamlet samme dag, men tilhørte to forskellige grupper, så denne lokalitet rummer i hvert fald disse to grupperinger. Sporerne fra grønsagsoverflader på broccoli og bladselleri stammer sandsynligvis fra reservoiret i markjorden. Dog viste det sig også, at vask af broccoli-buketter gav positiv detektion af *Beauveria*, mens stomaching af buketter fra samme plante med efterfølgende pladespredning af suspension ikke gav positiv detektion. Så i de lave koncentrationer, som *Beauveria* naturligt forekommer i, har den valgte metode muligvis underestimeret antallet af CFU på grønsagsoverflade. Men i alle tilfælde kan det konkluderes, at baggrundseksponeringen for *Beauveria* fra grønsager er meget lav.

Ved de anvendte detektionsmetoder blev der ikke detekteret *Trichoderma* svampe på de undersøgte grønsager. Den naturlige humane eksponering til *Trichoderma* svampe via grønsager er således meget beskednen.

Der blev kun fundet ganske lave tætheder af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på grønsager, hvor der ikke var anvendt Dipel. Disse tætheder var lavere end de tætheder (Rosenquist et al., 2005) rapporterede fra en række forskellige grønsager indsamlet i detailledet. De isolerede bakterier kan henføres til *Bacillus cereus* og *Bacillus weihenstephanensis*, hvilket er meget naturligt da begge arter er ganske almindelige i en dansk jord (Hendriksen et al., 2006). Den naturlige humane eksponering for *Bacillus cereus*-lignende bakterier er, med udgangspunkt i resultaterne i denne undersøgelse særdeles begrænset.

### 6.2.3 Enterotoksisk potentiale af *Bacillus*-isolater

EFSA (2005) er en risikovurdering af forekomsten af *Bacillus cereus* i fødevarer. I "opinionen" konkluderes det, at *Bacillus cereus* stammer kan forårsage en forgiftning der giver sig udtryk i diarre og som er knyttet til antallet af celler som konsumeres eller en forgiftning som giver sig udtryk i opkastninger, som er knyttet til mængden af toksinet cereulid, som produceres i fødevarer. Ifølge "opinionen" viser publicerede undersøgelser vedrørende fødevarerforgiftninger med *Bacillus cereus*, at  $10^5$ - $10^6$  cfu/g fødevarer klart kan forårsage sygdom, mens et antal på  $10^3$  cfu/g fødevarer i sjældne tilfælde kan være tilstrækkelige. Alle *Bacillus cereus* stammer har ikke den samme evne til at forårsage diarre i følge "opinionen", toksiner der er involveret i diarre givende forgiftninger inkluderer enterotoksinerne Hemolysin BL, det ikke hæmolytiske enterotoksin og Cytotoksin K, men det er ikke muligt på en enkel måde at identificere stammer som kan forårsage diarre blot ud fra tilstedeværelsen af gener for disse toksiner. Det er kun muligt at konkludere, at stammer som besidder gener for disse toksiner har et potentiale for at forårsage diarre, hvis de bliver konsumeret i en tilstrækkelig koncentration, som altså oftest er større end  $10^5$  cfu/g fødevarer. Generne for disse tre endotoksiner er placeret på bakteriernes kromosom, og der er derfor en meget begrænset sandsynlighed for, at de bliver overført til andre bakterier. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 besidder gener for produktion af enterotoksiner (Hansen og Hendriksen, 2001).

Blandt *Bacillus cereus*-gruppe bakterierne isoleret fra gartnerier, hvor der ikke var anvendt Dipel blev gener for de tre enterotoksiner fundet almindeligt udbredt, som det f.eks. også er blevet fundet hos *Bacillus cereus*-gruppe bakterier isoleret fra en dansk jord (Hendriksen et al., 2006). Det er ikke sandsynligt, at dette udgør nogen risiko for mennesker med de lave koncentrationer bakterierne er fundet i.

I gartnerier, hvor Dipel er blevet anvendt, er der på hvidkål, bladselleri og broccoli fundet tætheder af *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 lignende



bakterier som overstiger  $10^3$  cfu/ g, men aldrig i tætheder som overstiger  $10^5$  cfu/g. Det er ikke muligt, med udgangspunkt i den tilgængelige viden at vurdere hvorvidt dette udgør en reel risiko for mennesker ved konsumtion af disse grønsager, men det kan ikke udelukkes, da *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 har potentialet for at forårsage diarre.

Der blev ikke fundet *Bacillus cereus*-gruppe bakterier, der kan producere "opkastnings-toksinet" cereulid på grønsager fra nogle af de undersøgte gartnerier.

### 6.3 Udvikling af metode til identifikation af *Trichoderma harzianum* SU

Tidligere er en molekylærbiologisk metode til specifik identifikation af *T. harzianum* Su blevet udviklet (Lübeck og Jensen, 2002). Den dér anvendte UP-PCR-metode er baseret på PCR-amplifikation af DNA isoleret fra renkulturer dyrket på agarmedium, efter fulgt af gelektroforese og sammenligning af båndmønstre. UP-PCR-metoden kan derfor ikke anvendes på DNA ekstraheret direkte fra miljøprøver uden forudgående dyrkning og isolering af dyrkbare svampe. Derfor ønskede vi at udvikle en metode til direkte identifikation og genfindning af *T. harzianum* Su i DNA ekstraheret fra luftfiltre og fra overfladen af grønsager. Det udviklede primersæt er yderst specifik overfor *T. harzianum* Su og blev brugt til positiv identifikation af dyrkede kolonier af svampe der morfologisk lignende *T. harzianum*. Der blev ligeledes testet for forekomst af *T. harzianum* Su direkte i miljøprøverne, men her uden positivt resultat. Dette kan skyldes en kombination af lav forekomst af svampen og for høj detektionsgrænse for PCR-amplifikationen. Yderligere metodeoptimering vil derfor være påkrævet før anvendelse af metoden i miljøprøver.

### 6.4 En strukturel forklaringsmodel for *Bacillus thuringiensis* skæbne på grønsager

Ved anvendelse af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler baseret på *Bacillus thuringiensis* udsprøjtes bakterierne som sporer på grønsagerne i en høj tæthed. Denne tæthed er blevet opgjort til oftest at udgøre mellem  $10^6$  og  $10^7$  sporer/g grønsag (Hansen et al., 1996). Skæbnen af de udsprøjtede sporer på blade fra grønsager og andre planter er blevet undersøgt i nogle relativt få skæbne forsøg. Disse undersøgelser viser, at tætheden initielt (de første få døgn) falder meget kraftigt med halveringstider på tætheden på 10-24 timer, og derefter falder med en lavere hastighed med halveringstider på mellem 2 og 5 døgn, for derefter oftest helt at være forsvundet fra bladene efter ca. 1 måned (Hansen et al., 1996; Glare og O'Callaghan, 2000). Lignende forsøg i jord har fundet meget varierende, men også væsentligt højere halveringstider (14 til 335 døgn); Hendriksen og Hansen (2002) dokumenterede, at nogle *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* sporer havde overlevet i en jord i syv år.

Populationsstørrelsen af en given bakteriel population på et givent tidspunkt på et blad kan beskrives ved hjælp af følgende model (Andrews og Harris, 2000):

$$\text{Populations størrelsen (tætheden)} = I + V - E - D$$

Hvor I er immigrationen (dvs ankomsten af levende bakterier til bladet), V er vækst (dvs en forøgelse af antallet af bakterier ved delinger), E er emigration (dvs fysisk tab eller fjernelse af levende bakterier), og D er død (dvs bakterier der overgår fra at være levende til at være døde).

