

Som et indlæg i GMO-debatten initieret af Carsten Christophersen i Dansk Kemi, nr. 6/7, side 10-11, har vi modtaget denne artikel.

# Naturlige pesticider og grundvandet

## Er fremtidens grundvand i fare for forurening med planteproducerede pesticider? Ny forskning følger pesticidernes skæbne i jorden og deres vej mod grundvandet

Af Lars Holm Rasmussen, Anne Louise Gimsing, Nanna Bjarnholt, Bjarne W. Strobel og Hans Chr. B. Hansen, Institut for Grundvidenskab og Institut for Plantebiologi, KVL



Figur 1. Unge ørnebregner i Mørup Skov, Sorø Akademi, maj 2002. Foto: Lars Holm Rasmussen.

De fleste planter syntetiserer toksiske stoffer (sekundære metabolitter, allelokemikalier). De kan indgå som del af plantens forsvar mod patogene organismer eller i konkurrencen med andre plantearter (allelpati) – eller de fungerer som signalstoffer eller er »blevet tilovers« under evolutionen. Mange af stofferne er ganske giftige, og vi har fra barnsben lært at afholde os fra at stoppe guldregn, skarntyde, taks, fluesvamp og amerikansk olieplante i munden grundet planternes indhold af cytisin, coniin, taxol, muscimol og ricin. Selv grøntsager som cassava, bønne, kartoffel og kål indeholder toksiske

stoffer, f.eks. cyanogene glucosider, lectiner, saponiner og glucosinolater.

Menneskers eksponering over for plantetoksiner via føden er indlysende. En anden eksponeringsvej er gennem drikkevandet. Plantetoksiner kan via afsætning på jorden udvaskes til grundvandet på samme måde som andre organiske forureningsstoffer, f.eks. pesticider, detergenter og organiske opløsningsmidler.

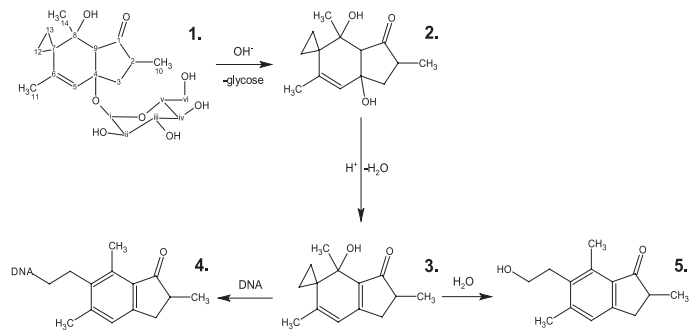
Plantetoksinerne produceres ofte i store mængder (adskillige kg pr. hektar) og har ofte en høj akut toksicitet. I mange tilfælde er toksinerne langt mere giftige end almindeligt anvendte pesticider. Derudover kan toksinerne afsættes fra planterødder i dybere jordlag, hvor den mikrobielle nedbrydning er lav, og en del af toksinerne har høj vandopløselighed og bindes derfor svagt til jordmateriale.

### GM-afgrøder

Planter kan altså producere deres egne »pesticider«. Både ved konventionel forædling og ved moderne GM (genmodifikations)-teknikker kan udvikles planter, der har højere indhold af specifikke »naturlige pesticider«. Ift. konventionel forædling giver de nye GM-teknikker mulighed for hurtige og markante ændringer i en plantes produktion af bestemte toksiner, der evt. kan være »fremmede« for det økosystem, hvori planterne dyrkes. Som led i udviklingen af miljøvenlige GM-afgrøder er det vigtigt, at miljøkemikere forsker i hvilke »naturlige pesticider«, der giver mindst miljømæssig belastning. Der er i den forbindelse en betydelig viden fra forskningen i de konventionelle

pesticider at trække på. De planteproducerede »pesticider« - om de så kommer fra en almindelig kulturplante eller en GM-plante - bør stilles over for de samme sikkerhedskrav, som konventionelle pesticider. Det indebærer minimal toksicitet over for ikke-målorganismer, hurtig nedbrydning og stærk binding af stofferne og deres metabolitter i jord.

