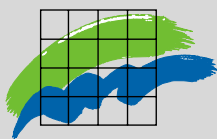


Arbejdsrapport fra DMU nr. 128

**Første danske workshop om
Bacillus thuringiensis
28. - 29. marts 2000**

Niels Bohse Hendriksen &
Bjarne Munk Hansen (red.)



Miljø- og Energiministeriet, Danmarks Miljøundersøgelser

Datablad

Titel:	Første danske workshop om <i>Bacillus thuringiensis</i> 28. - 29. marts 2000
Redaktører: Afdeling:	Niels Bohse Henriksen og Bjarne Munk Hansen Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi
Serietitel og nummer:	Arbejdsrapport fra DMU nr. 128
Udgiver:	Miljø- og Energiministeriet Danmarks Miljøundersøgelser©
URL:	http://www.dmu.dk
Udgivelsestidspunkt:	Maj 2000
Faglig kommentering:	Anne Winding
Bedes citeret:	Hendriksen, N.B. & Hansen B.M. (red.) (2000): Første danske workshop om <i>Bacillus thuringiensis</i> . Danmarks Miljøundersøgelser. 28 s. - Arbejdsrapport fra DMU nr. 128. Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse.
Sammenfatning:	Rapporten indeholder program, deltagerliste og abstracts fra de 14 mundtlige indlæg afholdt på workshoppen. Endvidere omtales dannelsen af et "Dansk Center for <i>Bacillus thuringiensis</i> ", som blev etableret på workshoppen.
Emneord:	Workshop, <i>Bacillus thuringiensis</i> , Dansk Center for <i>Bacillus thuringiensis</i>
Redaktionen afsluttet:	Maj 2000
ISSN (elektronisk):	1399-9346
Tryk:	Rapporten findes kun som PDF-fil på DMU's hjemmeside: www.dmu.dk under ▶ DMU stiller sin viden til rådighed Publikationer ▶ Arbejdsrapporter.
Sideantal:	28
Udgivet af:	Danmarks Miljøundersøgelser Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi Frederiksborgvej 399 DK-4000 Roskilde Tlf.: 46 30 12 00 Fax: 46 30 11 14 E-mail: dmu@dmu.dk

Første danske workshop om *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis anvendes som plantebeskyttelsesmiddel til bekæmpelse af forskellige insekter. Desuden indsættes generne, som koder for insekttoksinerne ved gensplejsning i planter for at gøre dem insektresistente. Det betyder, at *B. thuringiensis* og gener fra den indgår i en række produkter, der allerede markedsføres, eller som vil blive markedsført i Danmark. Skov- og Naturstyrelsen er ansvarlige for, at disse markedsføringer sker på et grundlag, der sikrer sundheden og miljøet.

Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi, indbød derfor i samarbejde med Skov- og Naturstyrelsen til en todages workshop om *B. thuringiensis* i dagene 28.-29. marts 2000 på Roskilde Højskole.

Formålet med workshoppen var:

- at præsentere og diskutere den igangværende forskning i Danmark vedrørende *B. thuringiensis*
- at diskutere dannelse af et "Dansk Center for *Bacillus thuringiensis*".

Indholdsmæssigt beskæftigede workshoppen sig med områder relateret til:

- *B. thuringiensis* og miljøet
- *B. thuringiensis* og sundheden
- *B. thuringiensis* og arbejdsmiljøet

Der blev inddraget viden om *Bacillus cereus*, da denne bakterie kun kan skelnes fra *B. thuringiensis* ved dennes plasmidbundne evne til produktion af insekttoksiner.

Denne publikation indeholder abstracts fra de 14 forskellige mundtlige indlæg, der blev holdt på workshoppen.

På workshoppen var der en generel tilslutning til, at der blev etableret et Dansk Center for *Bacillus thuringiensis*, som skulle være åbent for personer, som arbejder med *B. thuringiensis* og beslægtede bakterier.

Det blev besluttet at afholde den anden danske workshop om *Bacillus thuringiensis* om 2 år, det vil sige i foråret 2002. Niels Bohse Hendriksen, DMU, lovede at være hovedarrangør af dette arrangement.

Det blev besluttet at oprette en hjemmeside for "Dansk Center for *Bacillus thuringiensis*", placeret på Arbejds miljøinstituttets server. Det blev desuden besluttet at etablere en E-mail gruppe med deltagere i centret. Med henblik på dette blev der nedsat en redaktionsgruppe bestående af Jørgen Eilenberg, KVL; Bodil Lund Jacobsen, VFD; Gert B. Jensen, AMI; Bjarne Munk Hansen, DMU.

Hjemmesiden er nu blevet oprettet og kan findes på adressen: <http://www.ami.dk/btcenter>.

Henvendelser til “**Dansk Center for *Bacillus thuringiensis***” kan ske til:

Seniorforsker
Niels Bohse Hendriksen
Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi
Danmarks Miljøundersøgelser
Postboks 358
Frederiksborgvej 399
4000 Roskilde

Tlf.: 46301372
Fax: 46301216
E-mail:nbh@dmu.dk

Første danske workshop om *Bacillus thuringiensis*

PROGRAM

Tirsdag den 28. marts 2000

- Kl. 10.00 – 10.30 Ankomst og kaffe
- Kl. 10.30 – 11.30 Velkomst og præsentation
- Kl. 11.30 – 12.10 Risikovurdering af *B. thuringiensis*
Niels Bohse Hendriksen & Bjarne Munk Hansen,
Danmarks Miljøundersøgelser
- Kl. 12.10 – 12.30 Anvendelse af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i Danmark
Anita F. Pedersen, Skov- og Naturstyrelsen
- Kl. 12.30 – 13.30 Frokost
- Kl. 13.30 – 14.00 Virulens faktorer hos *B. thuringiensis*
Bjarne Munk Hansen & Niels Bohse Hendriksen,
Danmarks Miljøundersøgelser
- Kl. 14.00 – 14.30 Patogenecitet hos *B. cereus*
Helle D. Larsen, Statens Veterinære Serumlaboratorium
- Kl. 14.30 – 15.00 Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i gartnerier – en mulig sundhedsrisiko
Preben Larsen & Jesper Bælum, Odense Universitetshospital
- Kl. 15.00 – 15.30 Karakterisering af *B. cereus*-lignende isolater fra fæcesprøver fra gartneriarbejdere, der anvender biologiske bekæmpelsesmidler
Lars Andrup, Arbejds miljøinstituttet, Bodil L. Jakobsen, FDIR & Preben Larsen, AMK, Odense
- Kl. 15.30 – 16.00 Kaffe
- Kl. 16.00 – 16.30 rRNA indholdet under spiring, fremvækst og eksponentiel vækst i *Bacillus cereus* UW85
Klaus Skaalum Lassen & Svend Binnerup, Danmarks Miljøundersøgelser
- Kl. 16.30 – 17.00 Konjugative plasmider hos *B. thuringiensis* – noter fra en voyeur's dagbog
Gert B. Jensen, Andrea Wilcks, Lasse Schmidt & Lars Andrup,
Arbejds miljøinstituttet
- Kl. 17.00 – 17.30 Spredning af antibiotika resistens som resultat af udbringelse af husdyraffald
Lars Bogø Jensen & Yvonne Agersø, Statens Veterinære Serumlaboratorium