Ved anvendelse af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler baseret på *Bacillus thuringiensis* spredes, som beskrevet ovenfor, høje tætheder af bakterien som endosporer på bladene, derfor vil immigrationen i denne situation være bestemt af denne spredning ved udspretningsstidspunktet. Andre former for immigration af *Bacillus thuringiensis* er også blevet dokumenteret, det drejer sig om spredning fra jord til blade sandsynligvis forårsaget af regnskyl (Pedersen et al., 1995) og spredning fra frø og jord under plantens spiring og vækst (Bizarri og Bishop, 2008). Men begge former for transport førte kun til lave sporetætheder på bladene. Det betyder altså, at immigrationen i denne situation fuldstændig er bestemt af udsprøjtningen.

Vækst af endosporer er først afhængig af sporens spiring, dernæst den vegetative celledeling. *Bacillus thuringiensis* forekommer primært som sporer på blade (Hansen et al., 1996), men Bizarri og Bishop (2007) har dog dokumenteret, at der også kan være vegetative celler tilstede i lave koncentrationer, disse celler er sandsynligvis opstået ved spiring og efterfølgende delinger. Det er dog ikke dokumenteret, at dette bidrager signifikant til tætheden af *Bacillus thuringiensis* på bladene, da koncentrationen af næringsstoffer på bladoverfladen næppe kan forårsage vækst af *Bacillus thuringiensis* (Maduell et al., 2008) Det er også dokumenteret, at *Bacillus thuringiensis* spirer og deler sig i dens mål-organismer og i fækalier fra dem, dette synes dog kun i et begrænset omfang at bidrage til populationstætheden på bladene (Raymond et al., 2010). Der er da heller aldrig beskrevet naturlig forekomst af *Bacillus thuringiensis* epidemier på blade (Glare og O'Callaghan, 2000). Det betyder, alt i alt, at spiring og vækst på blade af *Bacillus thuringiensis* kun i et meget begrænset omfang påvirker tætheden på bladene.

Emigration vil primært være betinget af regn, som kan vaske sporerne af bladene. Det er således dokumenteret at regn i et betydeligt omfang reducerer *Bacillus thuringiensis* aktivitet på blade (Burges og Jones, 1998). Det er desuden vist, at tætheden af *Bacillus thuringiensis* sporer falder som en funktion af regnmængden i et forsøg med kunstig regn (Svestka og Vankova, 1976). Det betyder, at regn i høj grad kan påvirke tætheden af *Bacillus thuringiensis* på blade, men denne emigration vil naturligvis være afhængig af regnens mængde, varighed og hyppighed.

Endosporer er generelt set særdeles resistente overfor ekstreme påvirkninger, som udtørring, varme og UV-stråling (Nicholson et al., 2000), ikke desto mindre medfører eksponering for sollys en betydelig reduktion i *Bacillus thuringiensis* sporens levedygtighed (Burges og Jones, 1998), og det er også vist, at sporer fra en række *Bacillus thuringiensis* underarter er følsomme overfor UV-bestråling (citeret i Glare og O'Callaghan, 2000). Det er desuden vist at *Bacillus thuringiensis* ikke kun er følsom overfor UV-bestråling, men også for synligt lys, specielt for bølglængder omkring 400 nm (Griego og Spence 1978). Det er endvidere blevet vist, at påvirkningen af sporens levedygtighed er afhængig af UV-dosen og dens varighed (citeret i Glare og O'Callaghan 2000). Det ser derimod ikke ud til at høje temperaturer og udtørring påvirker *Bacillus thuringiensis* sporens levedygtighed i nogen betydelig grad (citeret i Glare og O'Callaghan 2000). Det betyder, at sollys påvirker *Bacillus thuringiensis* sporens død på blade og dermed deres tæthed i

en negativ retning; denne påvirkning vil naturligvis være afhængig af sollysets intensitet og varighed. Det betyder også, at den enkelte spores eksponering for sollys vil være afgørende for dens levedygtighed, denne eksponering vil være afhængig af dens placering på planten, f.eks. på over eller undersiden af et blad.

Med udgangspunkt i den ovenforstående generelle model for populations størrelse af bakterier på blade og den efterfølgende gennemgang af de forskellige faktorerers betydning for *Bacillus thuringiensis* sporens tæthed på blade, kan den generelle model i dette specielle tilfælde omskrives til:

$$\text{Populations størrelsen (tætheden)} = I_u + V_0 - E_r - D_s$$

Hvor  $I_u$  er tætheden af *Bacillus thuringiensis* sporer på grønsagen opnået ved udsprøjtningen,  $V_0$  er den særdeles begrænsede vækst af disse sporer, er den fysiske transport bort fra grønsagen forårsaget af regn og  $D_s$  er sporens død primært forårsaget af sollys.

Hvis det kendskab man har til skæbnen af *Bacillus thuringiensis* sporer på blade og grønsager efter en udsprøjtning inddrages (dvs at henfaldet forløber med en initial høj rate og derefter en lavere) i modellen og at forløbet ellers følger de generelle eksponentielle henfald, så kan den overstående model omskrives til:

$$\text{Populationsstørrelsen (tætheden)} = I_u - k_1 \text{Exp}(I_1) - k_2 \text{Exp}(I_2) - E_r(a,m,v)$$

Hvor  $I_u$  fortsat er tætheden af sporer opnået ved udsprøjtningen,  $I_1$  er den del af sporerne, som er direkte eksponerede for sollys, og  $I_2$  er den del som kun er indirekte eksponeret for sollyset på planten. Forholdet imellem  $k_1$  og  $k_2$  vil være bestemt af plantens art og morfologi, alder og dækningsgraden.  $k_1$  er henfaldskonstanten for de direkte eksponerede sporer og  $k_2$  for de indirekte eksponerede sporer. De to henfaldskonstanter vil være afhængige af faktorer, som: antallet af solskinstimer, årstiden, breddegraden, højden i meter over havet, skygge og refleksioner. Desuden kan de påvirkes af formuleringen af plantebeskyttelsesmidlet, som kan indeholde faktorer som beskytter mod sollys (Burges og Jones, 1998), og naturligvis vil de påvirkes, hvis planterne dyrkes i et væksthus.  $E_r(a,m,v)$  er en funktion der er særdeles tilfældig, idet den er afhængig af antallet af regnbyger, regnmængden og deres varighed, som er vanskelig at forudsige. Denne størrelse kan også være afhængig af plantebeskyttelsesmidlets formulering, som kan indeholde klæbestoffer der binder sporerne til bladoverfladen (Burges og Jones, 1998), og den spiller naturligvis ingen rolle, hvis planterne dyrkes i et væksthus. Grønsagernes art og morfologi kan måske også spille en rolle for i hvilken grad sporerne skylles væk af regnen.

Det er ikke muligt med udgangspunkt i den nuværende viden, at estimere de forskellige parametre i denne model. Modellen kan anvendes til dels at sige noget generelt om hvilke faktorer, der har betydning for *Bacillus thuringiensis* sporens skæbne på grønsager efter udsprøjtning, dels som udgangspunkt for nye eksperimenter, der kan belyse og anvendes til at estimere de forskellige parametre i modellen. Generelt viser modellen, at sporens skæbne er afhængig af sollys, og derfor dels af de klimatiske betingelser og dels af grønsagens art og dyrkning, som vil påvirke i hvilket omfang den enkelte spore er eksponeret for sollyset. Regn kan sandsynligvis også have en afgørende betydning, men denne betydning er vanskelig at forudsige.

Hvis man skal sammenholde modellen med de resultater, der er opnået i dette projekt, så synes de, at være i overensstemmelse med modellen. På hvidkål ses et hurtigt initielt fald i sporetætheden på de ydre blade og på hovedets overflade, efterfulgt af et fald som forløber med en lavere hastighed, på bladene lidt inde i kålhovedet, og som sandsynligvis er beskyttede mod sollys, er antallet lavt, men relativt konstant. På broccoli og bladselleri ser henfaldet ud til at forløbe langsommere end på hvidkål, det skyldes sandsynligvis at disse to grønsager har en helt anden morfologi end hvidkål, og derfor beskytter sporerne mod sollys og måske også mod afvask forårsaget af regn.

