



Vitaliteten hos två biologiska växtskyddsmedel, del I *Vitality in two biopesticides, part I*

Anders TS Nilsson, Christina Johansson och Sven Axel Svensson

Område Jordbruk – odlingssystem, teknik och produktkvalitet, SLU Alnarp

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap

Rapport 2010:33

ISSN 1654-5427

ISBN 978-91-86373-40-5

Alnarp 2010



LANDSKAP TRÄDGÅRD JORDBRUK

Rapportserie

Vitaliteten hos två biologiska växtskyddsmedel, del I

Vitality in two biopesticides, part I

Anders TS Nilsson, Christina Johansson och Sven Axel Svensson

Område Jordbruk – odlingssystem, teknik och produktkvalitet, SLU Alnarp

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap

Rapport 2010:33

ISSN 1654-5427

ISBN 978-91-86373-40-5

Alnarp 2010

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning	5
Summary	6
1. Inledning	7
1.1 Bakgrund	7
1.2 Syfte och mål.....	7
1.3 Materiel och metoder	7
1.3.1 Preparat.....	8
1.3.2 Provmärkning	8
1.3.3 Avdödning	8
2. Vitalitetstest utförda av externa laboratorier.....	9
2.1 Anlitade laboratorier	9
2.2 Transporter	9
2.3 Genomförande.....	9
2.3.1 Lenes Laboratorium (se utförlig rapport i Bilaga 1)	9
2.3.2 Botaniska analysgruppen i Göteborg AB (se utförlig rapport i Bilaga 2).....	10
2.3.3 Bioforsk Plantehelse (se utförlig rapport i Bilaga 3).....	10
2.3.4 Eurofins (se utförlig rapport i Bilaga 4)	11
3. Vitalitetstest utförda av SLU	11
3.1 Växtmedium	11
3.2 Spädningsserier	11
3.2.1 Botanigard ES	12
3.2.2 Botanigard WP	12
3.2.3 Preferal	13
3.2.4 Test med att direkt slamma upp Preferal i 1000 ml vatten.....	13
3.3 Placering av preparat på agarplattor.....	14
3.4 Inkubation.....	14
3.5 Avläsning	14
3.6 Kompletterande försök 081212 – 081215	15
3.6.1 Botanigard ES	15
3.6.2 Preferal	16
3.6.3 Botanigard ES, B09.....	16
4. Resultat.....	16
4.1 Vitalitetstest utförda av externa laboratorier	16
4.1.1 Lenes Laboratorium	16
4.1.2 Botaniska analysgruppen i Göteborg AB.....	16
4.1.3 Bioforsk Plantehelse.....	17
4.1.4 Eurofins	17
4.2 Vitalitetstest utförda av SLU	17
4.2.1 Antal koloniformande enheter i spädningarna	17
4.2.2 Val av lämpliga spädningar och beräkning av antal koloniformande enheter i ursprungsproven	21
4.3 Sammanfattning av resultat.....	22
5. Diskussion	24
5.1 Skillnader mellan prov från samma batch analyserat av olika laboratorier	24

5.2 Test med olika metoder för att slamma upp Preferal WG.....	26
5.3 Skillnader mellan samma prov vid upprepning av analysen, samt spridning mellan replikat	26
5.4 Skillnader mellan olika batcher.....	26
6. Slutsatser	26
7. Referenser	27
Bilaga 1, Resultatrapport från Lenes Laboratorium.....	28
Bilaga 2, Resultatrapport från Botaniska analysgruppen i Göteborg AB	30
Bilaga 3, Resultatrapport från Bioforsk PlanteHelse	34
Bilaga 4, Resultat från Eurofins	38

Omslagsbild: Kolonier av *Paecilomyces fumosoroseus* Preferal (bruna) och *Beauveria bassiana* Botanigard (vita) på agarplatta med potatisdextros. Foto Anders TS Nilsson

Alla foton i rapporten är tagna av Anders TS Nilsson, Område Jordbruk - odlingsystem, teknik och produktkvalitet, SLU Alnarp

Förord

Föreliggande delrapport har syftet att undersöka vitaliteten hos några biologiska växtskyddsmedel. I denna första studie har vitaliteten studerats hos preparaten Botanigard ES, Botanigard WP och Preferal WG.

Jordbruksverket har finansierat arbetet, som bedrivits under hösten/vintern 2008 vid Område Jordbruk – odlingssystem, teknik och produktkvalitet vid SLU Alnarp. SLU har utfört viss del av vitalitetstesterna och stått för resultatsammanställning, analys och rapportering. Parallellt har externa analyslaboratorier anlåtats för att utföra vitalitetstest med vissa prov. Rapporten baseras på en projektredovisning till Jordbruksverket.