- Kl. 17.30 – 18.00 *B. thuringiensis* planter og fødekæde effekter
Christian Kjær, Danmarks Miljøundersøgelser
- Kl. 18.00 – 18.15 ”Dansk Center for *Bacillus thuringiensis*”
Ide og indhold. Et diskussionsoplæg
Niels Bohse Hendriksen & Bjarne Munk Hansen
- Kl. 18.30 – Middag

Onsdag den 29. marts 2000

- Kl. 8.00 – 9.00 Morgenmad
- Kl. 9.00 – 9.30 *Bacillus spp.*: Naturlige insektpatogener
Jørgen Eilenberg, Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole
- Kl. 9.30 – 10.00 *B. thuringiensis* skæbne efter anvendelse i en kålmark
*Niels Bohse Hendriksen & Bjarne Munk Hansen, Danmarks
Miljøundersøgelser*
- Kl. 10.00 – 10.30 Anvendelse af *B. thuringiensis* i dansk skovbrug – erfaringer og muligheder
Susanne Harding, Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole
- Kl. 10.30 – 11.00 Naturlig forekomst af *B. thuringiensis* i Litauiske skove
*Lene Thomsen, Jørgen Eilenberg & Susanne Harding,
Den Kongelige og Veterinær og Landbohøjskole*
- Kl. 11.00 – 11.15 Kaffe & te
- Kl. 11.15 – 12.30 Diskussion af dannelse af ”Dansk Center for *Bacillus thuringiensis*”
- Kl. 12.30 – Frokost

DELTAGERE PÅ FØRSTE DANSKE WORKSHOP OM *B. THURINGIENSIS*

Jørgen Eilenberg, Susanne Harding Lene Thomsen	Institut for Økologi, KVL, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C
Lars Bogø Jensen Helle D. Larsen	Statens Veterinære Serumlaboratorium, Bülowsvej 27, 1790 København V
Lars Andrup Gert B. Jensen	Arbejds miljøinstituttet, Lersø Parkallé 105, 2100 København Ø
Jesper Bælum Preben Larsen	Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense Universitetshospital, 5000 Odense C
Bodil Lund Jacobsen Hanne Rosenquist	Fødevarer direktoratet, Afdeling for Mikrobiologisk Sikkerhed, Mørkhøj Bygade 19, 2860 Søborg
Gitte Silberg Poulsen Anita F. Pedersen	Skov- og Naturstyrelsen, Kontoret for Landbrug og Bioteknologi, Haraldsgade 53, 2100 København Ø
Tove Steenberg	Statens Skadedyrslaboratorium, Skovbrynet 14, 2800 Lyngby
Hans Peter Ravn	Forskningscentret for Skov og Landskab, Hørsholm Kongevej 11, 2970 Hørsholm
Christian Kjær	Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Terrestrisk Økologi, Vejlsøvej 25, 8600 Silkeborg
Jens C. Pedersen	Danmarks Miljøundersøgelser, Forsknings og Udviklingssekretariatet, Frederiksborgvej 399, 4000 Roskilde
Poul Erik Høiby Klaus Skaalum Lassen Bjarne Munk Hansen Niels Bohse Hendriksen	Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi, Frederiksborgvej 399, 4000 Roskilde

RISIKOVURDERING AF BACILLUS THURINGIENSIS

Niels Bohse Hendriksen & Bjarne Munk Hansen

*Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi, Frederiksborgvej
399, 4000 Roskilde.*

E-mail: nbh@dmu.dk & bmh@dmu.dk

Brugen af mikrobiologiske plantebeskyttelses produkter er reguleret ifølge ”Lov om kemiske stoffer og produkter”. Det er Skov- og Naturstyrelsen med bistand fra en række forskellige myndigheder, der står for administration af loven. Danmarks Miljøundersøgelser bistår i forbindelse med den miljømæssige risikovurdering. Procedurene der anvendes i forbindelse med godkendelse af produkter vil blive beskrevet og principperne for risikovurdering diskuteret.

Diskussionen af risikovurdering vil blive eksemplificeret ved hjælp af *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*; en bakterie der anvendes til kontrol af sommerfugle larver. Denne diskussion vil tage udgangspunkt i den nyeste viden angående bakteriens systematiske stilling, effekter på ikke-target

STATUS FOR GODKENDELSE AF MIKROBIOLOGISKE PLANTEBESKYTTELSESMIDLER

Organismer, effekter for menneskets sundhed og dens overlevelse og aktivitet i naturen

Anita Fjelsted Pedersen

Skov- og Naturstyrelsen, Landbrugs- og Bioteknologikontoret, Haraldsgade 53,
2100 København Ø
E-mail: afp@sns.dk

Landbrugs- og Bioteknologikontoret i Skov- og Naturstyrelsen blev oprettet d. 1. marts 1999 hvormed bl.a. forvaltningen af de mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler blev overflyttet fra Miljøstyrelsen.

I 1991 blev *Direktiv om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler* - Direktiv 91/414/EØF vedtaget. Da direktivet trådte i kraft 26. juli 1993, var der allerede en lang række mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler på det markedet i EU-landene, indeholdende de såkaldte gamle organismer (se tabel 1). Disse blev omfattet af en overgangsordning, som indebar, at producenter eller forhandlere skulle indsende en ansøgning om godkendelse i løbet af et år, dvs. inden 26. juli 1994, for fortsat at kunne markedsføre produkterne. De aktive organismer skulle dernæst vurderes i EU med henblik på godkendelse og optagelse på direktivets bilag 1. Ingen af disse organismer er endnu vurderet og dermed ej heller optaget på bilag 1, bl.a. fordi man har valgt at prioritere en vurdering af de kemiske aktiv stoffer.

Da det tilsyneladende vil vare adskillige år før de gamle organismer bliver vurderet i EU, er vi nu i Danmark påbegyndt en national vurdering af disse organismer og midler. Af tabel 1 fremgår det hvor langt arbejdet er nået.

Efter direktivets trådte i kræft er der fremsendt 7 ansøgninger om optagelse af nye organismer på bilag 1 (se tabel 2), hvoraf ingen endnu er optaget på bilaget. Ansøgningerne vurderes af myndighederne i samtlige medlemslande samt af eksperter udvalgt af Kommissionen. For flere af disse organismer er der fremsendt ansøgning om provisorisk godkendelse i Danmark. Så snart myndigheden i ansøgerlandet har udarbejdet og fremsendt en monografi (risikovurdering) for organismen kan Skov- og Naturstyrelsen påbegynde en vurdering af organismen med henblik på provisorisk godkendelse i op til 3 år. Ingen af de nye organismer er endnu blevet provisorisk godkendt til det danske marked, men afgørelser for flere organismer forventes af foreligge i løbet af 2000.