# 7 Konklusion

## 7.1 Baggrundseksponering for mikroorganismer anvendt til biologisk bekæmpelse

I dette afsnit konkluderes vedrørende resultater for baggrundseksponering for arter af mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse. Dvs eksponering for disse arter i miljøer hvor produkter med disse mikroorganismer ikke anvendes.

I eksponeringsmålingerne i gartnerier har vi fundet at:

- ***Bacillus thuringiensis*** kun sjældent forekom i luften, og når den blev fundet var det i tomatvæksthuse.
- ***Bacillus thuringiensis*** blev ikke fundet naturligt på grønsager fra gartnerierne. Andre bakterier fra ***Bacillus cereus***-gruppen blev kun fundet i så lave tætheder på grønsagerne, at de ikke udgør nogen risiko for mennesker hvis de spises. På trods af, at hovedparten besidder gener for enterotoksiner, hvis gen-produkter kan forårsage diarre.
- ***Lecanicillium lecanii*** blev ikke fundet.
- ***Beauveria bassiana*** blev kun sjældent fundet. De enkelte fund var i luften i agurkevæksthuse, og på grønsager én gang i væksthuse og to gange på broccoli på friland. Isolaterne af ***Beauveria bassiana*** viste sig at tilhøre flere forskellige grupper ved karakterisering vha. DNA sekvenser.
- ***Trichoderma*** spp. blev fundet i luften på friland i en kålmark, et agurkevæksthuse, samt i et broccolipakkeri. Når ***Trichoderma*** spp. blev detekteret, var eksponeringsniveauet forholdsvis højt.

I et litteraturreview (Madsen et al., 2007) har vi undersøgt baggrundseksponeringen for forskellige svampearter, som også anvendes til biologisk bekæmpelse. Dette review viste:

- ***Beauveria bassiana***, ***L. lecanii*** og ***Paecilomyces lilacinus*** kun sjældent er fundet i luftprøver, og at ***Isaria fumosorosea*** (tidligere navn: ***P. fumosoroseus***) og ***I. farinosa*** (tidligere ***P. farinosus***) ikke var rapporteret fra luftprøver. Dette tyder på at mennesker kun sjældent eksponeres for disse svampe.
- ***Beauveria bassiana*** forekom i middelhøje koncentrationer, når den blev fundet (250 cfu m<sup>-3</sup>). Den blev bl.a. fundet i indeklima.
- Kun få artikler rapporterer om fund af ***T. harzianum***, ***T. polysporum*** og ***U. oudemansii*** i luftprøver. Til gengæld kunne arterne ***T. viride*** og ***U. atrum*** ofte findes i luftprøver.

I gennem målinger i gartnerier og igennem et litteraturstudium har vi opnået en omfattende viden om baggrundseksponering for mikroorganismer anvendt til biologisk bekæmpelse. Den begrænsende faktor i rapporterede studier fra litteraturen er, at der er anvendt forskellige, og ikke altid optimale metoder til opsamling, kvantificering og identificering af mikroorganismene og at mange slægter ikke er identificeret til artsniveau. I vores undersøgelser har vi derfor

tilstræbt at anvende så specifikke og optimale metoder til opsamling, kvantificering og identificering af mikroorganismer som muligt.

## 7.2 Eksponering for biologisk bekæmpelsesprodukter

I dette afsnit konkluderes vedrørende resultater omhandlende eksponering for arter af mikroorganismer anvendt i biologisk bekæmpelse. Dvs eksponering for mikroorganismer som med stor sandsynlighed kommer fra biologisk bekæmpelsesmidler. Der blev målt både under og efter anvendelse af biologisk bekæmpelsesmidler i grønsagsgartnerier. Da sådan en identifikation er afhængig af en specifik metode til genfindning af de anvendte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler har vi udviklet en metode til identifikation af *T. harzianum* stammen anvendt i midlet Supresivit.

I eksponeringsmålingerne i gartnerier har vi fundet at:

- Eksponering for *Bacillus thuringiensis* er væsentlig højere under udbringning af et produkt med *Bacillus thuringiensis* end baggrundseksponeringen for samme bakterium.
- Eksponeringen for *Bacillus thuringiensis* er under udbringning af et produkt med *Bacillus thuringiensis* på niveau med baggrundseksponeringen for det totale antal bakterier.
- Personer der arbejder i gartnerier er under og efter udbringning af *Bacillus thuringiensis* ofte (eks. 89%) eksponeret for *Bacillus thuringiensis* men ofte i lave koncentrationer.
- Personer der arbejder i gartnerier efter udbringning af *Bacillus thuringiensis* kan være eksponeret for *Bacillus thuringiensis* flere uger efter udbringningen.
- *Bacillus thuringiensis* blev fundet i varierende tætheder på grønsager i gartnerier hvor sprøjtemidlet Dipel var blevet anvendt. På hvidkål, bladselleri og broccoli kunne der findes tætheder af *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 lignende bakterier som overstiger  $10^3$  cfu/g, men aldrig i tætheder som overstiger  $10^5$  cfu/g. Tætheder som overstiger  $10^5$  cfu/g må betragtes som uacceptable på fødevarer. Det er ikke muligt, med udgangspunkt i den tilgængelige viden at vurdere hvorvidt dette udgør en reel risiko for mennesker, når disse grønsager spises, men det kan ikke udelukkes, da *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 har potentialet for at forårsage diarre.
- En forklaringsmodel for *B. thuringiensis* skæbne på grønsager, sandsynliggør, at direkte sollys er den vigtigste parameter til at forklare bakteriernes henfald på grønsagerne. Det betyder, at sol-eksponeringen af den enkelte sporer er af betydning for skæbnen, denne eksponering er ikke kun afhængig af solmængden og dens intensitet, men også af plantens morfologi og de enkelte sporens placering på planten. Afvaskning ved regn kan dog også spille en rolle for henfaldet.
- Under klargøring af et *Trichoderma harzianum* produkt til udbringning via et automatisk vandingsystem sker der en eksponering for *T. harzianum* som er væsentlig højere end baggrundseksponeringen for samme svamp.
- Eksponeringen for *T. harzianum* er væsentlig lavere under udbringning af et produkt med *T. harzianum* end baggrundseksponeringen for det totale antal svampe i samme periode.

- Personer, der arbejder i et gartneri under og umiddelbart efter udbringning af *T. harzianum*, kan være eksponeret for *T. harzianum* i lave koncentrationer.
- Under klargøring af et *Streptomyces griseoviridis*-produkt til udbringning via et automatisk vandingsystem forekom der ikke en eksponering for *S. griseoviridis*.
- Personer der arbejder i et gartneri under og efter udbringning af *S. griseoviridis* blev ikke eksponeret for *S. griseoviridis*.

Igennem dette studium har vi fået et indtryk af eksponering for mikroorganismer fra biologisk bekæmpelsesmidler under og efter udbringning. Udbringningsmetode og produkt tyder på at have stor betydning for eksponeringen, men denne del kræver flere studier med fokus på udbringning; for at kunne foretage en endelig konklusion. Ligeledes vil det være relevant at undersøge eksponeringen i potteplante- og krydderurte-gartnerier, hvor andre udbringningsmetoder og andre produkter anvendes til biologisk bekæmpelse, for at kunne give en mere generel konklusion.

Konklusionerne vedrørende *Bacillus thuringiensis* skæbne på grønsager er baseret på en strukturel forklaringsmodel. Denne model giver en overordnet forståelse af hvilke abiotiske parametre, der har betydning for sporernes henfald. Modellen kan der imod ikke anvendes til at estimere henfaldet på forskellige afgrøder og under forskellige vejrmæssige betingelser. Dette kræver, at der med udgangspunkt i den strukturelle model gennemføres skæbne eksperimenter på afgrøder med forskellige morfologi under variende vejrmæssige og eksperimentelle betingelser.

