

Bananen- Pestizid- Studie II

**Epidemiologische Untersuchung
von Kleinbauern und Landarbeitern im
konventionellen und ökologischen Landbau
(Bananen) in Ecuador**

Teil 2:

Studienbericht über die Humanbiomonitoring-Untersuchungen

18. September 2016

Mitarbeiter und wissenschaftliches Team

OA Assoz. Prof. PD DI Dr. med. Hans-Peter Hutter¹⁻³

Univ.-Prof. Dr. Michael Kundi³

Ing. Helmut Ludwig²

Doz. Dr. Hanns Moshhammer¹⁻³

Univ.-Lektor Dr. Peter Wallner¹⁻³

Unterstützung (vor Ort)

Lucia Galarza, PhD Candidate⁴

Institutionen

- 1 ÄrztInnen für eine gesunde Umwelt, Wien
- 2 Medizin und Umweltschutz [**mus**], Wien
- 3 Institut für Umwelthygiene,
Zentrum für Public Health, Medizinische Universität Wien
- 4 Center for Latin American Research and Documentation,
University of Amsterdam



Diese Studie wurde mit finanzieller Unterstützung der Europäischen Union erstellt. Die dabei vertretenen Standpunkte geben die Ansicht der Autoren wieder und stellen somit in keiner Weise die offizielle Meinung der Europäischen Union dar.

Zusammenfassung

Landarbeiter und Kleinbauern im konventionellen Bananenanbau sind hohen Pestizidbelastungen ausgesetzt. In einer Studie in Ecuador untersuchten wir ihren Gesundheitszustand im Vergleich zu Personen, die Bananen anbauten und dabei keine Pestizide verwendeten.

Die 71 Studienteilnehmer wurden zunächst zu gesundheitlichen Symptomen, die sie in den letzten sechs Monaten an sich beobachtet hatten, befragt. Die Ergebnisse belegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: Sowohl lokale Reizerscheinungen (Haut, oberer Atemtrakt, Augen) als auch Beschwerden im Bereich des Magen-Darmtrakts (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) fanden sich deutlich häufiger bei den Pestizidnutzern. Daraus lässt sich folgern, dass die Gesundheit der Landarbeiter bei Anwendung von Bioziden akut beeinträchtigt wird. Eine genaue Darstellung findet sich in unserem Studienbericht über die Fragebogenerhebung 2016 (<http://www.aegu.net/Bananen-Pestizidstudie.pdf>).

Nun liegen auch die Ergebnisse aus den sog. Kleinkerntests vor. Hier werden zunächst Abstriche der Mundhöhlen-Wangenschleimhaut mittels Holzspatel durchgeführt. Anschließend werden die Zellen aufbereitet und im Hinblick auf Veränderungen – (zusätzliche) Kleinkerne, Kernknospen, etc. – geprüft. Solche Kernanomalien sind als erstes Warnzeichen für ein kanzerogenes Potenzial der Exposition zu verstehen. Bei den Pestizidanwendern waren diese Zellanomalien signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe, die keine Pestizide verwendeten.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Dringlichkeit von Schutzmaßnahmen für die betroffenen Landarbeiter in Bananenplantagen. Nicht nur akute Wirkungen, die als reversibel gelten, sind bei der belasteten Gruppe deutlich häufiger zu beobachten. Es belegen die Ergebnisse der Wangenschleimhautzell-Untersuchungen sehr eindrücklich, dass aufgrund der Belastung mit Agrochemikalien auch langfristig die Gesundheit gefährdet ist. Die Resultate unserer Untersuchung legen nahe, dass die Pestizidanwender ein höheres Risiko, an Krebs zu erkranken, aufweisen.

1. Durchführung des Mundhöhlenzell-Cytome-Assays

Zum Effekt-Monitoring wurde der Mundhöhlenzell-Cytome-Assay (Mikronucleus Assay, Kleinkerntest) eingesetzt. Diese nicht invasive Untersuchungsmethode dient zur Darstellung gentoxischer und zytotoxischer Veränderungen, ist für die Probanden schmerzlos und birgt für sie kein Risiko.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden einfache Abstriche der Mundhöhlen-Wangenschleimhaut (getrennt linke und rechte Wange) mittels Holzspatel durchgeführt (Tolbert et al. 1992). Das entnommene Material bzw. die gewonnenen Zellen wurden gleich anschließend vor Ort auf einem Ende eines Objektträgers ausgestrichen, wo zuvor mit einer sterilen Pipette ein Tropfen steriles Wasser aufgetragen wurde. Die Glasträger wurden mit der entsprechenden Codenummer versehen.