Tabel 1. Oversigt over de mikroorganismer der var på markedet i Danmark før 26. juli 1993 og som må markedsføres i dag i kraft af overgangsordningen vedtaget i direktivet (91/414/EØF). En national vurdering af tre af organismerne er påbegyndt og to andre forventes påbegyndt i løbet af 2000.

Aktive organisme	Produktnavn	Vurderingen påbegyndt	Vurderingen forventes afsluttet
<i>Bacillus thuringiensis</i> (IN)	Vectobac, Dipel, Bactimos, m.fl.	2000	?
<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>T. polysporium</i> (FU)	Supresivit, Binab T, BioFungus, Trichodex, Trichoflow, m.fl.	2000	?
<i>Verticillium lecanii</i> (IN)	Mycotal, Vertalec	Efterår 1999	2000
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (FU)	Rotstop	Efterår 1999	2000
<i>Streptomyces griseovirides</i> (FU)	Mycostop	Efterår 1999	2000
<i>Beauveria bassiana</i> (IN)	BotaniGard		
<i>Agrotis segetum granulosis virus</i> (IN)	Agrovir		

Tabel 2. Oversigt over de 7 nye mikroorganismer hvortil der er søgt om optagelse på direktivets bilag 1, samt en angivelse af hvor langt arbejdet er nået i EU

Aktive organisme	Produkt-navn	Monografi modtaget	Peer review møde afholdt	2 evaluerings-møder er afholdt	Provisorisk godkendelse givet (søgt) i andre EU lande
FU=fungicid IN=insekticid					
<i>Pseudomonas chloroaphis</i> (bakt, FU)	Cedem on	+	+	+	FIN, (I)
<i>Ampelomyces quisqualis</i> (svamp, FU)	AQ10	+	+	+	I
<i>Paecilomyces fumisoroseus</i> (svamp, IN)	Preferal	+	+	+	B, S
<i>Coniothyrium minitans</i> (svamp, FU)	Contans	+			D, (B)
<i>Gliocladium catenulatum</i> (svamp, FU)	Prestop				(FIN)
<i>Spodoptera exigua NPV</i> . (IN)	Spod-X	+			(NL)
Zucchini Yellow Mosaic Virus	-				(UK)

VIRULENS FAKTORER HOS *BACILLUS THURINGIENSIS*

Bjarne Munk Hansen & Niels Bohse Hendriksen

Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi, Danmarks Miljøundersøgelser, Frederiksborgvej 399, 4000 Roskilde.

E-mail: bmh@dmu.dk; nbh@dmu.dk

Bacillus thuringiensis anvendes i vid udstrækning som mikrobielt bekæmpelsesmiddel til bekæmpelse af visse insekter, idet der under sporulering uden for sporerne dannes protein krystaller indeholdende insekt toksiske pro-toksiner. Bortset fra evnen til at danne disse protein krystaller, som er plasmid kodede, er der generelt hverken genotypiske eller fænotypiske forskelle på *B. thuringiensis* og *B. cereus*. Nogle *B. cereus* isolater vides dels at kunne forårsage diarré og opkastninger hos mennesker, dels at kunne forårsage somatiske infektioner.

Disse patogene egenskaber hos *B. cereus* skyldes en række virulens faktorer som dannes i den vegetative vækstfase. Et stigende antal rapporter viser, at der reelt ikke er forskel på *B. thuringiensis* og *B. cereus*, og at virulens faktorerne er ens hos de to grupper af bakterier. På trods af, at der bruges store mængder *B. thuringiensis* til insektbekæmpelse, kendes der dog kun få tilfælde hvor *B. thuringiensis* har været involveret i sygdom hos mennesker. Dette kan skyldes, at der reelt ikke findes sådanne tilfælde eller, at sådanne tilfælde bliver diagnosticeret som *B. cereus* infektioner. Selv om der er stor ensartethed indenfor *B. thuringiensis* og *B. cereus* findes der stor variation i aktiviteten af virulens funktionerne, sandsynligvis grundet forskelle i primærstruktur og ekspression af generne.

Kliniske *B. cereus* isolater har generelt en tendens til at være mere toksiske end isolater fra miljøet. Imidlertid har nogle af disse virulens funktioner også betydning for effektiviteten som mikrobielle bekæmpelsesmidler, således at man kan forvente at isolater med meget lav virulens også vil være uanvendelige til insektbekæmpelse.

Nye undersøgelser viser dog, at nogle af de *B. thuringiensis* isolater som anvendes i kommercielle produkter udviser lavere toksicitet end et klinisk *B. cereus* isolat. Under alle omstændigheder bør der ved udbringning af *B. thuringiensis* anvendes personlige værnemidler. Yderligere vil håndhævelse af en vis sprøjtefrist på fødevarer sandsynligvis reducere en eventuel risiko markant, idet hidtidige undersøgelser viser at antallet af *B. thuringiensis* udsprøjtet på plantedele hurtigt reduceres. Endelig bør en vurdering af risiko ved anvendelse af *B. thuringiensis* også sammenlignes

med risici ved andre insekt bekæmpelsesmetoder både med hensyn til sundhed, miljøforhold, økonomiske og sociale forhold.

PATOGENICITET HOS *BACILLUS CEREUS*.

Helle D. Jensen

Statens Veterinære Serumlaboratorium, Bülowsvej 27, 1790 København V.

E-mail: hdl@svs.dk

Levnedsmiddelbåret diarresyndrom.

Diarresyndromet kan opstå ved indtagelse af et stort antal enterotoxinproducerende *Bacillus cereus*. De fleste tilfælde af *B. cereus*-diarresygdom, har været forårsaget af varmebehandlede levnedsmidler, hvor sporer har overlevet, germineret, og kunnet gro i den efterfølgende afkølings- og opbevaringsfase.

Den minimale infektive dosis der er rapporteret, er ca. 10^3 colony forming units (CFU)/gram levnedsmiddel. Men i de fleste tilfælde har *B. cereus* været til stede i betydelig større mængder. Ofte i størrelsesordenen 10^8 CFU/gram.

Efter indtagelse af det kontaminerede og fejlbevarede levnedsmiddel, producerer *B. cereus* enterotoxin i tarmen, hvorved sygdom opstår. Enterotoxinerne er cytolytiske, og ødelæggelse af tarmepithelet forårsager udskillelse af salte og vand fra tarmvæggen, hvorved man får diarré. Enterotoxinet agerer lokalt på tarmslimhinden. Hverken toxin eller agens optages via tarmslimhinden.

Et typisk forløb vil begynde 8 til 16 timer efter indtagelse af levnedsmidlet, og strække sig over et til to døgn. De typiske symptomer er voldsom vandig diarré. Der udvikler sig sjældent komplikationer.

Der findes minimum to enterotoxinkomplekser: Det hæmolytiske (HBL) og det non-hæmolytiske (NHE). I begge tilfælde er der tale om tre proteiner. Biologisk effekt af enterotoxinet er betinget af tilstedeværelse af alle tre komponenter, men det vides endnu ikke hvordan de tre faktorer fungerer sammen.