### 7.3 Eksponering for andre bioaerosol komponenter

I dette afsnit konkluderes vedrørende resultater for eksponering for forskellige bioaerosolkomponenter, som i sig selv kan være et problem og hvoraf nogle kan forstærke effekten af et andet bioaerosolkomponent, som f.eks. en organisme anvendt til biologisk bekæmpelse.

I eksponeringsmålingerne i gartnerier har vi fundet, at eksponering for støv, svampe, bakterier,  $\beta$ -glucan og endotoksin:

- er høj under høst af agurker og tomater og under afrydning af agurke og tomatplanter.
- er så høj under høst af agurker og tomater og under afrydning af agurke og tomatplanter at man kan forvente, at der kan udvikles symptomer på luftvejene.
- under pasning af unge tomatplanter er højere end baggrunds reference eksponeringer, dvs. højere end i miljøer hvor organisk materiale ikke håndteres.
- under pasning af unge tomatplanter er under det niveau, hvor symptomer på luftvejene kan forventes at udvikles.
- under høst på friland er højere end baggrunds reference eksponeringer.
- under høst på friland for de fleste personer er under det niveau, hvor symptomer på luftvejene kan forventes at udvikles.
- målt med stationære målere i væksthuse er højere end baggrunds reference eksponeringer, men dog så lav at det ikke kan betragtes som et problem.

Desuden blev det set at:

- Eksponeringen for aktinomycceter generel var lav.

Igennem dette studium har vi fået en omfattende indsigt i eksponering for bioaerosol komponenter i agurke, tomat og frilandsgrønsags gartnerier. Arbejdsopgaver som kan give for høje eksponeringer er identificeret. Det vil være relevant at undersøge, om det er muligt at reducere eksponeringen, og at forebygge udvikling af helbredssymptomer på luftvejene for de ansatte i gartnerier.



# 8 Perspektivering

## 8.1 Eksposering for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

Den indhøstede viden om forekomst af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler efter udbringning samt baggrunds niveauer af identiske eller nært beslægtede mikroorganismer er værdifuld for risikovurdering af human påvirkning af de introducerede mikroorganismer. Det vil være relevant i fremtidig forskning at fokusere på eksposering under udbringning af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Endvidere vil det være relevant at afprøve forskellige måder til udbringning for at se, om det er muligt at anvende metoder der giver lavere eksposeringer.

De to undersøgte midler, der blev udbragt med vandingsvandet, nemlig Supresivit med aktivorganismen *Trichoderma harzianum* Su og Mycostop med aktivorganismen *Streptomyces griseoviridis*, medførte ingen human eksposering til organismene i de efterfølgende dage og uger. Derfor må denne udbringningsform anses for gunstig ift. humane eksposering. Det er dog ikke i nærværende studium undersøgt om de aktive organismer overlevede i miljøet og om en begrænset overlevelse er årsag til den manglende eksposering efter udbringning.

Mikroorganismer fra mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, specielt *Bacillus thuringiensis* kan overleve på grønsager i relativt lang tid. Det betyder, at mennesker, når de spiser grønsagerne, kan blive eksponeret for restkoncentrationer af mikroorganismerne. Der findes ikke metoder, på nuværende tidspunkt, som med sikkerhed kan afgøre hvorvidt en given stamme af *B. thuringiensis* kan forårsage sygdom. Det ville være ønskeligt for risikovurderingen af *Bacillus thuringiensis*, at der fandtes metoder der muliggør en sådan vurdering. Miljøstyrelsen gennemfører, i regi af pesticidforskningsprogrammet, projektet "Alternative modeller baseret på invertebrater og funktionelle mammale cellemodeller til risikovurdering af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler", som forsøger at vurdere denne problemstilling nærmere. Det vides dog, at de fleste stammer har et potentiale til at forårsage diarre, og at der er en sammenhæng mellem eksposeringens størrelse (koncentrationen af sporer i fødevaren og mængden af fødevarer der spises) og muligheden for at forårsage diarre hos andre *Bacillus cereus* gruppe bakterier. Det betyder, at det er vigtigt at kunne estimere restkoncentrationen på grønsager og dermed den humane eksposering i forbindelse med risikovurdering af *Bacillus thuringiensis* baserede mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Den strukturelle forklaringsmodel for *Bacillus thuringiensis* skæbne på grønsager, siger noget generelt om hvilke faktorer, der har betydning for *Bacillus thuringiensis* skæbne efter udsprøjtning, men kan ikke anvendes til direkte at beregne restkoncentrationer. Modellen udgør dog et særdeles godt udgangspunkt for at gennemføre eksperimenter, der kan estimere de forskellige parametre i modellen, og derefter kan anvendes til at beregne restkoncentrationer og dermed kan blive et særdeles vigtigt værktøj i risikovurderingen. Modellen kan også bruges som udgangspunkt for skæbne-modeller for andre mikroorganismer i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler. Det vil derfor være yderst relevant at gennemføre

forskning som, med udgangspunkt i den strukturelle model for *Bacillus thuringiensis* skæbne på grønsager, kan benyttes til at beregne restkoncentrationer af mikroorganismer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler på grønsager til konsum, da en sådan forskning vil kunne bidrage væsentligt til risikovurderingen af disse midler.

## 8.2 Eksponering for andre bioaerosol komponenter

Eksponeringen for skimmelsvampe, endotoksin og støv var høj i væksthuse. Eksponeringen for støv kunne være højere end Arbejdstilsynets grænseværdi. Mulige tiltag til støvreduktion skal udvikles i samarbejde med involverede gartnerier og det er vigtigt at dokumentere effekten ved eksponeringsmålinger. Som baggrund for dette er det nødvendigt at karakterisere eksponeringsvejen og afprøve forskellige metoder til bl.a rydning af planter efter høst. Det bør f.eks undersøges hvad der er eksponeringskilden (f.eks blade) og hvordan (f.eks. vind, vibration) bioaerosolkomponenter frigives fra kilden? En sammenligning af forskellige dyrkningssystemer og/eller gartnerityper vil være relevant for at kunne lave tiltag til at reducere eksponeringen. Effekten af åbne versus lukkede vinduer vil det også være oplagt at undersøge effekten af. Det er nødvendigt ved fremtidige tiltag til reduktion af eksponeringen at dokumentere reduktionen ved relevante personbårne eksponeringsmål. Det vil også være relevant at dokumentere effekten af forbedringen ved helbredsundersøgelser af de ansatte eller ved kontrollerede laboratorieforsøg. Kontrollerede laboratorieforsøg kunne gennemføres ved eksponering af mus for støv indsamlet igennem hhv. en arbejdsdag før og efter forbedringen. Helbredseffekter på luftvejene af støv indsamlet i et arbejdsmiljø (Madsen, Saber, Nordly, Sharma, Wallin, and Vogel, 2008) og af et mikrobiologisk bekæmpelses produkt med *Bacillus thuringiensis* (Barfod, Poulsen, Hammer, and Larsen, 2010) er tidligere lavet i en musemodel. Der foreligger således metoder til sådanne undersøgelser.

Der findes pt. ingen grænseværdi for endotoksin og svampeeksponering. Til hjælp for fastsættelse af en grænseværdi vil dosis respons undersøgelser i gartnerimiljøer være relevant – dvs. det vil være relevant at undersøge sammenhængen mellem eksponering for bioaerosolkomponenter og symptomer på luftvejene. Parallelt med et sådan studie vil det være nyttigt også at undersøge dosis-respons i en musemodel, idet en epidemiologisk undersøgelse kan være begrænset af f.eks, healthy workers selection (at kun de der kan tåle eksponeringen bliver på arbejdspladsen) og af en del medarbejdere ryger (helbredseffekter på luftvejene af bioaerosoler er svære at måle på rygere).