Arbetet med vitalitetstest av biologiska växtskyddsmedel fortsattes under våren 2009 med ytterligare ett delprojekt, finansierat av Partnerskap Alnarp (projekt nr PA 335). Projektet omfattar en studie av anledningar till felkällor och avvikelser i vitalitetsmätningar.

Alnarp i oktober 2010

Sven Axel Svensson
Projektledare
Område Jordbruk
SLU Alnarp

Erik Steen Jensen
Områdeschef
Område Jordbruk
SLU Alnarp

Sammanfattning

Biologiska växtskyddsmedel har en viktig position i produktion av trädgårdsprodukter, eftersom de ger en liten påverkan på den omgivande miljön samt motverkar uppkomsten av resistens mot kemiska växtskyddsmedel hos skadegörare. Biologiska preparat ökar sin användning i prydnadsväxt-, bär- och grönsaksproduktion och har också ett berättigande i jordbruksgrödor, även om de är mycket sällan förekommande där idag. Produkterna innehåller aktiva mikroorganismer baserade på exempelvis bakterier eller sporer av insektspatogena svampar. Det används även mikroorganismer för att bekämpa svampsjukdomar. Eftersom biologiska växtskyddsmedel är levande organismer, kan en del faktorer påverka slutresultatet efter bekämpning. Det kan vara frågan om preparatets ålder, lagring, användningsmetod, spridningsutrustning m.m. Variationer förekommer dessutom i tillverkningsprocessen, något som kan medföra skillnader mellan olika batcher, tillverkningsomgångar.

Projektets syfte har varit att på ett objektivt sätt undersöka hur olika faktorer påverkar vitaliteten hos ett par av de vanligaste biologiska växtskyddsmedlen. Målsättningen har också varit att finna en tillförlitlig metod för att bedöma vitaliteten hos preparaten. Prov av två olika preparat, Botanigard ES och Preferal WG, har skickats till fyra olika laboratorier i Sverige, Norge och Danmark. Varje laboratorium erhöll identiska prover. Av varje preparat skickades prov från två olika batcher, plus ett blandprov med kurant och avdödat prov i viktsförhållandet 50:50. SLU har dessutom, förutom vitalitetstest av samma prov som de externa laboratorierna, testat pulverpreparatet Botanigard WP samt prov från ytterligare en batch av Botanigard ES.

Studien visar att det förekommer stora variationer i analysresultat mellan laboratorier, analystillfällen och replikat. Skillnader mellan prov av kurant produkt och prov med inblandning av avdödat material framgår inte tydligt på grund av de stora variationerna i resultatet. Vissa laboratorier har fått oväntat höga resultat, där tillväxten har varit högre än vad leverantören angett. Detta väcker frågan om skillnaden i resultat beror på svårigheten att mäta upp och applicera ett homogent prov. Andra frågor som kommit fram är inverkan på resultatet av vattnets temperatur och pH, omrörning vid provpreparering, inkubationsförhållanden som temperatur, ljustillgång och luftfuktighet, samt lagringstid och lagringsförhållanden.

De stora variationerna i resultat, även från professionella laboratorier, dominerar helhetsbilden och påverkar dessutom möjligheterna att utföra pålitliga studier av olika tänkbara yttre parametrar. Slutsatsen är att det finns flera frågor som måste utredas, innan det går att anvisa en enkel, tillförlitlig vitalitetstest av biologiska växtskyddsmedel.

Summary

Biological plant protection has an important position in the production of horticultural products. They have a low impact on the surrounding environment, and prevent the emergence of resistance of pests to chemical pesticides. The use of biopesticides against pests has increased in ornamental plants, berries and vegetables. Furthermore, biopesticides are suitable for use in several agricultural crop protection situations, although rarely used today. Biopesticides contain active microorganisms, such as bacteria or fungal spores. Microorganisms can also be used to control fungal diseases. Since biopesticides are living organisms, different factors affect the activity after spraying, for example the age and storage history of the product, application method, application equipment, etc. Variations also occur in the biological production process, which could lead to differences among production batches.

The purpose of the project was to study, as objective as possible, how various factors influence the vitality of some of the most common biopesticides. The objective was to find a reliable method for assessing the vitality of the preparations. Samples of two different products, Botanigard ES and Preferal WG, were sent to four different laboratories in Sweden, Norway and Denmark. Each laboratory received identical samples of two different batches, plus a manipulated sample of live and killed sample in a weight ratio of 50:50. In addition to testing the same samples as the external laboratories, SLU also tested a powder formulation, Botanigard WP, and a sample of another batch of Botanigard ES.