Bt-afgrøder, dvs. afgrøder som f.eks. majs, ris, bomuld og kartoffel, der har fået indsat et særligt *Cry*-gen fra bakterien *Bacillus thuringiensis*, er i dag blandt de mest udbredte GM-afgrøder. *Cry*-genet koder for et 60-70 kDa stort protein, der ødelægger epithelcellerne i visse patogene insektlarvers tarm, hvorved larverne dør. Toksinet er ikke giftigt for mennesker, men kan være giftigt for visse ikke-patogene organismer. Bt-toksinet

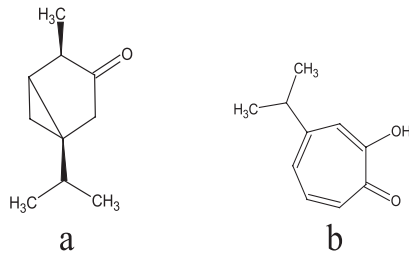


Figur 2. Omdannelse af ptaquilosid (1) via den ustabile dienen (3) til pterosis B (5) samt eksempel på reaktionsprodukt med DNA (4).

tilfredsstillende en række af miljøkravene til pesticider, herunder stærk binding til jordmateriale og ringe toksicitet over for de fleste ikke-målorganismer. Toksinet nedbrydes imidlertid langsomt i jord, og insekter kan opbygge resistens over for toksinet. Samtidig er det sandsynligt, at det kan transporteres partikelbåret til vandmiljøet [11]. Ved brug af GM-planter, der producerer »naturlige pesticider« som f.eks. cyanogene glucosider, glucosinolater, glucoalcaloide og lectiner, der i modsætning til Bt-toksiner kun bindes svagt i jord, skal toksinernes mobilitet og nedbrydning undersøges grundigt, idet glucosiderne har et overordentlig højt udvaskningspotentiale.

Alle afgrøder, der producerer »naturlige pesticider«, og ikke mindst GM-afgrøder, der er radikalt ændrede mht. produktion af bestemte stoffer, bør underkastes en undersøgelse af, om de pågældende »pesticider« påvirker dyrkningssystemets organismer, og om stofferne udvaskes til vandmiljøet. Det gælder også planter, der bruges til produktion af medicin. Undersøgelserne rummer en række interessante analytiske og miljøkemiske udfordringer, idet mange af stofferne ikke findes kommercielt, ekstraktions- og analysemetoder skal udvikles, stabiliteten,

sorptionen og den enzymatiske nedbrydning af stofferne i plante- og jordsystemet samt stoffernes toksicitet over for ikke-målorganismer i de relevante økosystemer skal kvantificeres.

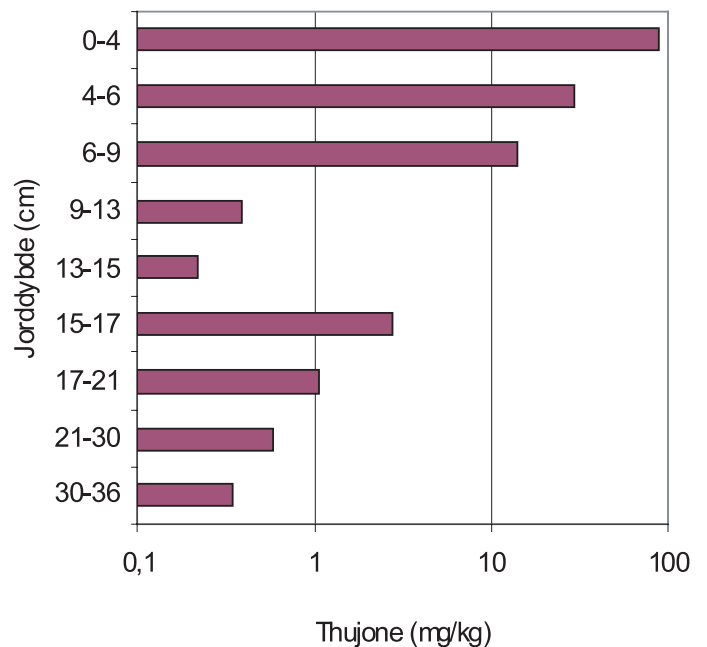


Om stofferne kan nå grundvandet eller udvaskes til vandløb og søer er stærkt afhængig af stoffernes stabilitet. Det ved vi desværre meget lidt om, og vi er derfor gået i gang med at undersøge naturlige toksiners miljøkemi i jord og grundvand. Undersøgelserne omfatter også mykotoksiner fra patogene svampe på landbrugsafgrøder. Nedenfor gives eksempler på nogle af de plantetoksiner, vi beskæftiger os med.

