

Udsættes gartneriarbejdere for mikroorganismer anvendt til biologisk bekæmpelse ?

Anne Mette Madsen^a, Anne Winding^b, Vinni Mona Hansen^{a,c}, Jørgen Eilenberg^c, Nicolai Vitt Meyling^c, Kira Tendal^a og Niels Bohse Hendriksen^c

^aDet Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø (NFA), ^b Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet, ^c Institut for Jordbrug og Økologi, Københavns Universitet

Gartneriarbejdere bliver udsat for de mikroorganismer (svampe og bakterier), som anvendes til biologisk bekæmpelse i danske grønsagsgartnerier. Størst eksponering sker ved udbringningen af disse mikroorganismer, men der var store forskelle mellem afgrøder og udbringningsmetode. F.eks. kan bakterien *Bacillus thuringiensis* efter udbringning forekomme i høje koncentrationer på broccoli, bladselleri og hvidkål. Ved høst af tomater til konsum var koncentrationerne lave.

Baggrund og formål

Bekæmpelse af skadedyr og plantesygdomme ved anvendelse af biologisk bekæmpelse er udbredt i gartnerier. Igennem de senere årtier er udvalget af organismer til biologisk bekæmpelse derfor vokset støt, således at danske avlere nu i mange tilfælde helt kan undgå at bruge kemiske bekæmpelsesmidler. En række midler til biologisk bekæmpelse er baseret på mikroorganismer, såvel svampe (f.eks. *Beauveria bassiana* og *Trichoderma* spp.) som bakterier (f.eks. *Bacillus thuringiensis* og *Streptomyces griseoviridis*).

Med den øgede brug af biologisk bekæmpelse er det naturligt at belyse, om der kan være arbejdsmiljømæssige og sundhedsmæssige risici forbundet hermed. I dette projekt var der fokus på, i hvilket omfang mennesker udsættes for (= eksponeres for) de anvendte mikroorganismer, sammenholdt med arbejdstilsynets grænseværdi på maksimalt 3 mg organisk støv pr. m³ luft. Der er ingen officielle grænseværdier for eksponering for endotoksin og mikroorganismer i arbejdsmiljøet, men der findes værdier baseret på videnskabelige studier i forskellige arbejdsmiljøer. I dette studium forholdes endotoksin eksponeringer til en foreslået grænseværdi på 150 EU pr m³ og svampeeksponering til en foreslået grænseværdi på 10⁵ sporer pr m³.

Følgende spørgsmål blev besvaret:

- 1) Kan der måles en øget eksponering via luft eller grønsager, når man bruger mikrobiologisk bekæmpelse?
- 2) Udgør denne eksponering en potentiel sundhedsmæssig risiko?
- 3) Hvad er baggrundseksponeringen, dvs. den naturlige forekomst af mikroorganismer via luft målt i væksthuse og ved frilandsproduktion af grønsager?

Undersøgelsen (max 100 ord)

I 2007 og 2008 blev der udført målinger i ni grønsagsgartnerier: Fem væksthusegartnerier (tre tomatgartnerier og to agurkegartnerier) og fire frilandsgartnerier (tre dyrkede bl.a. kål og ét

jordbær). Fem af de ni gartnerier anvendte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Eksponeringen via luften (Figur 1) blev målt for følgende komponenter: Skimmelsvampe, herunder *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Lecanicillium* spp., bakterier herunder *Bacillus* spp. og *Streptomyces griseoviridis*. Desuden målte støv som kan inhaleres samt endotoksin fra naturligt forekommende bakterier. Udsættelse for høje koncentrationer af endotoksin kan føre til udvikling af inflammation i luftvejene, inflammation er en betændelses lignende tilstande. Endvidere blev koncentrationerne af *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Lecanicillium* spp. og *Bacillus* spp. på overflader af grønsager målt.

Undersøgelsen er udført af forskere fra Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø, Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet, Institut for Jordbrug og Økologi, Københavns Universitet.