The study showed that there is wide variation in test results among laboratories, analysis time and replicates. Differences between samples of live product and the manipulated material could not be detected. Some laboratories showed unexpectedly high rates of vitality, where growth of colonies were much higher than those stated on the supplier label. This raises the question: is the difference in results due to the difficulty of measuring and applying a homogeneous sample. Other issues that emerged were possible effects from water temperature, pH, stirring in connection with sample preparation, and incubation conditions such as temperature, light availability, humidity, storage conditions, etc.

The wide variation in results, even from professional laboratories, dominates the picture and also affects the possibility of performing reliable studies on the effects of various external parameters. The conclusion was that there were several issues to be examined, before it will be possible to suggest a simple, reliable vitality test on biopesticides.

1. Inledning

1.1 Bakgrund

Biologiska växtskyddsmedel har en viktig position i produktion av trädgårdsprodukter, eftersom de ger en begränsad påverkan på den omgivande miljön samt motverkar resistens mot kemiska växtskyddsmedel (Nedstam, pers inf, 2008). Ett antal sådana växtskyddsmedel är registrerade och används oftast i växthusproduktion.

Dessa preparat ökar sin användning i bär- och grönsaksproduktion och har också ett berättigande i jordbruksgrödor, även om de är mycket sällan förekommande där idag. Produkterna innehåller aktiva mikroorganismer. De kan vara baserade på bakterier såsom *Bacillus thuringiensis* och *Streptomyces griseoviridis*. Andra kan vara baserade på sporer av insektspatogena svampar som *Beauveria bassiana* och *Verticillium levanii*. Det används även virus och svampar, t.ex. *Trichoderma ssp.* för att bekämpa svampsjukdomar. Preparaten kan också innehålla olika tillsatser för optimering av formulering och spridningsegenskaper.

Krav på en vetenskaplig dokumentation av preparatens biologiska effekt ligger till grund för godkännande och borde inte behöva ifrågasättas. Det finns emellertid alltid en risk för att en del faktorer ur verkligheten kan påverka slutresultatet efter sprutning, eftersom biologiska växtskyddsmedel är levande organismer. Man kan nämna preparatets ålder, lagring, användningsmetod, spridningsutrustning, kontaminering, m.m. Variationer förekommer dessutom i den biologiska tillverkningsprocessen, något som kan medföra skillnader mellan olika batcher (tillverkningsomgångar).

Det råder delade meningar inom trädgårdsnäringen om dessa växtskyddsmedels effekt. Enligt en intervjuundersökning om växtskyddsmedlet BotaniGard, gjord 2008 av Klara Löfkvist, har man bland julstjärneodlare en positiv inställning till preparatet, men är osäker på effekten (SJV, 2008). Den biologiska bekämpningen används frekvent, men i många fall sker en kompletterande kemisk bekämpning. Variationer i vitalitet hos biologiska växtskyddsmedel har också tidigare redovisats (Danmarks Miljöstyrelse, 2005). I samband med bekämpningsförsök vid SLU med BotaniGard mot mjöllöss, gjordes inledande vitalitetsundersökningar under hösten 2008. Dessa gav resultat med stora avvikelser mot förväntat resultat, något som ledde till diskussioner om förväntad effekt av biologiska växtskyddsmedel (Svensson *et al.*, 2008).

1.2 Syfte och mål

Projektets syfte har varit att på ett objektiva sätt undersöka hur olika faktorer påverkar vitaliteten hos ett par av de vanligaste biologiska växtskyddsmedlen. Målsättningen har också varit att finna en tillförlitlig metod för att bedöma vitaliteten hos preparaten.

1.3 Material och metoder

Prov av två olika preparat Botanigard ES och Preferal WG, har skickats till fyra olika laboratorier i Sverige, Norge och Danmark. Varje laboratorium erhöll identiska prover. Av varje preparat skickades prov från två olika batcher, plus ett blandprov med kurant och avdodat prov i viktsförhållandet 50:50. Totalt antal skickade prov var 24 st.

SLU¹ har själv analyserat de båda preparaten och då 3 prov av varje enligt ovan. SLU har dessutom analyserat ytterligare ett antal varianter. Totalt antal prov var 8 st.

1.3.1 Preparat

Vitalitetstest har utförts för Botanigard ES (emulsion), Botanigard WP (pulver) samt Preferal WG (granulat), se Tabell 1.