### Ptaquilosid fra ørnebregne

Ptaquilosid, et norsesquiterpent glucosid, findes i ørnebregneslægten (figur 1), der er udbredt i skove og på heder. Ptaquilosid er akut toksisk, carcinogent og mutagent og forårsager en række sygdomme såsom *Bovin Enzootisk Hæmaturi* (tumorer i urinblæren hos kvæg) og cancer i fordøjelseskanalen hos mennesker [8].

Ptaquilosid findes i alle dele af ørnebregnen, med størst indhold i bladene (op til 1,5%, tørvægt, svarende til op mod 200 mg m<sup>-2</sup> i den overjordiske biomasse). Nedbør vasker ptaquilosid ud af levende og døde plantedele (op til 700 µg L<sup>-1</sup> i bladafdryp), og ptaquilosid er fundet i jord (op til 6 µg g<sup>-1</sup>) og i drænvand (op til 7 µg L<sup>-1</sup>) [9,10]. Ved to lejligheder er det fundet i brøndboringer (30-45 µg L<sup>-1</sup>) ved overfladenære grundvandsmagasiner [8].



Figur 4. Thujonindhold i jordprofil under *Thuja plicata* i Teglstrup Hegn ved Helsingør.

Der er ingen grænseværdier for ptaquilosid i drikkevand, men en tolerabel koncentration i drikkevand kan estimeres til ca. 0,002 µg L<sup>-1</sup> [6].

Ptaquilosids reaktioner i jord er kun sparsomt undersøgt, men at stoffet har stærkt alkylende egenskaber, afspejles i dets mutagene egenskaber. Ved pH under 4 aromatiseres og hydroly-

## Konelab 20 XT, 30 og 60 -effektiv økonomisk til analysering

- Fotometri og elektrometri
- Eminent til løbende kvalitetskontrol, udvikling/forskning, kliniske prøver m.v.
- Unikke multi-kuvetter med lille volumen - lavt reagensforbrug
- Effektiv kontinuert loading af prøver og reagenser
- Åben for brugerdefinerede analyser
- Enkel, overskuelig og brugervenlig software
- Bred vifte af reagenser og applikationer



LABORATORIES  
SCANDINAVIA

Hjertemarkere



ACL 10200



Sebis Capillarys



Sebis Hydrazys



Gem Premier 3000



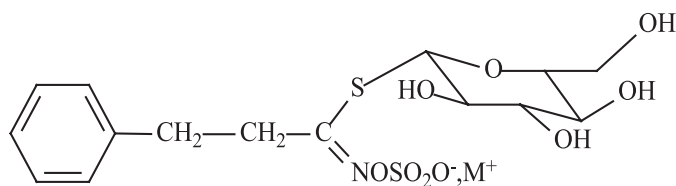
Reagenser



Klinisk kemi



Gydevang 22 A · DK-3450 Allerød · Tel 4814 1850 · Fax 4814 1860 · www.ilsdk.dk



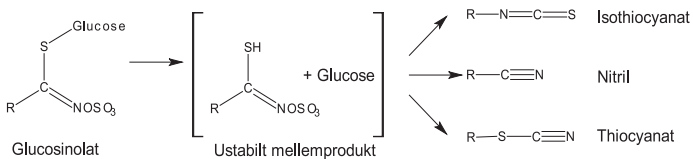
Figur 5. Eksempel på glucosinolat, her 2-phenylethylglucosinolat (gluconasturtin).

seres det til det ugiftige pterosin B, mens stoffet er relativt stabilt i området 4 til 7. Ved højere pH dannes en ustabil dienon, der antages at være det ultimative carcinogen (ptaquilosid er et præcarcinogen, der kræver basisk aktivering) (figur 2). Ptaquilosid bindes dårligt til jord. I danske jorde er der fundet fordelingskoefficienter ( $K_d$ -værdier) mellem 0,001 og 1,35 L kg<sup>-1</sup>. Næsten al ptaquilosid findes derfor i jordvandet, hvorfra det udvaskes til grundvand. Ptaquilosid kan overleve i mere end 70 dage i kontakt med jord. Specielt i lerjorde samt i sandede underjorde er det stabilt [8].