Dette projekt har ikke omhandlet undersøgelser af værnemidler, såsom støvmasker, og der kan derfor ikke drages konklusioner eller perspektiveres vedrørende værnemidler i denne rapport. For oplysninger om brug af værnemidler henvises til Arbejdstilsynets hjemmeside ([www.at.dk](http://www.at.dk)).

## 9 Referencer

- Allermann, L., Wilkins, C.K., and Madsen, A.M., 2006. Inflammatory potency of dust from the indoor environment and correlation to content of NAGase and fungi. *Toxicol In Vitro*. 20, 1522-1531.
- Andersen, M., Magan, N., Mead, A., and Chandler, D., 2006. Development of a population-based threshold model of conidial germination for analysing the effects of physiological manipulation on the stress tolerance and infectivity of insect pathogenic fungi. *Environmental Microbiology* 8, 1625-1634.
- Anderson, A.S. and Wellington, E.M.H., 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 797-814.
- Andrews, J.H. and Harris, R.F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 145-80.
- Arbejdstilsynet, At-vejledning. Grænseværdier for stoffer og materialer [The Danish Working Authority. Work Place Exposure Limits]. 2007, pp. 1-85.
- Barfod, K.K., Poulsen, S.S., Hammer, M., and Larsen, S.T., 2010a. Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to *Bacillus thuringiensis* biopesticides in mice. *BMC. Microbiol* 10, 233.
- Barfod, K.K., Smidt, L., Kroghfelt, K.A., Larsen, T.O., and Andrup, L., 2010b. Low translocation of *Bacillus thuringiensis israelensis* to inner organs in mice after pulmonary exposure to commercial biopesticide. *Biocontrol Science and Technology* 10.1080/09583157.2010.497909.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., and Codon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249-260.
- Bizarri, M.F. and Bishop, A.H. 2007. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. *J. Invert. Patho.* 94, 38-47.
- Bizarri, M.F. and Bishop, A.H. 2008. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microb. Ecol.* 56, 133-139.
- Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Sanchez-Monge, R., Aragoncillo, C., Castillo, R., Ortega, N., Alvarez, M., Carrillo, T., and Salcedo, G., 1999. Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 103, 507-513.
- Bloom, E., Bal, K., Nyman, E., and Larsson, L., 2008. Optimizing a GC-MS method for screening of *Stachybotrys* mycotoxins in indoor environments. *J Environ Monit* 9, 151-156.
- Bloom, E., Nyman, E., Must, A., Pehrson, C., and Larsson, L., 2009. Molds and mycotoxins in indoor environments--a survey in water-damaged buildings. *J. Occup. Environ. Hyg.* 6, 671-678.
- Bonlokke, J.H., Stridh, G., Sigsgaard, T., Kjaergaard, S.K., Lofsted, H., Andersson, K., Bonfeld-Jorgensen, E.C., Jayatissa, M.N., Bodin, L., Juto, J.E., and Molhave, L., 2006. Upper-airway inflammation in relation to dust spiked with aldehydes or glucan. *Scand. J. Work Environ Health* 32, 374-382.
- Brasel, T.L., Martin, J.M., Carriker, C.G., Wilson, S.C., and Straus, D.C., 2005. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol* 71, 7376-7388.
- Breum, N.O., Schneider, T., Jorgensen, O., Valbjørn Rasmussen, O., and Skibstrup Eriksen, S., 2003. Cellulosic building insulation versus mineral wool, fiberglass or perlite: installer's exposure by inhalation of fibers, dust, endotoxin and fire-retardant additives. *Ann Occup Hyg.* 47, 653-669.
- Burges, H.D. and Jones, K.A. 1998. Formulation of bacteria, viruses, and protozoa to control insects. I: Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Ed. Burges, H.D. Kluwer, Holland.

- Calonje, M., Mendoza, C.G., Galán, B., and Novaes-Ledieu, M., 1997. Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* 143, 2999-3006.
- Castellan, R.M., Olenchock, S.A., Kinsley, K.B., and Hankinson, J.L., 1987. Inhaled Endotoxin and Decreased Spirometric Values. *N Engl J Med* 317, 605-610.
- Chew, G.L., Douwes, J., Doekes, G., Higgins, K.M., van Strien, R., Spithoven, J., and Brunekreef, B., 2001. Fungal extracellular polysaccharides, beta (1-->3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air* 11, 171-178.
- Cullinan, P., Cook, A., Nieuwenhuijsen, M.J., Sandiford, C., Tee, R., D., Venables, K.M., McdoDonald, J., C., Taylor A., J., and N., 2001. Allergen and dust exposure as determinants of work-related symptoms and sensitization in a cohort of flour-exposed workers; a case-control analysis. *Ann. occup. hyg.* 45, 97-103.
- Cvetnic, Z. and Pepeljnjak, S., 1997. Distribution and mycotoxin-producing ability of some fungal isolates from the air. *Atmospheric Environment* 31, 491-495.
- De Lucca, A., 2007. Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Revista Iberoamericana de micologia* 24, 1-13.
- Delfino, R.J., Zeiger, R.S., Seltzer, J.M., Street, D.H., Matteucci, R.M., Anderson, P.R., and Koutrakis, P., 1997. The effect of outdoor fungal spore concentrations on daily asthma severity. *Environ Health Perspect* 105, 622-635.
- Dennekamp, M., Demers, P.A., Bartlett, K., Davies, H.W., and Teschke, K., 1999. Endotoxin exposure among softwood lumber mill workers in the Canadian province of British Columbia. *Ann Agric Environ Med* 6, 141-146.
- Doekes, G., Kamminga, N., Helwegen, L., and Heederik, D., 1999. Occupational IgE sensitisation to phytase, a phosphatase derived from *Aspergillus niger*. *Occup Environ Med* 56, 454-459.
- Doekes, G., Larsen, P., Sigsgaard, T., and Baelum, J., 2004. IgE sensitization to bacterial and fungal biopesticides in a cohort of Danish greenhouse workers: The BIOGART study. *Am J Ind Med* 46, 404-407.
- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.-H., 1993. *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag, Regensburg.
- Donham, K. and Cumro, D., 1999. Setting maximum dust exposure levels for people and animals in livestock facilities. *Proceedings of the International Symposium on Dust Control in Animal Production Facilities*, 93-111.
- Draborg, H., Kauppinen, S., Dalboge, H., and Christgau, S., 1995. Molecular cloning and expression in *S. cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36, 781-791.
- Druzhinina, I. and Kubicek, C.P., 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ Sci. B* 6, 100-112.
- Dutch Expert Committee on Occupational Standards. A committee of Health Council of the Netherlands Endotoxins Health-based recommended occupational exposure limit. publication no 1998/03WGD. 1998. Rijswijk: Health Council of the Netherlands.
- Dutkiewicz, J., 1994. Bacteria, fungi, and endotoxin as potential agents of occupational hazard in a potato processing plant. *Am J Ind Med* 25, 43-46.
- Eduard, W., Douwes, J., Mehl, R., Heederik, D., and Melbostad, E., 2001. Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms. *Occupational and Environmental Medicine* 58, 113-118.
- Eduard, W., Lacey, J., Karlsson, K., Palmgren, U., Ström, G., and Blomquist, G., 1990. Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments. *Am Ind Hyg Assoc J* 51,8, 427-436.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. and Scherer, S. 2004. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett.* 232, 189-195.
- EFSA, 2005: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *The EFSA Journal* 175, 1-48.
- Fischer, G., Muller, T., Schwalbe, R., Ostrowski, R., and Dott, W., 2000. Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 105-116.