Två olika batcher av Botanigard har analyserats både av externa laboratorier och av SLU. Den ena produkten hade bäst-före-datum 31/7-08 (nedan benämnd B2) och den andra hade ett bäst-före-datum 31/1-09 (nedan benämnd B3). SLU har dessutom analyserat ytterligare en batch med bäst-före-datum 30/4-09 (nedan kallad B09). Av Botanigard WP (nedan kallad B4) har endast en batch analyserats och endast av SLU.

Även av Preferal har två olika batcher analyserats, både internt och externt. Den ena erhöles från ett växthusföretag och var inköpt under våren 2008 (nedan benämnd P2) och den andra köptes in av SLU 27/8-08 (nedan benämnd P1).

Tabell 1. Förväntat innehåll i kuranta produkter, baserat på förpackningens uppgifter (CFU = koloniformande enheter)

Preparat	Innehåll	Entomopatogen svamp
Botanigard ES	2 x 10 ¹⁰ CFU/ml emulsion	<i>Beauveria bassiana</i>
Botanigard WP	4 x 10 ¹⁰ CFU/g pulver	<i>Beauveria bassiana</i>
Preferal	2 x 10 ⁹ CFU/g granulat	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>

Genom att placera utspädda koncentrationer av preparat på agarplattor har svampsporerernas vitalitet kunnat avgöras. Efter inkubation avlästes antalet koloniformande enheter (CFU), dvs antalet livsdugliga sporer per uppmätt volymsenhet.

1.3.2 Provmärkning

B1: Botanigard ES, 50:50 viktprocent, B3 och avdödat prov av B3

B2: Botanigard ES, bäst-före-31/7-08, batch nr: ESO070705

B3: Botanigard ES, bäst-före-31/1-09, batch nr: 22WP070701

B4: Botanigard WP

B09: Botanigard ES, bäst-före-30/4-09

P1: Preferal WG, inköpt 27/8-08, batch nr: 52 806.2

P2: Preferal WG, inköpt våren 2008, batch nr: 8284 066

P3: Preferal WG, 50:50 viktsprocent, P1 och avdödat prov av P1

1.3.3 Avdödning

De avdödade proven har värmebehandlats för att döda svampsporererna. Preferalprovet har upphettats i mikrovågsugn under 10 minuter. Botanigardprovet har på grund av sitt innehåll av petroleumprodukter i stället behandlats i vattenbad vid 85-90 °C, i 60 minuter.

¹ SLU = analysen har utförts av projektgruppen vid SLU

2. Vitalitetstest utförda av externa laboratorier

2.1 Anlitade laboratorier

Följande analyslaboratorier har anlitats för att utföra vitalitetstest på proverna.

Lenes Laboratorium
Holtumvej 58, Holtum
DK-7100 Vejle
Danmark

Kontaktperson: Lene Christensen
lenelab@ofir.dk

Botaniska analysgruppen i Göteborg AB
Botaniska Institutionen
Box 461
405 30 Göteborg

Kontaktperson: Marina Usoltseva
marina.usoltseva@botaniskanalys.se

Bioforsk Plantehelse
Høgskoleveien 7
NO-1432 Ås
Norge

Kontaktperson: Ingeborg Klingen
ingeborg.klingen@bioforsk.no

Eurofins
Box 887
531 18 Lidköping

Kontaktperson: Flor Khalili
florkhalili@eurofins.se

2.2 Transporter

Proverna skickades med post i skruvkorkförsedda provrör av plast (14 ml) inslagna i plastpåsar, skumplast och wellpapp i vadderade kuvert. De flytande proven förslöts med parafilm kring skruvkorken. Följebrev + metodbeskrivning skickades med e-post till laboratorerna före 14/11-08 och proverna + följebrev + metodbeskrivning + skyddsblad skickades från Alnarp 17/11-08. Eurofins accepterade uppdraget med viss fördröjning, varför motsvarande prover skickades till dem den 2/12-08.

1:a klass brev till Danmark tar 2 arbetsdagar och till Norge 2-3 arbetsdagar. A-post inom Sverige tar 1 arbetsdag. För att proverna inte skulle behöva förvaras på posten över helgen har de skickats i början av veckan.

2.3 Genomförande

2.3.1 Lenes Laboratorium (se utförlig rapport i Bilaga 1)

Proverna har förvarats i kyl (+5°C) från det att de har anlänt fram till analys. Proverna har späts 10⁸ gånger före utstrykning på agarplattor. För att få ett förväntat antal om 20 st kolonier av Botanigard ES och 2 st kolonier av Preferal WG ströks 0,1 ml av blandningarna ut.