Da ptaquilosid kan produceres i store mængder og er mobilt og stabilt i jordmiljøet, forventes stoffet at nå grundvandet. Drikkevandstruslen er størst ved overfladenære borer.

### Flere stoffer fra skoven: Thujon og thujaplicin fra thuja

Thujon er et bicyklisk monoterpenoid velkendt som det hallucinerende stof i absinth (figur 3). Thujon kan give epileptiske anfald, forstyrrelser i overførslen af nerveimpulser, nyre- og leverskader. Dets akutte toksicitet er relativt lav med en LD<sub>50</sub> på 45 mg kg<sup>-1</sup> for mus [2], og stoffet har insekticid effekt [3]. Thujons neurotoksiske effekt skyldes blokering af GABA-receptorerne i centralnervesystemet [2]. Der findes  $\alpha$ - og  $\beta$ -thujon med isomeri ved methylgruppen. Fordelingen mellem isomerer varierer mellem plantearterne. Ud over havemalurt, der bruges til absint, findes thujon også i høje koncentrationer i bl.a. thuja-arter, salvie, rejnfan og gråbynke. Friske kviste og nåle af danske kæmpethuja indeholder 2,2 til 6,6 g kg<sup>-1</sup>. Skovbunden under kæmpethuja består af delvist omsatte nåle og kviste; her er fundet thujon-koncentrationer på 100–500 mg kg<sup>-1</sup> tørstof afhængig af jordtypen. I de øverste cm af mineraljorden er indholdet ca. 1 mg kg<sup>-1</sup> tørstof, og koncentrationen falder yderligere ned gennem jorden (figur 4). Jordvæske fra den øvre del af jorden under en thuja-bevoksning indeholder op til 15 µg L<sup>-1</sup> thujon. Så trods det lave totalindhold i mineraljord er



Figur 6. Initiale nedbrydningsreaktioner for glucosinolater.

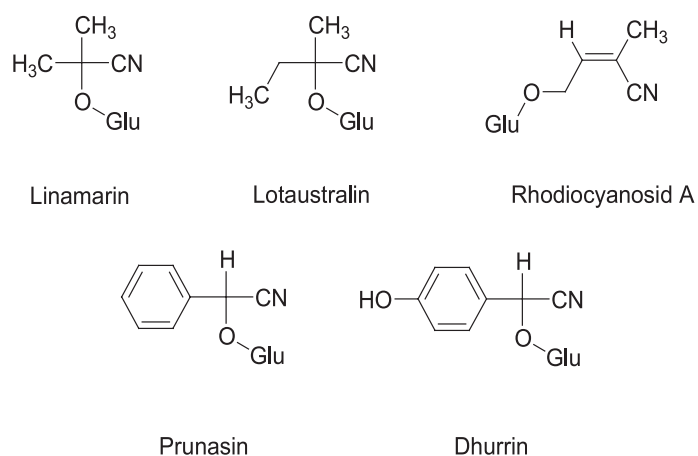
der en relativ høj koncentration i den mobile jordvæske. Det kan forklare thujons tilstedeværelse i de dybere jordlag.

Tømmer af thuja-træ er meget bestandigt. Det skyldes træets indhold af thujaplicin, der dræber bakterier og svampe (figur 3). Træet er så og sige imprægneret fra naturens hånd, og tropolonforbindelsen er et af de vigtigste stoffer blandt de naturlige imprægneringsmidler. Thujaplicin er stærkt celletoksisk med hæmmende effekt mod bl.a. kræftceller, og stoffets antibakterielle effekt udnyttes kommercielt som konserveringsmiddel i bl.a. kosmetik og fødevarer. Stoffet er relativt vandopløseligt (1 mM for syreformen), men bindes stærkt til jorden [1]. Det findes i træets kerneved, og stoffet spredes først for alvor, når træet saves op og bruges som tømmer, hvorfra det kan forurene jord.

### Glucosinolater

En vigtig gruppe af planteproducerede stoffer med pesticid-egenskaber er glucosinolaterne. Glucosinolater er thioethere, der består af en  $\beta$ -thioglucosedel, en sulponeret oxim og en variabel sidekæde, der er afledt af en aminosyre, men som ofte modificeres (figur 5). Mere end 120 forskellige sidekæder er beskrevet [12].