- Fishwick, D., Allan, L.J., Wright, A., and Curran, A.D., 2001. Assessment of exposure to organic dust in a hemp processing plant. *Ann Occup. Hyg.* 45, 577-583.
- Fogelmark, B. and Rylander, R., 1997. (1-3)-beta-D-glucan in some indoor air fungi. *Indoor Air* 6, 291-294.
- Foto, M., Plett, J., Berghout, J., and Miller, J.D., 2004. Modification of the *Limulus* amoebocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379, 156-162.
- Foto, M., Vrijmoed, L.L.P., Miller, J.D., Ruest, K., Lawton, M., and Dales, R.E., 2005. A comparison of airborne ergosterol, glucan and Air-O-Cell data in relation to physical assessments of mold damage and some other parameters. *Indoor Air* 15, 257-266.
- Francis, K.P., Mayr, R., von Stetten, F. Stewart, G.S.A.B. and Scherer, 1998. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3525-3529.
- 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 fruit and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3435-3440.
- Glare, T.R., and O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Wiley, Chichester.
- Granum, P.E., O'Sullivan, K. and Lund, T. 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 225-229.
- Górny, R.L., Mainelis, G., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Dutkiewicz, J., and Reponen, T., 2003. Release of *Streptomyces albus* propagules from contaminated surfaces. *Environmental Research* 91, 45-53.
- Gottschalk, C., Bauer, J., and Meyer, K., 2008. Detection of Satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia* 166, 103-107.
- Gravesen, S., 1979. Fungi as a Cause of Allergic Disease. *Allergy* 34, 135-154.
- Green, M., Heumann, M., Sokolow, R., Foster, L.R., Bryant, R., and Skeels, M., 1990. Public-Health Implications of the Microbial Pesticide *Bacillus thuringiensis* - An Epidemiologic-Study, Oregon, 1985-86. *American Journal of Public Health* 80, 848-852.
- Griego, V.M. and Spence, K.D. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 906-910.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M.D., Mateos, P.F., Bridge, P.D., Monte, E., and Garcia-Acha, I., 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3189-3198.
- Guinebretiere, M.H., Fagerlund, A., Granum, P.E. and Nguyen-The, C. 2006. Rapid discrimination of cytK-1 and cytK-2 genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 74-80.
- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Munch, J.C., Schloter, M. 2007. A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. *Journal of Microbiological Methods* 69, 86-92.
- Haglund, P. and Rylander, R., 1984. Exposure to cotton dust in an experimental cardroom. *Br J Ind Med* 41, 340-345.
- Halstensen, A.S., Nordby, K.C., Wouters, I.M., and Eduard, W., 2007. Determinants of microbial exposure in grain farming. *Ann Occup Hyg* 51, 581-592.
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. and Pedersen, J.C. 1996. *Bacillus thuringiensis*. Ecology and environmental effects if its use for microbial pest control. *Miljøprojekt* 316. Miljøstyrelsen
- Hansen, B.M. and Hendriksen, N.B., 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 185-189.
- Hansen, V.M., Eilenberg, J., and Madsen, A.M., 2010. Occupational exposure to airborne *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 and other bacteria in greenhouses and vegetable fields. *Biocontrol Science and Technology* 20, 605-619.
- Hansen, B. M. and A. Winding. 1997. Detection of a *Pseudomonas putida* B in rhizosphere by RAPD using extracted DNA. *Letters in Applied Microbiology* 24:249-252.

- Hanzi, M., Shimizu, M., Hearn, V.M., and Monod, M., 1993. A study of the alkaline proteases secreted by different *Aspergillus* species. *Mycoses* 36, 351-356.
- Hardin, B.D., Robbins, C.A., Fallah, P., and Kelman, B.J., 2009. The Concentration of No Toxicologic Concern (CoNTC) and Airborne Mycotoxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues* 72, 585-598.
- Harwig, J., Scott, P.M., Stoltz, D.R., and Blanchfield, B.J., 1979. Toxins of Molds from Decaying Tomato Fruit. *Appl Environ Microbiol* 38, 267-274.
- Hearn, V.M., Escott, G.M., Glynn, E., Evans, V., and Adams, D.J., 1998. Complex chitinolytic systems of *Aspergillus fumigatus*. *Microbios* 93, 85-104.
- Heida, H., Bartman, F., and Van der Zee, S., 1995. Occupational Exposure and Indoor Air Quality Monitoring in a Composting Facility. *Am Ind Hyg Assoc J* 56,1, 39-43.
- Hendriksen, N.B. and Hansen, B.M. 1998. Phylogenetic relations of *Bacillus thuringiensis*: implications for risks associated to its use as a microbiological pest control agent. *IOBC Bulletin* 21(4), 5-8.
- Hendriksen, N.B. and Hansen, B.M. 2002. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Can. J. Microbiol.* 48, 256-261.
- Hendriksen, N.B. and Hansen, B.M., 2006. Detection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 on cabbage for human consumption. *FEMS Microbiol. Lett.* 257, 106-111.
- Hendriksen, N.B., Hansen, B.M and Johansen, J.E. 2006. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Anton. Leeuwen.* 89, 239-249.
- Hill, K.K., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K.A., Laker, M., Pardington, P.E., Richardson, A.P., Tonks, M., Beecher, D.J., Kemp, J.D., Kolstø, A-B, Wong, A.C.L. Keim, P. and Jackson, P.J. 2004. Fluorescent amplified polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1068-1080.
- Houba, R., Heederik, D.J., Doekes, G., and van Run, P.E., 1996. Exposure-sensitization relationship for alpha-amylase allergens in the baking industry. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 130-136.
- Hryhorczuk, D., Curtis, L., Scheff, P., Chung, J., Rizzo, M., Lewis, C., Keys, N., and Moomey, M., 2001. Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. *Ann Agric Environ Med* 8, 177-185.
- Humber, R.A., 2007. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. *Insect Mycologist and Curator, ARSEF.*
- Jeffrey, P., Griffin, P., Gibson, M., and Curran, A.D., 1999. Small bakeries--a cross-sectional study of respiratory symptoms, sensitization and dust exposure. *Occup Med (Lond)* 49, 237-241.
- Jensen, G.B., Larsen, P., Jacobsen, B.L., Madsen, B., Smidt, L., and Andrup, L., 2002. *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Appl Environ Microbiol* 68, 4900-4905.
- Jespersen, A.B.K. and De Waard, M.A., 1993. Natural products in plant protection. *Neth J Plant Pathol* 99, 109-117.
- Kennedy, S.M., Christiani, D.C., Eisen, E.A., Wegman, D.H., Greaves, I.A., Olenchock, S.A., Ye, T., and Lu, P., 1987. Cotton Dust and Endotoxin Exposure-Response Relationships in Cotton Textile Workers. *Am Rev Respir Dis* 135, 194-200.
- Lacey, J., Genus *Micropolyspora* Lechevalier, Solotorovsky and McDurmont 1961. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams og Wilkins, 1986, pp. 1496-1501.
- Lacey, J., *Thermoactinomyces*. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4. Williams og Wilkins, 1989, pp. 2573-2585.
- Lacey, J. and Dutkiewicz, J., 1976. Isolation of Actinomycetes and fungi from mouldy hay using a sedimentation chamber. *J Appl Bacteriol* 41, 315-319.
- Lahoz, R., Reyes, F., and Perez Leblic, M.I., 1976. Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia* 60, 45-49.
- Laitinen, S., Kangas, J., Kotimaa, M., Liesivuori, J., Martikainen, P.J., Nevalainen, A., Sarantila, R., and Husman, K., 1994. Workers' Exposure to Airborne Bacteria and Endotoxins at Industrial Wastewater Treatment Plants. *Am Ind Hyg Assoc J* 55, 1055-1060.