Testerna har i stort sätt genomförts som på SLU, men med följande undantag:

- Pipettspetsen har fått ligga med då Botanigard slammats upp i vatten och fick sedimentera 5 + 30 min.
- Då Preferal slammades upp i 100 ml vatten har omrörning skett i 1 minut var 15:e minut under 1 timme, varefter preparatet har stått i 20 minuter.
- 6 replikat (petriskålar)
- Inkubation har skett vid 24 °C i 12 timmars ljus/mörker i 4 dagar
- Temperatur och pH hos spädvattnet, se Tabell 2

Tabell 2. Temperatur och pH hos spädvattnet hos Lenes Laboratorium

Prov	Temperatur [°C]	pH
B1	17	6,4
B2	17	6,4
B3	20	6,4
P1	16	6,5
P2	17	6,5
P3	17	6,5

2.3.2 Botaniska analysgruppen i Göteborg AB (se utförlig rapport i Bilaga 2)

Proverna har förvarats i kyl (+6°C) från det att de har anlänt fram till analys.

Proverna har spätts enligt följande:

Botanigard ES har spätts 10^8 gånger så att förväntat antal CFU per platta blev 20 st.

Preferal WG har spätts 10^7 gånger så att förväntat antal CFU per platta blev 20 st.

Testerna har i stort sätt genomförts som på SLU med följande undantag:

- 4 replikat (agarplattor)
- Svårigheten med preparat som fastnat i spetsen hanterade man så att pipettspetsens ände klipptes bort och spetsen steriliserades. På så sätt fick man större hål i spetsen och därmed blev det lättare att tömma ut innehållet. Mängden som pipetteras styrs av hur mycket pipetten suger upp och inte hur stor spetsen är.

Temperatur hos spädvattnet var 21 ± 1 °C och pH var 8,2.

2.3.3 Bioforsk Plantehelse (se utförlig rapport i Bilaga 3)

Proverna har förvarats i kyl (+5,5°C) från det att de har anlänt fram till analys.

Proverna av Botanigard ES har spätts 10^7 och 10^8 gånger före utstrykning på agarplattor. Proverna av Preferal har spätts 10^6 och 10^7 gånger före utstrykning på agarplattor. 0,1 ml har strukits ut vilket ger förväntat antal kolonier per platta 200 respektive 20 st för båda preparaten. De plattor som förväntades ge 200 kolonier har använts vid beräkningarna.

Testerna har i stort sätt genomförts som på SLU med följande undantag:

- Inkubation har skett vid 26 °C, 70 % RH och 24 h mörker enligt labbets rutiner för prover med svamp anpassade för jord och mörker.
- Kranvattnet autoklaverades före testen.

Temperaturen på vattnet som användes för att slamma upp preparat P var 18°C och för spädning av preparat B och P, 20 °C. Vattnets pH var 8,6.

2.3.4 Eurofins (se utförlig rapport i Bilaga 4)

Eurofins har följt den metodbeskrivning som skickades med proverna. Inga avvikelser har noterats, utan de har tillämpat samma metod som SLU.

3. Vitalitetstest utförda av SLU

Vitalitetstesten har utförts på SLU mellan 2008-11-21 och 2008-11-27. Kompletterande försök har utförts 2008-12-12.

3.1 Växtmedium

Som medium har Potato Dextrose Agar (PDA) använts. Agarplattorna har tillverkats på följande sätt:

39 g PDA har blandats i 1000 ml avjoniserat vatten under omrörning. Därefter har agarn autoklaverats i 20 minuter i 121°C. Den autoklaverade agarn hälldes i petriskålar av plast, och fick svalna med halvöppna lock för att reducera kondensbildningen. Agarplattorna har förvarats i kyl tills placering av preparaten utförts. Detta gav följande koncentration av komponenter i g per 1000 ml agar:

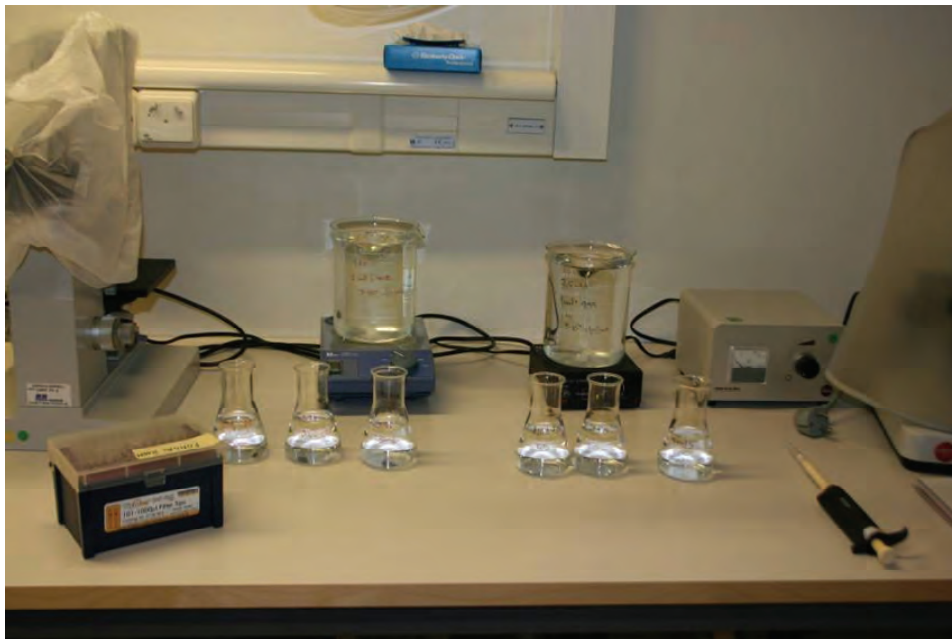
- | | |
|-------------------|------|
| • Potatis-extrakt | 4,0 |
| • Dextros | 20,0 |
| • Agar | 15,0 |

pH 5,6 (\pm 0,2) erhöles

3.2 Spädningsserier

Med syfte att hitta de mest tillförlitliga resultaten gjordes en spädningsserie för varje preparat, dvs ett antal spädningar med förväntat resultat, se Figur 1. För Botanigard gjordes spädningar med förväntat resultat mellan 5 och 500 CFU per platta och för Preferal mellan 100 och 2000. Utifrån det verkliga resultatet har sedan de resultat som har störst trovärdighet och lägst variation använts för beräkning av koncentrationen levande sporer i ursprungsprovet.

Temperaturen på spädvattnet har under försöken legat mellan 18 och 19°C och pH mellan 8,6 och 8,8.



Figur 1. Med syfte att hitta de mest tillförlitliga resultaten gjordes en spädningsserie för varje preparat.

3.2.1 Botanigard ES

Provet skakades under en minut. 1 ml pipetterades i 999 ml kranvatten. Blandningen rördes om med magnetorrörare i 5 minuter och fick stå i 30 minuter innan fortsatt spädning. Lösningen rördes om igen direkt innan spädning. Preparatet är mycket tjockflytande och det var därför svårt att få ut allt ur pipettspetsen. Pipettspetsen sköljdes i spädvattnet cirka 10 gånger. Förväntad koncentration CFU i preparatet från början var $2 * 10^{10}$ CFU/ml. Detta innebär att lösningens koncentration blev $2 * 10^7$ CFU/ml.

1. 0,25 ml av lösningen späddes till 1000 ml → 5000 CFU/ml i lösningen
2. 50 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 2500 CFU/ml i lösningen
3. 20 ml av lösning 2 späddes till 100 ml → 500 CFU/ml i lösningen
4. 10 ml av lösning 3 späddes till 100 ml → 50 CFU/ml i lösningen

Efter utplacering av 0,1 ml på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta och spädningsserie:

1. 500 CFU
2. 250 CFU
3. 50 CFU
4. 5 CFU

3.2.2 Botanigard WP

1 g preparat vägdes upp och blandades med 1000 ml kranvatten. Blandningen rördes om med magnetorrörare under en timme. 1,25 ml pipetterades upp och späddes till 1000 ml. Förväntad koncentration CFU i preparatet från början var $4 * 10^{10}$ CFU per g. Detta innebär att lösningens koncentration blev $5 * 10^4$ CFU per ml.