Glucosinolater produceres af planter fra familien *Brassicaceae*, der bl.a. omfatter raps, sennep og kål, og af planter i nogle få andre plantefamilier. Der er målt glucosinolat-produktioner på 0,8–45,3 mmol m<sup>-2</sup> [4]. Når plantematerialet ødelægges, hydrolyseres glucosinolaterne, bl.a. til isothiocyanater, thiocyanater og nitriler (figur 6). Afhængigt af sidekædens struktur og det omgivende miljø kan der også dannes andre stoffer som f.eks. oxazolidin [12, 13]. Hydrolyseprodukterne er giftige for en lang række patogener som nematoder, bakterier, svampe, og insekter. De kan også hæmme spiring af frø, og de har et stort potentiale som naturligt pesticid [5,7].



Figur 7. Eksempler på nitrilglucosider (Glu=Glucose).

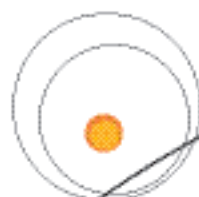
Glucosinolater og deres hydrolyseprodukter påvirker dog også ikke-mål organismer. Det er vist, at isothiocyanater reducerer mængden af ammoniumoxiderende bakterier i jord, isothiocyanater er cytotoxiske, og at visse glucosinolaters hydrolyseprodukter er toksiske over for dyr og mennesker.

Vi ved kun lidt om glucosinolater og isothiocyanaters kemi i jord. Undersøgelser tyder på, at glucosinolaterne ikke bindes i jord, mens isothiocyanaterne kan bindes betydeligt stærkere. Methylisothiocyanater bindes kraftigt i jord, hvor kun omkring 1% af det tilsatte stof ikke er bundet. Glucosinolater og isothiocyanater nedbrydes under bestemte forhold hurtigt i de øverste jordlag, f.eks. blev 2-phenylethyl-glucosinolat nedbrudt på 4 døgn, mens halveringstiden for tre isothiocyanater lå på 1,3–6,5 døgn [13]. Andre undersøgelser viser dog, at selv 30 dage efter tilsætning kunne methylisothiocyanat findes i jorden. Måske vil det vise sig, at glucosinolater, der udskilles i dybere jordlag, f.eks. fra rødder af raps, nedbrydes betydeligt langsommere pga. den lave enzymatiske aktivitet i disse jordlag.

Pga. glucosinolaters og deres nedbrydningsprodukters meget forskellige mobilitet og toksicitet er hastigheden af den enzymatiske omdannelse i jord kritisk for risikovurdering af disse stoffer.

### Nitrilglucosider

Betegnelsen nitrilglucosider dækker først og fremmest de cyanogene glucosider, der fraspalter HCN ved nedbrydning (figur 7 og 8). De produceres af en lang række vilde planter og kulturplanter og fraspalter HCN, når plantecellen ødelægges, og



SunFire™  
COLUMNS

## A new era in HPLC performance

Introducing SunFire™ columns—the new performance standard in silica-based HPLC technology. SunFire™ is a new state-of-the-art reversed-phase C<sub>18</sub> bonded silica which provides the best peak shape, excellent low-pH stability and high efficiency. In addition, the greater mass loading capability combined with the unique patent-pending Optimum Bed Density (OBD™) design, makes SunFire™ Prep columns unmatched in performance and scalability.

For the critical requirements of the pharmaceutical industry, SunFire™ columns outperform all leading competitive silica-based HPLC columns without compromise.

To learn more visit

[www.waters.com/sunfire](http://www.waters.com/sunfire)



Waters

Waters A/S

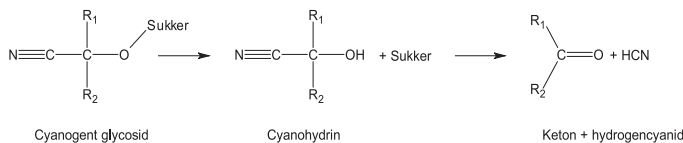
Baldersbuen 46 • 2640 Hedehusene

Tel. 46 59 80 80 • Fax 46 59 85 85 • email [denmark@waters.com](mailto:denmark@waters.com)

©2004 Waters Corporation. SunFire, OBD and Waters are trademarks of Waters Corporation.

stofferne kommer i kontakt med  $\beta$ -glucosidaser. Nogle cyanogene planter producerer også strukturelt beslægtede stoffer som eksempelvis rhodiocyanosider (figur 7). Deres primære nedbrydningsprodukter har nitril- og hydroxyl-grupperne bundet til forskellige kulstofatomer i molekylet, og derfor fraspaltes HCN ikke.