- Lecadet, M-M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripoueteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thierry, I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 86, 660-672.
- Lee, K., Lawson, R.J., Olenchock, S.A., Vallyathan, V., Southard, R.J., Thorne, P.S., Saiki, C., and Schenker, M.B., 2004. Personal exposures to inorganic and organic dust in manual harvest of California citrus and table grapes. Journal of Occupational and Environmental Hygiene 1, 505-514.
- Lenhart, S.W., Morris, P.D., Akin, R.E., Olenchock, S.A., Service, W.S., and Boone, W.P., 1990. Organic Dust, Endotoxin, and Ammonia Exposures in the North Carolina Poultry Processing Industry. Appl Occup Environ Hyg 5,9, 611-618.
- Lighthart, B., Shaffer, B.T., Marthi, B., and Ganio, L.M., 1993. Artificial wind-gust liberation of microbial bioaerosols previously deposited on plants. Aerobiologia 9, 189-196.
- Luangsa-ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., Manoch, L., and Samson, R.A., 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. Mycological Res 109, 581-589.
- Luangsa-ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., and Samson, R.A., 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. Mycologia 94, 773-780.
- Lübeck, M. and Jensen, D.F. 2002. Monitoring of biocontrol agents based on *Trichoderma* strains following their application to glasshouse crops by combining dilution plating with UP-PCR fingerprinting. Biocontrol Sci Technol 12, 371-380.
- Lundholm, M. and Rylander, R., 1983. Work related symptoms among sewage workers. Br J Ind Med 40, 325-329.
- Madelin, T.M. and Johnson, H.E., 1992. Fungal and actinomycete spore aerosols measured at different humidities with an aerodynamic particle sizer. J Appl Bacteriol 72, 400-409.
- Madsen, A.M., 2003. NAGase activity in airborne biomass dust and relationship between NAGase concentrations and fungal spores. Aerobiologia 19, 97-105.
- Madsen, A.M., 2006a. Airborne endotoxin in different background environments and seasons. Ann Agric Environ Med 13, 81-86.
- Madsen, A.M., 2006b. Exposure to airborne microbial components in autumn and spring during work at Danish biofuel plants. Ann Occup Hyg 50, 821-831.
- Madsen, A.M., Hansen, V.M., Meyling, N.V., and Eilenberg, J., 2007. Human exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production. Ann Agric Environ Med 14, 5-24.
- Madsen, A.M., Kruse, P., and Schneider, T., 2006. Characterization of microbial particle release from biomass and building material surfaces for inhalation exposure risk assessment. Ann Occup Hyg 50, 175-187.
- Madsen, A.M., Mårtensson, L., Schneider, T., and Larsson, L., 2004. Microbial dustiness and particle release of different biofuels. Ann Occup Hyg 48, 327-338.
- Madsen, A.M. and Nielsen, S.H., 2010. Airborne endotoxin associated with particles of different sizes and affected by water content in handled straw. Int J Hyg Environ Health.
- Madsen, A.M., Schlünssen, V., Olsen, T.T., Sigsgaard, T., and Avci, H., 2009. Airborne fungal and bacterial components in PM<sub>1</sub> dust from biofuel plants. Ann Occup Hyg 53, 749-757.
- Madsen, A.M., Wilkins, C.K., and Poulsen, O.M., Micro-particles from fungi. In: Eckardt Johanning (Ed.), Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and Human Health: Patho-physiology, Clinical Effects, Exposure Assessment, Prevention and Control in Indoor Environments and Work, 2005 Fungal Research Group Foundation, Inc., Albany, New York, U.S.A., New York, 2005, pp. 276-291.
- Madsen, A.M. and Würtz, H., Fungal enzymes in indoor dust. In: Eckardt Johanning (Ed.), Fungal Research Group Foundation, Inc., New York, 2005, pp. 384-391.
- Maduell, P., Armengol, G., Llagostera, M., Orduz, S., Lindow, S. 2008. *B. thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. Microb Ecol. 55, 212-219.
- Malmros, P., Sigsgaard, T., and Bach, B., 1992. Occupational health problems due to garbage sorting. Waste Manage Res 10, 227-234.
- Mandryk, J., Alwis, K.U., and Hocking, A.D., 2000. Effects of Personal Exposures on Pulmonary Function and Work-related Symptoms Among Sawmill Workers. Ann Occup Hyg 44, 281-289.

- Meklin, T., Reponen, T., Toivola, M., Koponen, V., Husman, T., Hyvärinen, A., and Nevalainen, A., 2002. Size distributions of airborne microbes in moisture-damaged and reference school buildings of two construction types. *Atm Environ* 36, 6031-6039.
- Mensink, B.J.W.G. and Scheepmaker, J.W.A., 2007. How to evaluate the environmental safety of microbial plant protection products: A proposal. *Biocontrol Science and Technology* 17, 3-20.
- Meyer, H.W., Jensen, K.A., Nielsen, K.F., Kildeso, J., Norn, S., Permin, H., Poulsen, L.K., Malling, H.J., Gravesen, S., and Gyntelberg, F., 2005. Double blind placebo controlled exposure to molds: exposure system and clinical results. *Indoor Air* 15, 73-80.
- Meyling, N.V. and Eilenberg, J., 2006a. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycol. Res.* 110, 188-195.
- Meyling, N.V. and Eilenberg, J., 2006b. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture Ecosystems og Environment* 113, 336-341.
- Meyling, N.V., Pell, J.K., and Eilenberg, J., 2006. Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 121-126.
- Meyling, N.V., Lübeck M., Buckley E.P., Eilenberg J. and Rehner S.A. 2009. Community composition, host-range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and semi-natural habitats. *Molecular Ecology*, 18, 1282-1293.
- Milner, J.L., Stohl, E.A. and Handelsman, J. 1996. Zwittermicin A resistance gene from *Bacillus cereus*. *J. Bact.* 178, 4266-4272.
- Monsó, E., 2004. Occupational asthma in greenhouse workers. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 10, 147-150.
- Monso, E., Magarolas, R., Badorrey, I., Radon, K., Nowak, D., and Morera, J., 2002. Occupational asthma in greenhouse flower and ornamental plant growers. *Am J Respir. Crit. Care Med* 165, 954-960.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548-572.
- Nielsen, K.F., 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology* 39, 103-117.
- Nieuwenhuijsen, M.J., Heederik, D., Doekes, G., Venables, K.M., and Newman Taylor, A.J., 1999. Exposure-response relations of alpha-amylase sensitisation in British bakeries and flour mills. *Occup Environ Med* 56, 197-201.
- Pady, S.M. and Kramer, C.L., 1960. Kansas aeromycology VI: Hyphal Fragments. *Mycological Society of America* 52, 681-687.
- Palmgren, U., Ström, G., Blomquist, G., and Malmberg, P., 1986. Collection of airborne micro-organisms on Nuclepore filters, estimation and analysis-CAMNEA method. *J Appl Bacteriol* 61, 401-406.
- Pedersen, J.C., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. and Hansen, B.M. 1995. Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* in an experimental cabbage field. *Can. J.Microbiol.* 41, 118-125.
- Petrie, K., Thomas, M., and Broadbent, E., 2003. Symptom complaints following aerial spraying with insecticide Foray 48B. *The New Zealand Medical Journal* 116.
- Posch, A., Wheeler, C.H., Chen, Z., Flagge, A., Dunn, M.J., Papenfuss, F., Raulf-Heimsoth, M., and Baur, X., 1999. Class I endochitinase containing a hevein domain is the causative allergen in latex-associated avocado allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 29, 667-672.
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W.J., Maiden, M.C.J. 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bact.* 186, 7959-7970.
- Smit, E., Leeftang, P., Glandorf, B., van Elsas, J. D., Wernars, K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Env. Microbiol.* 65, 2614-2621.