I nogle få tilfælde er der forekommet meget akutte tilfælde, med blodig diarré og i nogle tilfælde med dødelig udgang. De nyeste endnu ikke publicerede resultater indikerer, at disse tilfælde er forårsaget af et toxin, med en helt anderledes struktur og sammensætning end de kendte enterotoxiner.

Levnedsmiddelbåret emetisk syndrom.

Det emetiske syndrom er en egentlig levnedsmiddelforgiftning, hvor den emetiske faktor dannes i levnedsmidlet inden indtagelse. Den emetiske faktor (cereulide) er et såkaldt dodecadepsipeptid, som er en cyklisk struktur, der består af en kæde af fire forskellige aminosyrer, der repeteres tre gange, i alt 12 aminosyrer.

Symptomerne, kvalme, opkastninger og svimmelhed opstår fra en halv time til ca. seks timer efter indtagelse af levnedsmidlet, og varer oftest ikke længere end et døgn.

Enkelte rapporterede tilfælde har dog vist, at den emetiske faktor i særlig høje doser er så levertoksisk, at følgerne kan blive fatale.

Det genetiske grundlag for dannelse af den emetiske faktor kendes ikke, og det vides ikke om det kun kan dannes i bestemte levnedsmidler, f.eks. ris.

Sårinfektioner m.m.

Sårinfektioner med *B. cereus* er hyppigt blevet beskrevet. Især brandsår og operationsår. Disse infektioner forekommer oftest hos immunosuppressive patienter.

Sygdom hos dyr og mennesker.

B. cereus-forårsaget sygdom hos dyr kan også forekomme. Hos kvæg kan *B. cereus* forårsage mastitis og abort. Infektioner hos kameler og heste er også beskrevet. Diarrésyndromet er også en enkelt gang blevet beskrevet hos hund.

MIKROBIOLOGISKE BEKÆMPELSMIDLER I GARTNERIER

- EN MULIG SUNDHEDSRISIKO?

Preben Larsen & Jesper Bælum
Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odensen Universitetshospital, 5000 Odense C.
E-mail: preben.larsen@dadlnet.dk

Ved indførelse af en ny teknik, er det væsentligt at sikre sig, at den anvendes bedst muligt også med hensyn til eventuel påvirkning af arbejdsmiljøet.

Formål:

Vurdering af risiko for udvikling af Type I allergi og inflammatoriske lungelidelser i forbindelse med erhvervsmæssig udsættelse for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (*MB*). Samtidig ønskes risikofaktorer i arbejdet og hos personen for sensibilisering og udvikling af sygdom karakteriseret.

Baggrund:

Kemiske bekæmpelsesmidler forsøges i stigende grad erstattet med mere økologisk venlige midler for at bekæmpe skadevoldere. På flere gartnerier er man i løbet af de senere år begyndt at anvende forskellige biologiske bekæmpelsesmidler (skimmelsvampe og bakterier). Man kender fra industrier, arbejde på komposteringsanlæg og fra landbrug, hvor der har været udsættelse for mikroorganismer enten som fermenter eller som forurening, en lang række luftvejssygdomme, som er knyttet til udsættelse for mikroorganismer og deres omsætningsprodukter. Desuden ved vi, at mange mennesker udvikler Type I allergi overfor visse mikroorganismer som findes i naturen, men forhold for gartneriansatte er ikke belyst.

Hypotese:

Erhvervsmæssig udsættelse for *MB* give risiko for udvikling af Type 1 allergi og astma. Risikoen øges med intensitet og varighed af eksponering. Personer med atopi har øget risiko for Type 1 allergi og astma ved udsættelse for *MB*.

Materiale:

Kohorten er dannet ved, at gartnerier på Fyn blev kontaktet ud fra oplysninger af deres brug af de *MB*, således at der dannedes en passende fordeling af personer eksponeret for følgende tre typer mikrobiologiske bekæmpelsesmidler: *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum* og *Verticillium lecanii* og en gruppe uden eksponering. Der deltager ansatte fra 32 gartnerier. Disse gartnerier dyrker altovervejende pryddplanter. Målet er mindst to års follow up af 450 personer.

Metode:

En 3 års follow up kohorte-undersøgelse med følgende registreringer ved årlige undersøgelser:

Spørgeskema/interview a) arbejdsforholdskema, b) selvadministrerede skemaer om arbejds- og helbredsforhold (3. og 6. og 9. måned i hvert undersøgelses år), c) strukturerede interview om helbredsforhold.

Lungefunktionsundersøgelser forceret ekspiratorisk volumen i første sekund (FEV-1) samt forceret vitalkapacitet (FVC). Der foretages bronkial provokation med histaminklorid til bestemmelse af PD20.

Allergiudredning. Blodprøver tages med henblik på total IgE-bestemmelse og specifik IgE samt til histaminfrigørelse (HR-test) overfor 8 produkter. Hudpriktest (standard panel) udføres m.h.p. evt. Atopi, endvidere priktest med to *MB*.

Peakflowmonitorering af de fra kohorten, der ved spørgeskema svarer bekræftende på nytilkomne symptomer fra luftveje tydende på astma, samtidig registreres arbejdsforhold, symptomer og eventuelt medicinforbrug

KARAKTERISERING AF *B. CEREUS*-LIGNENDE ISOLATER FRA FÆCESPRØVER FRA GARTNERIARBEJDERE DER ANVENDER BIOLOGISKE BEKÆMPELSMIDLER

Lars Andrup¹, Bodil L. Jacobsen² og Preben Larsen³

¹Arbejds miljøinstituttet, Lersø Parkallé 105, 2100 København Ø. ²Fødevarer direktoratet, Afdeling for Mikrobiologisk Sikkerhed, Mørkhøjvej Bygade 19, 2860 Søborg. ³Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense Universitetshospital, 5000 Odense C.

E-mail: la@ami.dk

Formålet med dette studium var, at undersøge fæcesprøver fra *B. thuringiensis*-biopesticid-eksponerede og ikke eksponerede for at undersøge i hvilket omfang det er muligt at finde bakterier af *B. cereus*-gruppen i fæcesprøver fra gartneriarbejdere. Endvidere var det ambitionen at karakterisere eventuelle isolater mht 1) toxonomi, herunder slægtskab med de anvendte kommercielle *B. thuringiensis*-stammer, 2) indhold af gener for insekttoksiner og tilstedeværelse af intracellulære krystaller, 3) indhold af enterotoksin-gener og eventuel produktion af enterotoksin.