Die weitere Aufbereitung und die anschließende sehr aufwendige Auswertung der Zellen erfolgten nach der Vorbereitung entsprechend dem Protokoll von Thomas et al. (2009) in einem geeigneten medizinischen Labor durch erfahrene Fachleute in Wien.

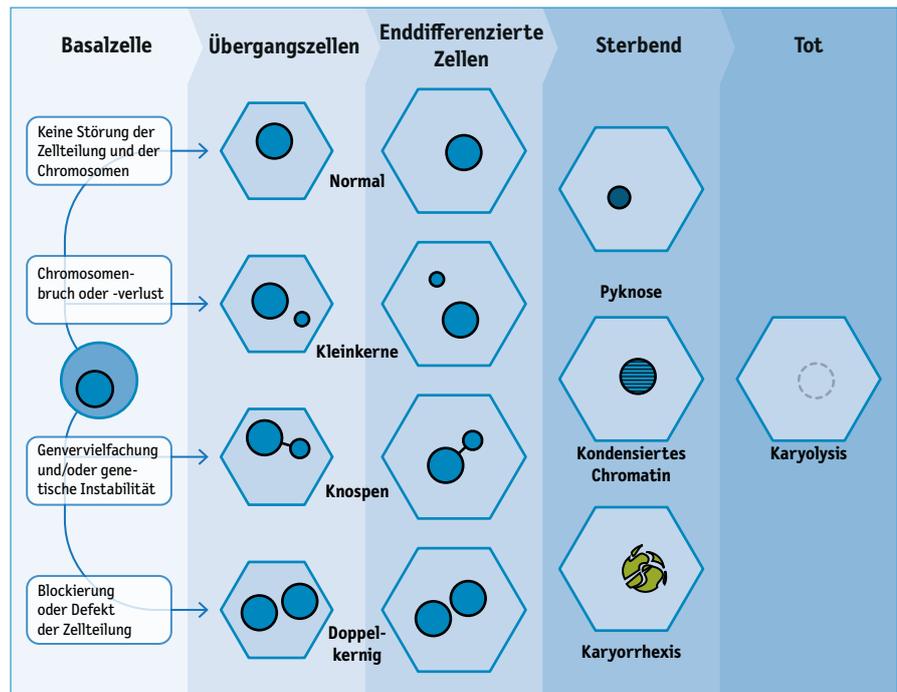
Die Zellen auf den Objektträgern wurden nach Feulgen angefärbt (DNA-spezifische Färbung), nach Waschen unter rinnendem Wasser drei Minuten gespült und danach mit Schiffschem Reagens im Dunkeln bei Raumtemperatur für 90 Minuten gefärbt. Danach wurden die Objektträger mit 0,2% (w/v) mit Light Green gegengefärbt.

Nach dieser DNA-spezifischen Färbung und Gegenfärbung wurden im ersten Schritt mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung 1.000 differenzierte Zellen und Basalzellen auf alle Abweichungen (Kleinkerne, nukleäre Knospen, „broken eggs“, Doppelkernzellen, kondensiertes Chromatin, karyorrhektische, karyolytische und pyknotische Zellen) untersucht, danach wurden weitere 1.000 differenzierte Zellen auf Kleinkerne, nukleäre Knospen und „broken eggs“ geprüft.

Als Kleinkerne werden intrazelluläre Strukturen bezeichnet, die Chromatin enthalten und von einer eigenen Membran ohne Verbindung zum Zellkern umgeben sind. Sie werden während der Zellteilung durch Ausschluss von ganzen Chromosomen (aneugener Effekt) oder Chromatinfragmenten (klastogener Effekt) aus dem Zellkern als Endpunkt einer gentoxischen Schädigung gebildet. Andere Anomalien, die gentoxische Effekte anzeigen, sind nukleäre Knospen (die z.B. infolge von Genvervielfachung entstehen) und „broken eggs“. Zytotoxische Effekte, aber auch eine Kombination von gen- und zytotoxischen Effekte zeigen Doppelkernzellen an. Verschiedene Stufen des Zelluntergangs, der sowohl gentoxische als auch zytotoxische Ursachen haben kann, sind Pyknose, kondensiertes Chromatin (Vorliegen der Chromatinfäden in einer Form, in der sie dichter gepackt sind), Karyorrhexis (höhere Verdichtung des Chromatins der DNA) und Karyolyse (Auflösung des Zellkerns, sogenannte „Geisterzelle“).