1. 10 ml av lösningen späddes till 100 ml → 5000 CFU/ml i lösningen
2. 50 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 2500 CFU/ml i lösningen
3. 20 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 1000 CFU/ml i lösningen
4. 50 ml av lösning 3 späddes till 100 ml → 500 CFU/ml i lösningen

Efter utplacering av 0,1 ml på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta och spädningsserie:

1. 500 CFU
2. 250 CFU
3. 100 CFU
4. 50 CFU

3.2.3 Preferal

I preparatets anvisningar står att pulvret skall blandas ut i vatten och stå för att sedimentera. Därefter används vätskan i den övre (största) delen som sprutvätska. 1g av preparatet vägdes upp och rördes ut i 100 ml kranvatten. Blandningen fick stå under omrörning med magnetomrörare under en timmes tid. Omrörningen avstannades och lösningen fick stå ytterligare en timme så att bottenfasen lagt sig. Den övre vattenfasen, vilken nu innehöll svampsporer, dekanterades av i ett 100 ml mätglas. Cirka 96 ml hälldes av. Kranvatten fylldes på upp till 100 ml. Lösningen blandades med 900 ml kranvatten så att slutvolymen blev 1000 ml. Lösningen rördes om med magnetomrörare i 5 minuter och fick stå i 30 minuter innan fortsatt spädning. Lösningen rördes om igen direkt före spädning. Förväntad koncentration CFU i preparatet från början var $2 \cdot 10^9$ CFU/g. Detta innebär att lösningens koncentration blev $2 \cdot 10^6$ CFU/ml.

1. 1 ml av lösningen späddes till 100 ml → 20 000 CFU/ml i lösningen
2. 25 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 5000 CFU/ml i lösningen
3. 10 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 2000 CFU/ml i lösningen
4. 50 ml av lösning 3 späddes till 100 ml → 1000 CFU/ml i lösningen

Efter utplacering av 0,1 ml på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta och spädningsserie:

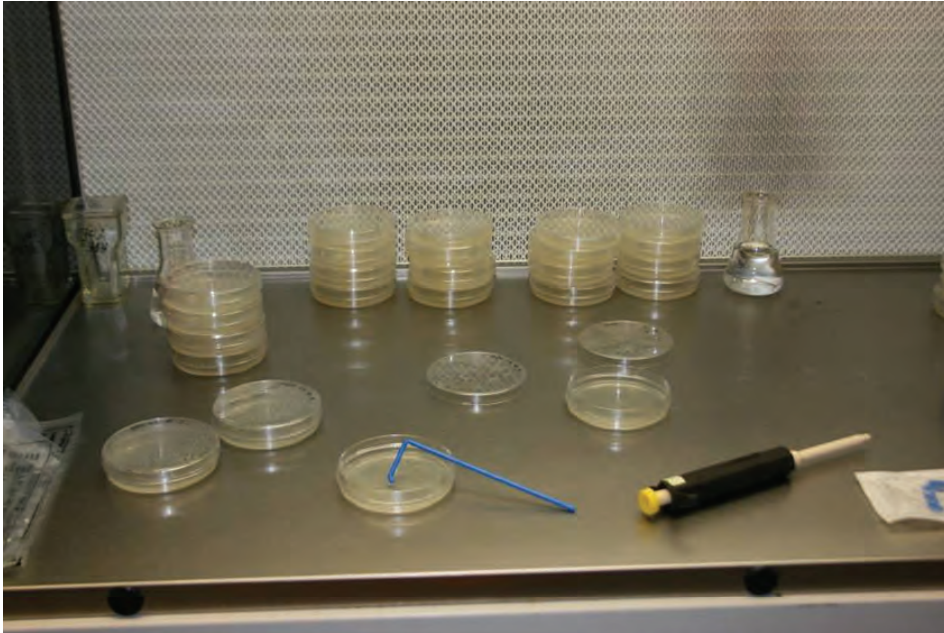
1. 2000 CFU
2. 500 CFU
3. 200 CFU
4. 100 CFU

3.2.4 Test med att direkt slamma upp Preferal i 1000 ml vatten

För att se om avvikelser i ovan nämnda hanteringsmetod ger avvikelser i resultatet har även ett test med en annan spädningsmetod utförts. Här har 1g Preferal rörts ut direkt i 1000 ml kranvatten. Granulat och vatten har rörts om i en timme och därefter hanterats på samma sätt som Preferalen ovan. En spädning har utförts d v s 1 ml av lösningen späddes till 100 ml → 20 000 CFU/ml i lösningen. Efter utplacering av 0,1 ml på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta 2000 CFU. Testet utfördes med prov P1 och resultatet finns redovisat som P1 2000 test.

3.3 Placering av preparat på agarplattor

Arbetet har utförts under sterila förhållanden. Lösningarna har rörts om med magnetomrörare i 5 minuter innan pipettering. 0,1ml lösning har strukits ut per agarplatta och med 5 stycken replikat per spädning, se Figur 2.