Der blev optimeret en metode til at isolere *B. cereus*-lignende bakteriestammer fra human fæces, samt molekylærbiologiske teknikker til at identificere og karakterisere disse. Samlet blev der indsamlet prøver fra 7 eksponerede og 5 ikke eksponerede væksthusearbejdere. To af prøverne indeholdt *B. cereus*-lignende bakterier (begge fra den *B. thuringiensis*-eksponerede gruppe), og herfra blev der i alt udvalgt 24 isolater til nærmere karakterisering. I et af isolaterne (902-6) viste mikroskopiske analyser entydigt intracellulære inklusioner, karakteristiske for *B. thuringiensis*. Den molekylærbiologiske karakterisering viste at dette isolat, med meget stor sandsynlighed, er identisk med den bakterie (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1) man kan isolere, som den aktive ingrediens, fra det kommercielle insekticid Dipel[®]. Endvidere kunne vi på baggrund af RAPD ("DNA-fingeraftryk") inddele isolaterne i 3 grupper af *meget beslægtede* isolater - en gruppe, bestående af 19 isolater, kom fra samme fæcesprøve. Alle isolaterne blev analyseret for tilstedeværelsen af gener som koder for insekttoksiner (vha PCR). Kun det førnævnte isolat (902-6) viste sig at indeholde insekttoksin-kodende gener.

Alle isolaterne blev endvidere undersøgt for tilstedeværelsen af generne for tre forskellige enterotoksiner, beskrevet som værende af betydning for *B. cereus*'s evne til at forårsage gastroenteritis. Alle isolaterne indeholdt mindst et af disse enterotoksin-gener og isolatet 902-6 indeholdt alle tre. Bakterier isoleret fra de tre kommercielle produkter Dipel[®], Bactimos[®] og Vectobac[®] indeholdt også generne for alle de undersøgte enterotoksiner. Tilstedeværelsen af enterotoksin-gener korrelerede med dannelsen af enterotoksin (detekteret vha. de kommercielle immunoassay-kits fra hhv Oxoid og Tecra).

På baggrund af dette, kan det konkluderes, at i hvert fald et isolat, identisk med den bakteriestamme, som anvendes i insektbekæmpelsesmidlet Dipel[®], er fundet i fæcesprøver fra en væksthusearbejder. Den person, som bar dette isolat havde arbejdet med *B. thuringiensis*-baserede biopesticider, men dog ikke med produktet Dipel[®]. Isolatet har med stor sandsynlighed evnen til at forårsage maveproblemer, men antagelig kun, hvis det indtages i høje koncentrationer. Endvidere må det anses for betænkeligt, at bakterierne som anvendes i de kommercielle insekticider tilsyneladende indeholder gener for enterotoksiner.

rRNA INDHOLDET UNDER SPIRING, FREMVÆKST OG EKSPONENTIEL VÆKST I BACILLUS CEREUS UW85

Klaus Skaalum Lassen & Svend Binnerup

*Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi, Frederiksborgvej
399, 4000 Roskilde*

E-mail: km.lassen@private.dk

Ribosom indholdet i bakterier er en interessant parameter, da det er tæt korreleret til disses aktivitet og livsstrategier. Ved hjælp af fluorescens in situ hybridisering og digital billedbehandling blev 16S rRNA koncentrationer under spiring og fremvækst af *B. cereus* UW85 på T3 medie estimeret. Under disse perioder blev der observeret store forskelle i 16S rRNA koncentrationen. 16S rRNA koncentrationen nåede lige omkring første celledeling (215 minutter efter inokulering) op på 2-3 gange koncentrationen i eksponentielt voksende celler i T3 mediet.

Korrelationen imellem 16S rRNA koncentration og vækstrate i *Bacillus cereus* UW85 under eksponentiel vækst blev undersøgt ved samme metode. Ved vækstforløb i batchkultur observerede vi lineær korrelationer imellem 16S rRNA koncentrationer og vækstrater. *B. cereus* UW85 rRNA koncentrationer var sammenlignelige med *B. thuringiensis* HD1 ved samme vækstrater, mens de var langt højere end *Pseudomonas fluorescens* R2f og *Athrobacter aurescens* C2. Yderligere undersøgelser af 16S rRNA niveauet i *B. cereus* UW85 viste, at *B. cereus* UW85 nedbrød 16S rRNA under eksponentiel vækst med en rate på 30 % per time.

De høje 16S rRNA koncentrationer i de to *Bacillus* arter indikerer at den vegetative livsfase hos de to undersøgte *Bacillus* arter er forbundet med højt energiforbrug. Fra et økologisk synspunkt er dette ikke overraskende, idet *Bacillus* endosporer kun spirer i næringsrige miljøer og når miljøet bliver ugunstigt vil de sporulerer. I sådan en situation vil et stort overskud af ribosomer øge *Bacillus* arters konkurrenceevne når der hurtigt skal responderes på ændringer i næringsstofadgangen.

KONJUGATIVE PLASMIDER I *BACILLUS THURINGIENSIS* – NOTER FRA EN VOYEUR'S DAGBOG

Gert B. Jensen, Andrea Wilcks, Lasse Schmidt & Lars Andrup
Arbejdsmiljøinstituttet, Lersø Parkallé 105, 2100 København Ø.
E-mail: gbj@ami.dk

Konjugation er en af de kendte naturlige mekanismer hvorved mikroorganismer udveksler genetisk materiale. Konjugation i bakterier er en paraseksuel proces, og kaldes derfor også bakteriel mating. Overførslen af DNA-molekyler sker fra en donor-celle til en recipient-celle i forbindelse med direkte celle-cellekontakt. DNA-overførslen foregår gennem en såkaldt "mating-bridge", og er således resistent overfor DNaser. Resultatet af en sådan mating benævnes en transkonjugant.

Naturlig konjugation formidles oftest af store (>25 kb) konjugative (selv-overførende) plasmider. Mange af disse plasmider kan, foruden at kode for deres egen overførsel, mobilisere mindre ikke-konjugative plasmider. Flere konjugative plasmider i *Bacillus thuringiensis* (Bt) er også fundet at besidde gener for insekticidal krystal toksiner, de såkaldte *cry*-gener. Tilstedeværelsen og udtrykkelsen af *cry*-gener i *B. thuringiensis* danner hele baggrunden for den kommercielle udnyttelse af disse mikroorganismer som biopesticider. Der er fundet et enkelt eksempel på at et firma har udnyttet et konjugativt plasmid til at lave nye transkonjuganter af Bt med forbedret ekspression af krystal-toksiner. Stammen var i dette tilfælde *Bt* subsp. *kurstaki* HD263.

På arbejdsmiljøinstituttet har vi studeret to konjugative plasmider fra *Bt*:

- pXO16 (200 kbp) fra *Bt*. subsp. *israelensis* og
- pAW63 (70 kbp) fra *Bt*. subsp. *kurstaki*.

Begge plasmider er karakteriseret ved deres høje overførselsaktivitet; samtlige recipientceller i intra-species matingforsøg har modtaget det konjugative plasmid efter kort tids mating. Begge plasmider er desuden i stand til at mobilisere, dvs. medtransportere mindre plasmider i forbindelse med en konjugation.

Plasmidet pXO16 er karakteristisk ved at mating i flydende substrat med donorer, der indeholder dette plasmid, danner synlige aggregater med recipientcellerne. Aggregaterne varierer i størrelse, men består typisk af flere tusinde enkeltceller. Kinetikstudier af overførslen viser dog, at én donor kun donerer pXO16 til én recipient ad gangen. Overførslen tager 3½-4 minutter, og donor-cellen kan efter en "hvileperiode" på 10 minutter genoptage donoraktiviteten. Endnu er konjugationsmekanismen ukendt, men det er muligt at et overfladeprotein (såkaldt S-layer protein) er involveret.