Figur 1. Ansatte bar udstyr til opsamling af luftbærent støv og mikroorganismer. 117 gange bar medarbejdere udstyret igennem en arbejdsdag. Pilen peger på en pumpe, som anvendes til opsamling af støv (a). Stationært udstyr (ved pil) til opsamling af referencestøv blev placeret udendørs (b). Støvet blev senere analyseret i laboratoriet for indhold af mikroorganismer.

Hovedkonklusioner

Vi har belyst den humane eksponering for mikroorganismer fra biologiske bekæmpelsesmidler under og efter udbringning. Generelt havde udbringningsmetode og afgrøde stor betydning for eksponeringsniveauet via luften. Brugen af *Bacillus thuringiensis* og *Trichoderma harzianum* til biologisk bekæmpelse kan øge eksponeringen via luften under udbringning og ved opblanding af midlet i vand. Krav om forebyggende tiltag for at reducere eksponeringen i form af personlige værnemidler bør overvejes af de relevante myndigheder. I dagene efter udbringning var eksponeringen via luft kun moderat forøget.

I gartnerier, der ikke anvendte mikrobiologisk bekæmpelse, blev *Bacillus thuringiensis* og *Trichoderma* spp. kun sjældent fundet i luften, mens *L. lecanii* slet ikke blev fundet. *B. bassiana* blev sjældent fundet (i luften i agurkevæksthuse samt fra overflader af bladselleri og broccoli).

Bacillus cereus (kan være sygdomsfremkaldende og en nær slægtning til *B. thuringiensis*) blev fundet på grønsager fra alle de undersøgte gartnerier. På agurk og på broccoli, hvor der ikke var anvendt *Bacillus thuringiensis*, var koncentrationerne ganske lave. På bladselleri, broccoli og hvidkål, hvor *Bacillus thuringiensis* var blevet anvendt, var koncentrationerne derimod høje. I et tomatgartneri, hvor der blev anvendt *Bacillus thuringiensis*, blev der fundet meget lave koncentrationer af denne bakterie på tomaterne. Den potentielle eksponering for *Bacillus thuringiensis* igennem konsum af grønsager behandlet med *Bacillus thuringiensis* kan således være høj for broccoli, bladselleri og hvidkål og lav for tomat.

Undersøgelse gav et grundigt mål for baggrundseksponering for luftbårne svampe, bakterier, endotoksin og støv i grønsagsgartnerier. Arbejdsopgaver, som kan give for høje eksponeringer, blev identificeret. Svaret på spørgsmål 1 er, at der kunne måles en øget eksponering overfor mikroorganismene under udbringningsaktiviteten. Svar på spørgsmål 2: Denne eksponering kan udgøre en potentiel sundhedsmæssig risiko, hvorfor de relevante myndigheder bør overveje at anbefale personlig beskyttelse ved udbringning. Mht spørgsmål 3 blev den samlede koncentration af mikroorganismer ikke påvirket væsentligt af den udbragte biologiske bekæmpelse.

Projekresultater

Svampe

Trichoderma

I projektet har vi udviklet en molekylærbiologisk metode til specifik genkendelse af den stamme af *Trichoderma harzianum*, der indgår i bekæmpelsesmidlet Supresivit. I luftprøver blev *Trichoderma* spp. fundet i fire gartnerier, hvoraf tre var fra gartnerier, hvor *Trichoderma* spp. ikke var blevet anvendt. Her blev *Trichoderma* spp. fundet ved nedtagning af agurk, ved høst af hvidkål og broccoli samt ved pakning af broccoli. Det fjerde sted var et væksthusegartneri, hvor Supresivit blev anvendt. Her blev den specifikke stamme af *Trichoderma 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.

I et frilandsgartneri hvor *Trichoderma harzianum* og *Trichoderma polysporum* blev udbragt ved hjælp af bier blev *Trichoderma* ikke fundet i luften.

Beauveria og *Lecanicillium*

Der blev ikke anvendt produkter baseret på *Beauveria bassiana* og *Lecanicillium lecanii* i de undersøgte gartnerierne. Baggrundseksponeringen for *Beauveria bassiana* var lav, og svampen blev kun fundet i luften i agurkegartnerier. *Lecanicillium lecanii* blev slet ikke fundet.