In der folgenden Übersicht (Abbildung 1) werden die verschiedenen Kernanomalien und ihre möglichen Ursachen dargestellt.

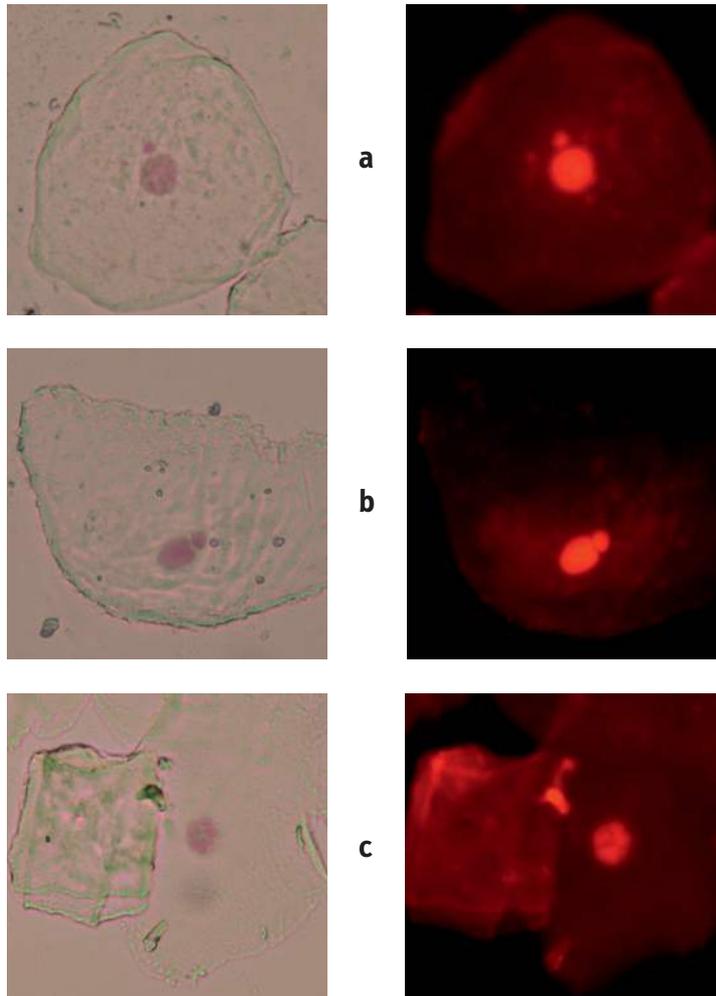
Abbildung 1
Übersicht über die Entwicklung von differenzierten Mundhöhlenzellen mit und ohne Kernanomalien.



Beispiele, wie solche Zellen unter dem Mikroskop mit und ohne Fluoreszenzfilter aussehen, sind in Abbildung 2 zusammengestellt.

Abbildung 2
Beispiele von Mikrofotografien von Mundhöhlenzellen.
a) Zelle mit Kleinkern,
b) Kernknospe,
c) Karyorrhexis (rechte Zelle) und Karyolysis (linke Zelle).

DNA wurde mit Feulgen, Zytoplasma mit Light Green gefärbt. Zellen bei 400-facher Vergrößerung unter Transmission (linke Bilder) und Fluoreszenzfilter im fernen Rotbereich (rechte Bilder).



2. Statistische Methode

Die einzelnen Zellanomalien wurden mittels verallgemeinertem linearem Modell analysiert, wobei Poisson-verteilte Häufigkeiten mit einem log-Link angenommen wurden. Dabei wurde das Alter als Einflussgröße berücksichtigt.