Fraspaltet HCN er giftig for mennesker og dyr, som det kendes fra bl.a. bitre mandler (amygdalin) og cassava (linamarin og lotaustralin). Desuden er det kendt, at f.eks. hvidkløver (linamarin og lotaustralin) og sorghum (dhurrin) reducerer forekomsten af skadedyr i jorden og forøger udbyttet af den efterfølgende afgrøde [14]. Det er ikke undersøgt, om effekten skyldes de intakte glucosider, HCN eller noget helt tredje. Der er rhodiocyanosider, lotaustralin og flere andre lavmolekylære alifatiske



Figur 8. Nedbrydning af cyanogene glucosider resulterende i produktion af HCN.

nitrilglucosider i naturmedicinpræparater. Enkeltstående forsøg med de rene stoffer antyder, at nitrilglucosiderne kan have farmakologiske effekter [15].

Transport fra planter til jord er stort set udforsket område. Desuden findes der planter, som producerer nitrilglucosider, men

**K<sub>ow</sub>:** Fordelingskoefficient, der angiver et stofs fordeling mellem n-octanol og vand ( $c_{\text{octanol}}/c_{\text{vand}}$ ; dimensionsløs). Udtryk for et stofs hydrofobicitet, herunder stoffets evne til at bindes til partikler af organisk materiale (humus) i f.eks. jord.

**K<sub>d</sub>:** Fordelingskoefficient, der angiver et stofs fordeling mellem jordens faste fase og jordens vandfase ( $c_{\text{jord}}/c_{\text{jordvand}}$ ; enhed L kg<sup>-1</sup>). Udtryk for hvor stærkt et stof bindes til jord.

ingen  $\beta$ -glucosidaser i samme væv (f.eks. byg), eller hvor det er variabelt, om planterne indeholder både glucosidet og enzymet (f.eks. ørnebregner). De udskilte enzymer bindes til jorden og kan derved inaktiveres. I disse tilfælde - eller hvis stofferne fås fra planterødder uden cellebeskadigelse - vil intakte nitrilglucosider afsættes i jorden. Ligesom ptaquilosid og glucosinolaterne forventes nitrilglucosiderne at være meget mobile i jord og kunne udvaskes, idet de er stærkt opløselige, har lave K<sub>ow</sub>-værdier og hverken bindes til jordens organiske eller uorganiske partikler i nævneværdig grad. Foreløbige undersøgelser af prunasin viser, at stoffet ikke hydrolyserer i nævneværdig grad ved pH-værdier, som de findes i danske jorde.

## Og hvad så...

Eksemplerne ovenfor viser, at de planteproducerede pesticider under visse omstændigheder er mobile og relativt persistente i geomiljøet. I de fleste tilfælde vil de naturlige pesticider være ligeså eller mere toksiske end de naturlige pesticider, vi bruger i dag. Samtidig står jordbruget over for anvendelse af nye GM-afgrøder, der kan øge mængden af naturlige pesticider, der tilføres dyrkningsjorden. Der er derfor et stort behov for at få viden om de naturlige pesticiders miljøkemi i plante-jord-vand-systemet: Hvor store mængder stoffer deponeres i jorden fra de forskellige plantedele, hvad er den tidsmæssige variation i deponeringen, og hvordan er stoffernes abiotiske og enzymatiske nedbrydning samt deres sorptions- og transportegenskaber i jord? Svarene skal benyttes i forbindelse med udvikling af GM-planter med bedst mulig miljøprofil og ved planlægning af arealanvendelsen.

Forskningen omkring plantetoksiner introducerer også nye bioetiske dilemmaer. Grænseværdien for konventionelle pesticider i drikkevand er i dag 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  uanset pesticidernes giftighed. For naturlige pesticider er der ikke fastsat nogen grænseværdier – heller ikke for de relativt toksiske, som f.eks. for ptaquilosid, hvor en grænseværdi estimeres at ligge omkring 0,002  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Dvs. at grænseværdierne, som de er formulerede i dag, faktisk ikke hjælper til at sikre befolkningens sundhed.