De fundne *Beauveria bassiana* isolater var morfologisk ens, men viste sig ved karakterisering vha. DNA-sekvenser at tilhøre forskellige genetiske grupper. Nogle isolater var genetisk set identiske med en stamme, som anvendes til biologisk bekæmpelse, selvom midlet med denne stamme ikke havde været anvendt. Denne genetiske gruppe kan derfor findes naturligt i danske gartnerier

Bakterier

Bacillus

Baggrundseksponering overfor *Bacillus thuringiensis* forekom kun sjældent via luft og kunne kun dokumenteres i tomatvæksthuse. Eksponering for *Bacillus thuringiensis* var væsentlig højere under udbringning af et middel (Dipel). Således kunne eksponeringen under udbringning være på niveau med koncentrationen af det samlede antal af andre bakterier. Personer, der arbejder i gartnerier, er på dagen for udbringning af *Bacillus thuringiensis* ofte eksponeret for denne bakterie, men i lave koncentrationer. Personer, der arbejder i gartnerier efter udbringning af *Bacillus thuringiensis*, kan være moderat eksponeret overfor bakterien flere uger efter udbringningen.

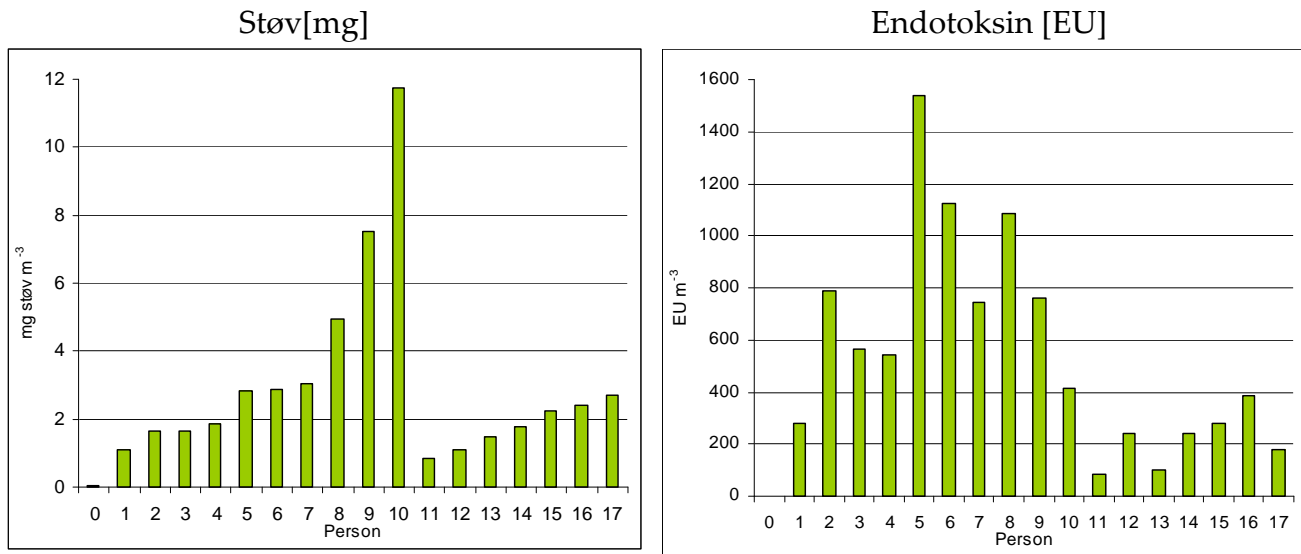
Der blev fundet *Bacillus cereus*-lignende bakteriesporer på grønsager fra alle de undersøgte gartnerier. På agurk og på broccoli, hvor der ikke var anvendt Dipel, blev *Bacillus cereus*-lignende bakteriesporer fundet på 20-67 % af grønsagerne, men i lave koncentrationer. På bladselleri og broccoli, som var blevet sprøjtet med Dipel, var koncentrationerne derimod høje, på broccoli cirka 20.000 sporer pr. g¹ og på bladsellerien 7.600 sporer pr. g¹ tre-fire uger efter sprøjtningen. På hvidkål blev skæbnen af *B. thuringiensis* fulgt gennem 9 uger efter sprøjtning. Koncentrationen faldt kraftigt indenfor den første uge og var derefter relativt konstant på et niveau imellem 100 og 1.000 sporer g⁻¹. I et tomatgartneri, hvor der blev anvendt begrænsede mængder af Dipel, blev der kun fundet lave koncentrationer af *Bacillus cereus*-lignende bakterier på tomaterne.