Plasmidet pAW63 er blevet karakteriseret og replikations-origin viser bemærkelsesværdig lighed med plasmidet pXO2 fra *Bacillus anthracis* (pXO2 er et af de to virulensplasmider fra denne bakterie). Også stor lighed til replikations-origin fra to andre konjugative plasmider er fundet; pIP501 (fra *Streptococcus agalactiae*) og pAMB1 (fra *Enterococcus faecalis*). Blandt andet af derfor henføres disse plasmider til den samme familie af plasmider, pAMB1-familien. En nomenklatur, der muligvis skal ses i lyset af et fælles genetisk ophav. Mating i flydende substrat viser ingen synlige aggregater, og mikroskopisk analyse viser at aggregaterne består af 2-10 celler.

Plasmiderne pXO16 og pAW63 er begge i stand til at mobilisere mindre, ikke-konjugative plasmider som f.eks. pBC16 (4,6 kbp). Plasmidet pAW63 kan kun mobilisere plasmider, der indeholder et funktionelt *mob*-gen (et gen, der koder for et mobiliseringsprotein, der ofte er nødvendigt i forbindelse med overførslen af mobiliserbare plasmider), idet forsøg med pBC16 Δ *mob* ikke kunne mobiliseres i matingforsøg. Plasmidet pXO16 er derimod i stand til at overføre både sig selv og andre mindre plasmider, incl. pBC16 Δ *mob*, og besidder således en hidtil uset overførselsmekanisme, der kan mobilisere mindre plasmider, der ikke selv besidder et funktionelt *mob*-gen.

SPREDNING AF ANTIBIOTIKA RESISTENS SOM RESULTAT AF UDBRINGELSE AF HUSDYRSAFFALD

Lars B. Jensen & Yvonne Agersø
Statens Veterinære Serumlaboratorium, Bülowsvej 27, 1790 København V.
E-mail: lje@svs.dk

I landbruget har man gennem en lang årrække brugt store mængder af antibiotika (både til terapi og som vækstfremmere). Ved forbrug af antibiotika selekteres for antibiotika resistens. Effekten af dette forbrug på forekomst af antibiotika resistente bakterier og resistensgener i miljøet undersøges i projektet Veterinær Miljøforskning på SVS.

Under naturlige forhold overlever antibiotika resistente bakterier fra gylle og andet affald fra husdyr formentligt sjældent ret længe. Indeholder bakterier antibiotika resistensgener, kan deres gener spredes til naturligt forekommende bakterier, således at resistensen ikke blot bliver opretholdt men også bliver forøget i miljøet, med en senere kontamination af markafgrøder eller vand som en mulighed. Herved vil antibiotika resistensgener muligvis kunne overføres til dyr eller mennesker.

For at karakterisere forekomst af antibiotika resistens i landbrugsjord blev der valgt at fokusere på to forskellige måder at detektere forekomsten af resistens:

1) Isolering af kendte jordbakterier og undersøge forekomsten af antibiotika resistens blandt disse. Som indikator organisme for Gram positive bakterier blev *Bacillus cereus* gruppen valgt. Ved dette forsøgsopsæt selekteres ikke først for antibiotika resistens. Herved kan fordelingen af følsomme og resistente *B. cereus* bestemmes. Metodens begrænsninger ligger i valget af indikator organismer, der fysiologisk vil afspejle den enkelte arts evne til at optage antibiotika resistens, samt forekomst af naturlig resistens overfor visse antibiotika.

Isolation af *B. cereus* efter selektiv vækst i medie og på plader indeholdende udvalgte antibiotika. Her blev valgt af fokusere på tetracyklin - og erythromycin resistens. Metodens begrænsning ligger i, at der kun kan testes et begrænset antal antibiotika på samme tid.

Fra fire udvalgte gårde med svin, blev 381 *Bacillus cereus* isoleret fra jord. Fra gårdene blev *B. cereus* isoleret fra ubehandlet jord, samt fra gylle/mødding behandlet jord (før og efter spredning). Desuden isoleredes 15 *Bacillus cereus* isolater fra Højbakkegaard, en velkarakteriseret ubehandlet landbrugsjord. Forekomst af resistens for 11 antibiotika blandt *B. cereus* isolaterne blev undersøgt.

Kun for streptomycin og erythromycin resistens kunne en ændring i forekomst af antibiotika resistens, som måske kunne relateres til spredning af husdyrsaffald, detekteres.

Der isoleredes ca. 70 uafhængige tetracyklin resistente isolater (10 fra gylle og møddingprøver) tilhørende *Bacillus cereus* gruppen, primært efter selektiv vækst i medie med tetracyklin tilsat. Forekomsten af tetracyklin resistens determinanterne Tet K, L, M, O og S blev undersøgt. Enkelte isolater indeholdt Tet M og Tet L (tidligere fundet i *B. cereus*), som normalt findes hos enterokokker.

Blandt de erythromycin resistente *B. cereus* blev to isolater indeholdende *ermB* fundet. Dette gen findes normalt også hos enterokokker.

Fundet af *ermB* og *tetM* blandt *Bacillus cereus* isolaterne kan indikere en horisontal overførsel af antibiotika resistens som resultat af spredning af husdyrsaffald.

B. THURIENGENSIS-PLANTER OG FØDEKÆDEEFFEKTER

Christian Kjær

Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Terrestrisk Økologi, Vejlsøvej 25, 8600 Silkeborg.

E-mail: ckj@dmu.dk

Med introduktionen af genetisk modificerede afgrøder med insektresistens rejser der sig naturligt en række spørgsmål vedrørende hvilke konsekvenser det kan have for natur og miljø. Brugen af afgrødeplanter med gen fra *Bacillus thuringiensis* indsat og andre lignende afgrøder kan bevirke, at det ikke er nødvendigt at sprøjte afgrøden med kemiske insektmidler. Det er kendt, at nogle af de uønskede sideeffekter ved anvendelsen af sprøjtemidler netop er effekten på markens fødekæder. To af de mest interessante fødekædeeffekter er sprøjtemidlernes indvirkning på markens naturlige regulering af skadedyr samt deres effekt på fuglenes fødegrundlag. Spørgsmålet er, om afgrøder med insektresistens har lignende virkninger på dyrelivet.