3. Ergebnisse zu gentoxischen und zytotoxischen Endpunkten

Zu den Endpunkten, die gentoxische Effekte anzeigen, gehören insbesondere die Kleinkerne, nukleäre Knospen und „broken eggs“. Endpunkte, die eher zytotoxische Effekte anzeigen, sind Doppelkerne, kondensiertes Chromatin, Karyorrhexis, Karyolyse und Pyknose. Die Ergebnisse zu diesen Endpunkten sind in der folgenden Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3

Kernanomalien in Wangenschleimhautzellen von Nicht-Pestizidanwendern (helle Balken) und Pestizidanwendern (dunkle Balken). Balkensäulen repräsentieren Durchschnittswerte (95 %-Konfidenzintervall) von Raten, gewonnen von Nicht-Pestizidanwendern (n= 37) und Pestizidanwendern (n= 31); **p<0,01;

Total MNi: Gesamte Anzahl von Kleinkernen

MN cells: Anzahl von untersuchten Zellen mit Kleinkern(en)

BUD: Kernknospe („broken egg“)

BN: Doppelkernige Zellen

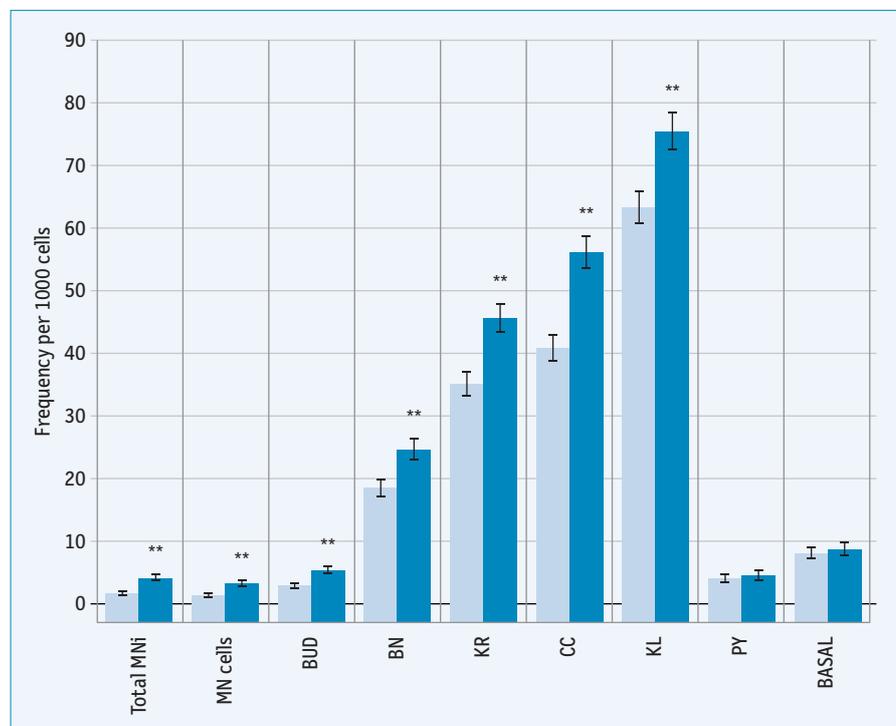
KR: Karyorrhexis

CC: kondensiertes Chromatin

KL: Karyolyse

PY: Pyknose

BASAL: Basalzellen.



Aus der Abbildung ist abzulesen, dass sich die beiden Gruppen (Nicht-Pestizidanwender: n=37; Pestizidanwender: n=31) bei sieben Kernanomalien sehr deutlich (hoch signifikant) unterscheiden: Die Parameter (Kernanomalien) Gesamtzahl Kleinkerne sowie Anzahl von Zellen mit Kleinkernen, Kernknospen, Doppelkerne, Karyorrhexis, kondensiertes Chromatin und Karyolyse finden sich deutlich häufiger bei den Pestizidanwendern.

Beispielsweise finden sich um 155 % mehr Kleinkerne, 84 % mehr nukleäre Sprossen, 32 % mehr doppelkernige Zellen, 37 % mehr Zellen mit kondensiertem Chromatin bei den Pestizidanwendern als bei den Nicht-Pestizidanwendern.

Die Häufigkeiten hinsichtlich pyknotischer und Basalzellen unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen.