Streptomyces

Et produkt med *Streptomyces griseoviridis* blev anvendt i ét gartneri. Produktet var i pulverform i små breve, hvis indhold blev blandet i vandingsvand. Der blev ikke fundet eksponering for denne mikroorganisme under iblanding og heller ikke i de efterfølgende dage og uger.

Andre aerosol komponenter

Personer, der arbejdede i agurkegartnerier, kunne være eksponeret for højere koncentrationer af støv, endotoksin og skimmelsvampe end grænseværdier og foreslået grænseværdier på grund af de naturligt forekommende mikroorganismer. Eksponeringen var ofte højere for ansatte i tomatgartnerier end ansatte i kål- og jordbærgartnerier. Figur 3 viser eksempler på eksponering for støv og endotoksin for i alt 17 personer, som arbejdede i to forskellige agurkegartnerier. Der var stor forskel i eksponeringen i de to gartnerier (person 1-10 versus person 11-17) og mellem de enkelte personer inden for et gartneri. Flere personer i det ene gartneri var eksponeret for mere støv end arbejdstilsynets grænseværdi på 3 mg organisk støv pr. m³ luft. Den præcise grund til forskellene mellem de to gartnerier kender vi ikke, og det vil det være særdeles relevant med mere omfattende undersøgelser af dette fulgt op af tiltag til reduktion af eksponering.



Figur 3. Eksempler på individuel eksponering for støv og endotoksin i to agurkegartnerier. Person 1-10 arbejdede i gartneri 1 og person 11-17 i gartneri 2. Person 1 bandt snore op. Person 2-6 og 8 arbejdede med plukning. Person 7, 9, 10 og 13 arbejdede med plukning og beskæring. Person 11, 14 og 15 plukkede og pakkede agurker. Person 16 beskar og person 17 beskar og pakkede. Person 12 pakkede og vandede. 0 angiver et udendørs referencemål.

I 2008 målte vi eksponering overfor skimmelsvampe i et tomatgartneri fire gange fra vinter til sommer. Koncentrationsniveauet var i starten (ved pasning af mindre planter) på niveau med niveauet på friland. I løbet af foråret øgedes koncentrationen imidlertid og ved høstmålingen i maj var koncentrationen nået op på omkring 1 million sporer m⁻³.

I gangarealer i tomat- og agurkegartnerier var der lave koncentrationer af luftbåren støv og mikroorganismer, dvs. at personer ikke bliver eksponeret i nævneværdigt omfang ved blot at gå gennem væksthushuset.

Andre kilder

Dele af undersøgelsens resultater er publiceret (1-5):

1. A.M. Madsen, V.M.Hansen, S.H.Nielsen, and T.T.Olsen. "Exposure to dust and endotoxin of employees in cucumber and tomato nurseries." *Annals of Occupational Hygiene* 53,(2009):129-38.
2. A.M. Madsen, V.M.Hansen, N.V.Meyling, and J.Eilenberg. "Human exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 14,(2007):5-24.
3. V.M. Hansen, J.Eilenberg, and A.M.Madsen. "Occupational exposure to airborne *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD1 and other bacteria in greenhouses and vegetable fields." *Biocontrol Science and Technology* 20,(2010):605-19.
4. V.M. Hansen, A.Winding, and A.M.Madsen. "Exposure to bioaerosols during the growth season in an organic greenhouse tomato production using Supresivit® (*Trichoderma harzianum*) and Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis*)." *Applied and Environmental Microbiology* accepted June 2010,(2010).
5. V.M. Hansen, J. Eilenberg; A.M. Madsen. Occupational exposure to airborne *B. thuringiensis* in environments treated with Dipel. *IOBC/WPRS Bulletin* 45 (2010) 179-180.