Effekter af afgrøder med *Bt*-toksin på skadedyrenes naturlige fjender bliver belyst ved et litteraturstudium. Da der endnu kun findes meget få undersøgelser af effekten genetisk modificerede afgrøder med insektresistens på de naturlige fjender, er litteraturen vedrørende effekten af *Bt*-toksin generelt benyttet. *Bacillus thuringiensis* og *Bt*-toksin er gennem mange år blevet anvendt som et biologisk bekæmpelsesmiddel. Der foreligger derfor adskillige studier af *Bt*-toksinets effekt på både skadedyr og rovlevende insekter. I de undersøgelser der er foretaget af *Bt*-toksiners effekt på naturlige fjender, er der i mange tilfælde påvist en negativ effekt på de naturlige fjenders overlevelse eller på deres evne til at reducere skadedyrsbestanden. I de få undersøgelser der er foretaget på genetisk manipulerede afgrøder med *Bt*-toksin, er der i nogle tilfælde også registreret effekter på rovdyrene. Det er således sandsynligt, at afgrøder med *Bt*-toksin kan påvirke markernes skadedyr-rovdyr-balance. Litteraturgennemgangen afslørede endvidere at der er en stor mangel på viden om effekten af at rovdyrene spiser skadedyr der ikke er følsomme overfor *Bt*-toksinet.

Effekten af insektresistente afgrøder på fugle fødegrundlag er foretaget ved at benytte en tidligere undersøgelse af sammenhængen mellem fødegrundlag i bygmarker og ynglesucces hos sanglærken. Denne sammenhæng er i dette projekt beskrevet ved hjælp af en matematisk model, der på baggrund af fødemængden beregner produktionen af lærkeunger. Det viste sig, at produktionen af lærkeunger i to af årene ville være mindst halveret i marker med insektresistente bygplanter. I det tredje år ville produktionen være cirka dobbelt så stor i marker med insektresistente afgrøder. Forskellen mellem marker med og uden insektresistente planter og mellem årene bestemmes primært af, hvor stor en andel af lærkernes føde der består af insekter som lever på afgrøden.

Mængden af afgrødetilknyttede insekter varierer betydeligt fra år til år. Afgrøden er ikke blandt de mest relevante med hensyn til markedsføring af insektresistente sorter. Insekt-lærke-forholdet i bygmarker skal i denne sammenhæng betragtes som et modelsystem vi har benyttet til at give et kvalificeret svar på spørgsmålet "Kan insektresistente afgrøder have økologiske sideeffekter, der kan forplante sig gennem fødekæder op til fuglene?" På baggrund af modelberegningerne må vi konkludere, at det er sandsynligt, at der kan forekomme effekter på fuglefaunaen, så forholdene bør undersøges nøjere i relevante afgrøder før en ny insektresistent afgrøde markedsføres.

BACILLUS SPP.: NATURLIGE INSEKTPATOGENER?

Jørgen Eilenberg

Institut for Økologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Thorvaldsensvej 40, Frb. C.

E-mail: ecol@kvl.dk

Bacillus thuringiensis anvendes i vid udstrækning til mikrobiologisk bekæmpelse af insekter. I mindre grad anvendes også *B. sphaericus*. De øvrige organismer, der anvendes til biologisk bekæmpelse, er alle naturligt forekommende, begrænsende faktorer for insektpopulationer. Makrobiologisk er der prædatorer og parasitoider, især insekter, mider og nematoder. Mikrobiologisk er der bakterier, svampe, virus og protozoer. Udvalget til biologisk bekæmpelse er sket ud fra deres naturlige evner til at inficere insekter og eventuelt deres evne til videre opformering og spredning. *B. thuringiensis* udsprøjtes pga dens umiddelbart toksiske effekt overfor målorganismene og der er ikke et ønske om videre opformering. Indenfor konceptet for biologisk bekæmpelse er *B. thuringiensis* et særtilfælde, hvor anvendelsen mest ligner anvendelsen af kemisk bekæmpelse og slet ikke brugen af anden biologisk bekæmpelse. Termen ”biopesticid” ses ofte anvendt om *B. thuringiensis*.

Som insektpatogen er *B. thuringiensis* også et ”særtilfælde”: Den danner stort set aldrig epidemier i insekter og den naturlige koncentration på blade o.lign. gør det stort set umuligt for f.eks. sommerfuglelarver, at indtage en letaldosis af de toksiske typer. Hvorfor findes bakterien egentlig? Hvorledes fuldendes dens livscyklus i naturen? Hvorfor danner den et krystal, når den ikke bruger det? Hvor er insekterne og andre invertebrater henne i dette? Hvad kan der miljømæssigt udledes af vores (mest manglende) viden om *B. thuringiensis* som insektpatogen?

BACILLUS THURINGIENSIS SKÆBNE EFTER ANVENDELSE I EN KÅLMARK

Niels Bohse Hendriksen & Bjarne Munk Hansen

Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi, Frederiksborgvej 399, 4000 Roskilde.

E-mail: nbh@dmu.dk & bmh@dmu.dk

B. thuringiensis er blevet anvendt i mange år til kontrol af forskellige insekter. En række undersøgelser har belyst skæbnen af *B. thuringiensis* efter anvendelse på en række forskellige afgrøder og i forskellige økosystemer. Generelt set er overlevelsen på blade begrænset til nogle få dage, mens overlevelsen i jord er længere varende. Vi gennemførte i sommeren 1993 et felt forsøg med en rifampicin resistent mutant af *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, som kan anvendes til kontrol af kålsommerfugles larver. Vi sprøjtede kålplanter og jord med bakterien således at udgangskoncentrationen i overfladejorden udgjorde 10^4 CFU per gram. Et år efter fandt vi 10^3 sporer/g af den specifikke stamme af *B. thuringiensis* i overflade jorden.

I de følgende år har vi fulgt populationen af den specifikke *B. thuringiensis* stamme i jorden på feltplottet, som hverken er blevet gødet, pløjet eller behandlet på anden måde. Specielt i 1999, seks år efter forsøget blev gennemført, undersøgte vi den specifikke populations skæbne. Vi fandt, (1) at populationen varierede imellem 10^2 og 10^3 CFU pr gram overfladejord, (2) at populationen primært kunne detekteres i de dele af feltet, hvor på der i 1993 var sket en udsprøjtning, (3) at populationen kunne detekteres ned til en dybde af ca. 40 cm og (4) at hele populationen i jord forefandt som sporer. Vi forsøgte, at indsamle prøver under forskellige temperatur og fugtigheds betingelser, men fandt i alle tilfælde at populationen primært bestod af sporer. Dette betyder, at populationen hidtil har overlevet seks år i jorden. Vi ikke er istand til at afgøre, med udgangspunkt i disse observationer, hvorvidt populationen blot har ligget inaktiv, som sporer, i jorden, eller om de i perioder eller under ganske specifikke omstændigheder, har været aktive og vegetativt voksende. Vi har indenfor det sidste år undersøgt forekomsten af bakterier fra cereus-gruppen i regnormes tarm. Vi har fundet, at der i tarmen, sandsynligvis primært bundet til tarmvæggen, findes vegetative celler (varme sensitive) af såvel *B. cereus* som *B. mycoides*, mens de i jorden og i regnormenes fæces primært fandtes som sporer. På en lignende måde har vi i regnorme indsamlet i forsøgsfeltet fundet vegetative celler af den specifikke *B. thuringiensis* stamme. Disse resultater antyder, at regnorme spiller en vigtig rolle for *B. thuringiensis* overlevelse og aktivitet i felten. Identiteten af den specifikke population af *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* er løbende blevet verificeret ved hjælp af mikroskopi og genetisk fingerprintings teknik (RAPD).