Skal fremtidens grænseværdier for pesticider – såvel de konventionelle som de naturlige - i drikkevandet fastlægges på grundlag af toksikologiske data? Det kan betyde, at grundvandsforureninger med f.eks. glyphosat og BAM er lige gyldige pga. stoffernes lave toksicitet, mens forurening med f.eks. ptaquilosid og andre naturlige pesticider må tages alvorligt.

## E-mail-adresser

Anne Louise Gimsing: angi@kvl.dk  
 Bjarne Westergaard Strobel: bjwe@kvl.dk  
 Hans Chr. B. Hansen: haha@kvl.dk  
 Lars Holm Rasmussen: lhr@kvl.dk  
 Nanna Bjarnholt: nnb@kvl.dk

## Referencer

- Dyrskov, L., Strobel, B.W., Svensmark, B. og Hansen, H.C.B.  $\beta$ -thujaplicin: new quantitative CZE method and adsorption to goethite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1452-1457. 2004.
- Höld, K.M., Sirisoma, N.S., Ikeda, T., Narahashi, T. og Casida, J.E. a-Thujone (the active component of absinth):  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 3826-3831. 2000.
- Kéita, S.M., Vincent, C., Schmidt, J.-P. og Arnason, J.T. Insecticidal effects of *Thuja occidentalis* (Cupressaceae) essential oil on *Calliosobruchus maculatus* [Coleoptera: Bruchidae]. *Canadian Journal of Plant Science*, 81, 173-177. 2001.
- Kirkegaard, J. A. og Sarwar, M. Biofumigation potential of brassicas - I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil*, 201, 71-89. 1998.
- Lazzeri, L., Baruzzi, G., Malaguti, L., og Antoniaci, L. Replacing methyl bromide in annual strawberry production with glucosinolate-containing green manure crops. *Pest Management Science*, 59, 983-990. 2003.
- Miljøstyrelsen (1992). Sundhedsmæssig Vurdering af Kemiske Stoffer i Drikkevand. København.
- Morra, M. J. og Kirkegaard, J. A. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1683-1690. 2002.
- Rasmussen, L.H. Ptaquiloside - an Environmental Hazard? Occurrence and Fate of a Bracken (*Pteridium* sp.) Toxin in Terrestrial Environments. Ph.d.-afhandling. Kemisk Institut, den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole, Frederiksberg. 2003.
- Rasmussen, L.H., Jensen, L.S. og Hansen, H.C.B. Distribution of the Carcinogenic Terpene Ptaquiloside in Bracken Fronds, Rhizomes (*Pteridium aquilinum*) and Litter in Denmark. *Journal of Chemical Ecology* 29, 771-778. 2003a.
- Rasmussen, L.H., Kroghsbo, S. Frisvad, J.C. og Hansen, H.C.B. Occurrence of the Carcinogenic Bracken Constituent Ptaquiloside in Fronds, Topsoils and Organic Soil Layers in Denmark. *Chemosphere* 51, 117-127. 2003b.
- Stotzky, G. Release, persistence, and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. p. 187 - 222 i Letourany, DK. og Burrows, B.E. (eds.) *Genetically engineered organisms: assessing environmental and health effects*. CRC Press, Boca Raton. 2002.
- Sørensen, H. Glucosinolates: Structure-Properties-Function. In: *Canola and Rapeseed. Production, chemistry, nutrition and processing technology*, pp 149-172. Van Nostand Reinhold, New York. 1990.
- Warton, B., Matthiessen, J. N., og Shackleton, M. A. Glucosinolate content and isothiocyanate evolution - Two measures of the biofumigation potential of plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5244-5250. 2001.
- Widmer, T.L. og Abawi, G.S. Relationship between levels of cyanide in sudangrass hybrids incorporated into soil and suppression of *Meloidogyne* hapla. *Journal of Nematology* 34, 16 - 22. 2002.
- Yoshikawa, M., Shimada, H., Shimoda, H., Murakami, N., Yamahara, J. og Matsuda, H. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 44, 2086 - 2091. 1996.