4. Beurteilung der Ergebnisse

Der verwendete Test ist ein etablierter, standardisierter Test zum Nachweis von Chromosomenaberrationen. Die vorliegenden Resultate belegen, dass die Gruppe der Pestizidanwender deutlich höhere Raten an Kernanomalien aufweist als die Nichtpestizidanwender.

Gentoxische Anomalien sind als erstes Warnzeichen für ein kanzerogenes Potenzial der Exposition zu verstehen. Eine höhere Rate an Zellanomalien kann daher zur Vorhersage eines Erkrankungsrisikos herangezogen werden.

Im Zusammenhang mit der Pestizidexposition von Arbeitern liegen inzwischen Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Studien vor. Selbst wenn die Resultate nicht immer konsistent sind, lassen diese Untersuchungen jedenfalls den Schluss zu, dass für landwirtschaftliche Arbeiter mit Pestizidkontakt ein signifikant erhöhtes Risiko angenommen werden kann, u.a. an Non-Hodgkin-Lymphomen und Leukämie zu erkranken (z.B. De Roos et al. 2003, McDuffie et al. 2001). Letztlich wurden diese Zusammenhänge auch von der Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) für bestimmte Pestizide bestätigt wie z.B. für das auch in unserer Studie häufig verwendete Herbizid Glyphosat bzw. dessen Zubereitungen (IARC 2015, Guyton 2015).

5. Zusammenschau der Ergebnisse:

Befragung und Kleinkerntest

Die Probanden wurden zu gesundheitlichen Symptomen, die sie in den letzten sechs Monaten an sich beobachtet haben, befragt. Die Ergebnisse belegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: Sowohl lokale Reizerscheinungen (Haut, oberer Atemtrakt, Augen) als auch Allgemeinsymptome (wie z.B. Müdigkeit, Übelkeit, Schwindel) fanden sich deutlich häufiger bei den Pestizidnutzern. Daraus lässt sich folgern, dass die Gesundheit der Landarbeiter bei Anwendung von Bioziden akut beeinträchtigt wird. Z.B. bei Beschwerden des Magen-Darmtrakts (v.a. Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) fand sich ein sechs bis knapp 8-fach höheres Risiko im Vergleich zu den Nicht-Pestizidnutzern (siehe dazu unseren Studienbericht über die Fragebogenerhebung 2016).

Die nun vorliegenden Ergebnisse aus den Kleinkerntests unterstreichen die Dringlichkeit von Schutzmaßnahmen für die betroffenen Landarbeiter: Nicht nur akute Wirkungen, die als reversibel gelten, sind bei der belasteten Gruppe deutlich häufiger zu beobachten. Es belegen die Ergebnisse der Wangenschleimhautzell-Untersuchungen sehr eindrücklich, dass aufgrund der Belastung mit Agrochemikalien auch langfristig die Gesundheit gefährdet ist. Die Resultate legen nahe, dass diese Pestizidanwender ein deutlich höheres Risiko, an Krebs zu erkranken, aufweisen.

Insgesamt können wir aus den Untersuchungen ableiten, dass bei den Pestizidanwendern nicht nur eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens und eine durch die Symptome bewirkte Störung der Erholung in der arbeitsfreien Zeit vorliegt, sondern auch ein erhöhtes Krebsrisiko.

6. Literatur

De Roos AJ, Zahm SH, Cantor KP et al. (2003): Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup Environ Med* 60:E11.

Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K (2015): International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, IARC, Lyon, France. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol* 16:490-491.

Hutter H-P, Kundi M, Ludwig H, Moshhammer H, Wallner P (2016): Bananen-Pestizidstudie: Epidemiologische Untersuchung von Kleinbauern und Landarbeitern im konventionellen und ökologischen Landbau (Bananen) in Ecuador. Studienbericht über die Fragebogenerhebung. Im Auftrag der Ärztinnen und Ärzte für eine gesunde Umwelt (ISDE Austria), Wien 2016. <http://www.aegu.net/Bananen-Pestizidstudie.pdf>

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2015): Volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. IARC Working Group. Lyon; 3–10 March 2015. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum (in press).

McDuffie HH, Pahwa P, McLaughlin JR et al. (2001): Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1155-1163.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Fenech M (2009): Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4:825-37.

Tolbert P, Shy CM, Allen JW (1992): Micronucleus and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. *Mut Res* 271:69-77.