ANVENDELSE AF *BACILLUS THURINGIENSIS* I DANSK SKOVBRUG

- ERFARINGER OG MULIGHEDER

Susanne Harding

Institut for Økologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Thorvaldsensvej 40, Frb. C.

E-Mail: suha@kvl.dk

I dansk skovbrug er der et stort potentiale med hensyn til anvendelse af *Bacillus thuringiensis* til mikrobiologisk bekæmpelse af en række skadelige sommerfuglearter. Flere arter med fritlevende larvestadier volder med mellemrum økonomisk betydelig skade, men til trods for at larvernes levevis gør det oplagt at foretage bekæmpelse vha. *Bacillus thuringiensis*, udføres behandling traditionelt med pyrethroider. Konsekvensen har ikke uventet vist sig at være forstyrrelse af de naturlige reguleringsmekanismer.

I produktionen af juletræer og klippegrønt udgør minerende sommerfugle af vikler-slægten *Epinotia* et af de største skadedyrproblemer, og landsdækkende angreb forekommer regelmæssigt. I bekæmpelsesforsøg viste Bt-præparatet Biobit i 1993 en overraskende god effekt på højde med pyrethroid - et resultat der i lyset af et forestående totalt insekticidforbud i statsskovbruget syntes af stor vigtighed for dansk pyntegrøntproduktion. Tilsvarende forsøg i 1999 med Bt-præparatet Thurex kunne dog slet ikke bekræfte de lovende resultater, idet dette præparat ingen virkning havde. Anbefaling til skovbruget om biologisk bekæmpelse af viklere i pyntegrønt må derfor indtil videre betragtes som tvivlsom.

NATURLIG FOREKOMST AF *BACILLUS THURINGIENSIS* I LITAUISKE SKOVE

Lene Thomsen, Jørgen Eilenberg & Susanne Harding
Institut for Økologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Thorvaldsensvej 40, 1871
Frederiksberg C, Danmark
E-mail: Lene.Thomsen@ecol.kvl.dk

I Litauen er ca. en tredjedel af det totale areal dækket af skov. Nåletræer udgør ca. 62% af skovarealet, mens løvtræerne birk og asp udgør 33%. Blandt de vigtige skadegørere er sommerfuglelarver af fyrrespinder, *Dendrolimus pini*, og løvtræsnonne, *Lymantria dispar*, der begge kan bekæmpes med produkter baseret på *Bacillus thuringiensis*. For at opnå større viden om den naturlige *B. thuringiensis* population i forskellige litauiske skovøkosystemer, undersøgte vi den naturlige forekomst af *B. thuringiensis* på birkeløv, i *L. dispar* larver samt i førn fra birkebeplantningen i forbindelse med en sprøjtekampagne med *B. thuringiensis* mod *L. dispar* i birk i Silutė (Vestlitauen) i foråret 1997. Desuden isolerede vi *B. thuringiensis* fra nåletræs (fyr og gran)/*D. pini* systemet.

Vi isolerede *B. thuringiensis* fra alle prøvetyper. Den gennemsnitlige frekvens af *B. thuringiensis* i de forskellige prøvetyper varierede mellem 0.71 og 0.99 af den totale *B. cereus*/*B. thuringiensis* population med den laveste frekvens fundet på fyrrenåle og den højeste frekvens på birkeblade. Mere end 55% af de testede *B. thuringiensis* fra hver af prøvetyperne, blade, førn og *D. pini* var toksiske over for larver af den modtagelige art, stor kålsommerfugl, *Pieris brassicae*. Overraskende udviste mindre end 10% af isolaterne fra *L. dispar* toksicitet overfor *P. brassicae* larver.

Ved flagellær serotypning af 116 udvalgte *B. thuringiensis* isolater var serotypen *kurstaki* den dominerende og udgjorde næsten en fjerdedel af isolaterne. En femtedel af isolaterne var ikke-motile (manglede flagel). Serotypen *alesti* udgjorde ca. 10 procent af isolaterne, ca. syv procent tilhørte serotypen *aizawai* og andre syv procent kunne ikke typebestemmes med de nuværende antisera. Andre, 14 serotyper var tilstede i mindre antal. Den mest diverse population af *B. thuringiensis* med hensyn til serotyper var tilstede blandt insekt-isolaterne. Af de 41 udvalgte isolater kunne de 27 henføres til 11 forskellige serotyper. De resterende var ikke-motile eller kunne ikke typebestemmes isolater. Modsat kunne 20 ud af 49 udvalgte fylloplan-isolater henføres til serotypen *kurstaki*, 15 isolater til syv andre serotyper, to isolater kunne ikke typebestemmes og 12 manglede flagel.

Ud fra denne undersøgelse kan det konkluderes at *B. thuringiensis* er allestedsnærværende i forskellige niveauer af litauiske skovøkosystemer, såsom fylloplan, herbivore insekter og førn. Fylloplan-, insekt-, og førn-populationen af *B. thuringiensis* er meget heterogen og består af mindst 15 forskellige serotyper, med *kurstaki* som den eneste der er påvist fra alle de undersøgte materialer. Desuden var der ringe korrelation mellem skovtype eller økosystem niveau og aktivitet overfor sommerfuglelarver og serotype fordeling.

Danmarks Miljøundersøgelser

Danmarks Miljøundersøgelser - DMU - er en forskningsinstitution i Miljø- og Energiministeriet. DMU's opgaver omfatter forskning, overvågning og faglig rådgivning indenfor natur og miljø.

Henvendelser kan rettes til:

URL: <http://www.dmu.dk>

Danmarks Miljøundersøgelser
Frederiksborgvej 399
Postboks 358
4000 Roskilde
Tlf.: 46 30 12 00
Fax: 46 30 11 14

Direktion
Personale- og Økonomisekretariat
Forsknings- og Udviklingssektion
Afd. for Systemanalyse
Afd. for Atmosfærisk Miljø
Afd. for Miljøkemi
Afd. for Havmiljø
Afd. for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi
Afd. for Arktisk Miljø

Danmarks Miljøundersøgelser
Vejlsøvej 25
Postboks 314
8600 Silkeborg
Tlf.: 89 20 14 00
Fax: 89 20 14 14

Afd. for Terrestrisk Økologi
Afd. for Vandløbsøkologi
Afd. for Sø- og Fjordøkologi

Danmarks Miljøundersøgelser
Grenåvej 12-14, Kalø
8410 Rønde
Tlf.: 89 20 17 00
Fax: 89 20 15 15

Afd. for Landskabsøkologi
Afd. for Kystzoneøkologi

Publikationer:

DMU udgiver temarapporter, faglige rapporter, arbejdsrapporter, tekniske anvisninger, årsberetninger samt et kvartalsvis nyhedsbrev, DMUNyt. En oversigt over DMU's publikationer og aktuelle aktiviteter kan findes på DMU's hjemmeside. Årsberetningen og DMUNyt er gratis.