- Quirce, S., Cuevas, M., ez-Gomez, M., Fernandez-Rivas, M., Hinojosa, M., Gonzalez, R., and Losada, E., 1992. Respiratory allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in bakers' asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 90, 970-978.
- Radon, K., Danuser, B., Iversen, M., Monso, E., Weber, C., Hartung, J., Donham, K., Palmgren, U., and Nowak, D., 2002. Air contaminants in different European farming environments. *Ann Agric Environ Med* 9, 41-48.
- Radon, K., Weber, C., Iversen, M., Danuser, B., Pedersen, S., and Nowak, D., 2001. Exposure assessment and lung function in pig and poultry farmers. *Occup Environ Med* 58, 405-410.
- Raffel, S.J., Stabb, E.V., Milner, J.L. and Handelsman, J. 1996. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 142, 3425-3436
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol*, in press.
- Rehner, S.A. and Buckley, E.P., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97, 84-98.
- Rehner, S.A., Posada, F., Buckley, E.P., Infante, F., Castillo, A., and Vega, F.E., 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 11-21.
- Rivera, A.M.G., Priest, F.G. 2003a. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 254-261.
- Rivera, A.M.G., Priest, F.G. 2003b. Pulsed field electrophoresis of chromosomal DNA reveals a clonal population structure to *Bacillus thuringiensis* that relates to crystal protein gene content. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 61-66.
- Rosenquist, H. Smidt, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B. and Wilcks, A., 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 129-136.
- Ruiz, J.A., Bentabol, A., Gallego, C., Angulo, R., Acosta, I., and Jodral, M., 1996. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould flora of the different greenhouse substrates for the cultivation of cucumber (*Cucumis sativus*, L). *International Journal of Food Microbiology* 29, 193-199.
- Ryan, P.A., Macmillan, J.D. and Zilinskas, B.A. 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L(1) and L(2) components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bact.* 179, 2551-2556.
- Rylander, R., 1999. Indoor air-related effects and airborne (1 --> 3)-beta-D-glucan. *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 3, 501-503.
- Rylander, R., Haglund, P., and Lundholm, M., 1985. Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton workers in an experimental cardroom. *Am Rev Respir Dis* 131, 209-213.
- Salares, V.R., Hinde, C.A., and Miller, J.D., 2009. Analysis of Settled Dust in Homes and Fungal Glucan in Air Particulate Collected during HEPA Vacuuming. *Indoor Built Environ.* 00, 1-7.
- Shaffer, B.T. and Lighthart, B., 1997. Survey of Culturable Airborne Bacteria at four diverse locations in Oregon: Urban, Forest, and Coastal. *Microb Ecol* 34, 167-177.
- Sigsgaard, T., Bonefeld-Jorgensen, E.C., Kjaergaard, S.K., Mamas, S., and Pedersen, O.F., 2000. Cytokine release from the nasal mucosa and whole blood after experimental exposures to organic dusts. *Eur Respir J* 16, 140-145.
- Sigsgaard, T., Malmros, P., Nersting, L., and Petersen, C., 1994. Respiratory Disorders and Atopy in Danish Resource Recovery Workers. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 1407-1412.
- Simpson, J.C., Niven, R.M., Pickering, C.A., Oldham, L.A., Fletcher, A.M., and Francis, H.C., 1999. Comparative personal exposures to organic dusts and endotoxin. *Ann Occup Hyg* 43, 107-115.
- Smid, T., 1993. Exposure To Organic Dust and Respiratory Disorders an epidemiological study in the animal feed industry. CIP gegevens Koinklijke Bibliotheek Den Haag.
- Smid, T., Heederik, D., Houba, R., and Quanjer, P.H., 1992. Dust- and endotoxin-related respiratory effects in the animal feed industry. *Am Rev Respir Dis* 146, 1474-1479.

- Smit, L.A.M., Spann, S., and Heederik D., 2005. Endotoxin exposure and symptoms in wastewater treatment workers. *Am J Ind Med* 48, 30-39.
- Sorenson, W.G., Frazer, D.G., Jarvis, B.B., Simpson, J., and Robinson, V.A., 1987. Trichothecene Mycotoxins in Aerosolized Conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol* 53,6, 1370-1375.
- Sowka, S., Hsieh, L.-S., Krebitz, M., Akasawa, A., Martin, B.M., Starret, D., Peterbauer, C.K., Scheiner, O., and Breiteneder, H., 1998. Identification and cloning of Prs a 1, a 32-kDa Endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the Yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 28091-28097.
- Spaan, S., Wouters, I.M., Oosting, I., Doekes, G., and Heederik, D., 2006. Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. *J. Environ. Monit.* 8, 63-72
- Stahly, D.P., Andrews, R.E., Yousten, A.A. 1992. The Genus *Bacillus* – Insect pathogens. *The Prokaryotes*. 2. Edition. Eds. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. Schleifer, K-H. pp. 1697-1745.
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B., and Spatafora, J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* 57, 5-59.
- Svestka, M. and Vankova, J. 1976. Effects of artificial rain on the persistence of spores of *Bacillus thuringiensis* Berl. *Lesnictvi* 20, 439-464.
- Teschke, K., Chow, Y., Bartlett, K., Ross, A., and van Netten, C., 2001. Spatial and temporal distribution of airborne *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* during an aerial spray program for gypsy moth eradication. *Environmental Health Perspectives* 109, 47-54.
- Thorn, J., Beijer, L., and Rylander, R., 2001. Effects after inhalation of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in healthy humans. *Mediators Inflamm.* 10, 173-178.
- Thorn, J. and Rylander, R., 1998. Airways Inflammation and Glucan in a Rowhouse Area. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 1798-1803.
- Travers, R.S., Martin, P.A.W. and Reichelderfer, C.F., 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1263-1266.
- Turnbull, P., Kramer, J., Melling, J. 1990. *Bacillus*. *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity* Vol. 2, Systematic Bacteriology, Eighth edition. Eds. Parker, M.T., Duerden, B.I.. Edward Arnold, London, pp 187-210.
- Vanhanen, M., Tuomi, T., Hokkanen, H., Tupasela, O., Tuomainen, A., Holmberg, P.C., Leisola, M., and Nordman, H., 1996. Enzyme exposure and enzyme sensitisation in the baking industry. *Occup Environ Med* 53, 670-676.
- von Stetten, F., Francis, K.P., Lechner, S., Neuhaus, K. and Scherer, S. 1998. Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA. *J. Microbiol. Methods* 34, 99-106.
- Willumsen, P.A., Johansen, J.E., Karlson, U. and Hansen, B.M. 2005. Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 503-515.
- Williams, J., Clarkson, J., Mills, P. R., Cooper, R., M. 2003. A selective medium for quantitative re-isolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4190-4191
- Wouters, I., Hilhorst, S.K.M., Kleppe, P., Doekes, G., Douwes, J., Peretz, C., and Heederik D., 2002. Upper airway inflammation and respiratory symptoms in domestic waste collectors. *Occup Environ Med* 59, 106-112.
- Zare, R. and Gams, W., 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata, IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73, 1-50.

Ordforklaring

Cfu=colony forming units = kolonidannende enheder

PCR = ***Polymerase Chain Reaction*** - en genforstærkningsteknik.

EU = Endotoxin Units - en enhed for endotoksin.

NAGase =N-acetyl--D-glucosaminidase

Majority Rule Consensus Tree = Et stamtræ som kun viser forgreninger, der optræder i mere end 50 % af de træer, som findes ved den valgte statistiske metode

Bootstrapværdi = statistisk støtte til forgreningen i et stamtræ. Angives som procent.

Monofyletisk gruppe = En stamform (en gren) og alle dens afledede former i et stamtræ

Parsimoni = Metode til at beregne det stamtræ, som kræver det mindst mulige antal udviklingsmæssige ændringer