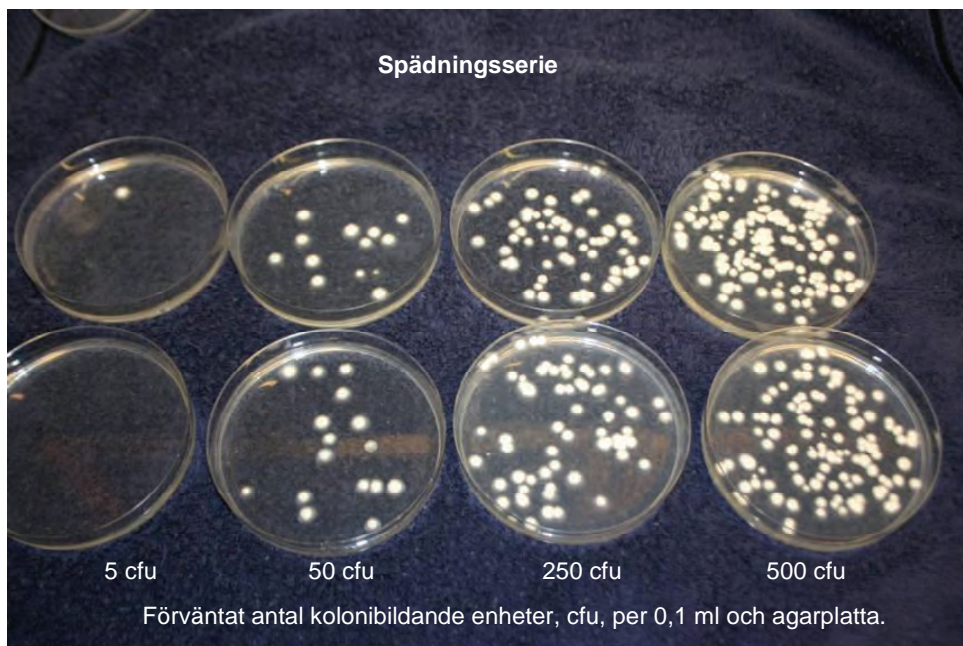
Figur 2. Placering av preparat på agarplattor.

3.4 Inkubation

Agarplattorna har inkuberats i 26°C och 12h ljus/mörker.

3.5 Avläsning

Avläsning av antal CFU har gjorts genom direkt räkning av antal bildade kolonier, se Figur 3. Två avläsningar har gjorts inom intervallet 3-5 dagar. Antal CFU för preparaten har beräknats genom att hänsyn tagits till antal spädningar och enhet. Vitaliteten redovisas som antal CFU i procent av förväntat antal CFU i proven, se Tabell 12 och Tabell 13.



Figur 3. Avläsning av antal CFU har gjorts genom direkt räkning av antal bildade kolonier.

3.6 Kompletterande försök 081212 – 081215

Efter de första försöken gjordes bedömningen att optimal spädning till förväntat antal CFU per platta borde vara 50-100 för Botanigard ES och 500-2000 för Preferal.

3.6.1 Botanigard ES

Nya försök utfördes med Botanigard, B2 och B3. Denna gång gjordes tre spädningar. Förväntat resultat på plattorna var 50, 100 respektive 250 CFU. Spädningarna har gjorts på följande sätt:

Provet hanterades enligt tidigare beskrivning för att erhålla en lösning med förväntad koncentration på $2 \cdot 10^7$ CFU/ml.

1. 0,25 ml av lösningen späddes till 1000 ml → 5000 CFU/ml i lösningen
2. 50 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 2500 CFU/ml i lösningen
3. 20 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 1000 CFU/ml i lösningen
4. 50 ml av lösning 3 späddes till 100 ml → 500 CFU/ml i lösningen

Efter utplacering av 0,1 ml av lösning 2,3 och 4 på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta och spädningsserie:

- 250 CFU
- 100 CFU
- 50 CFU

3.6.2 Preferal

Nya försök utfördes med Preferal, P1, P2 och P3. Denna gång gjordes två spädningar för P1 och P3 och tre spädningar för P2. Förväntat resultat på plattorna var 500 respektive 2000 CFU för P1 och P3, samt 200, 500 och 2000 för P2. Spädningarna har gjorts på följande sätt:

Provet hanterades enligt tidigare beskrivning för att erhålla en lösning med förväntad koncentration på $2 \cdot 10^6$ CFU/ml.

1. 1 ml av lösningen späddes till 100 ml → 20 000 CFU/ml i lösningen
2. 25 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 5000 CFU/ml i lösningen
3. 10 ml av lösning 1 späddes till 100 ml → 2000 CFU/ml i lösningen

Efter utplacering av 0,1 ml (P1 och P3) av lösning 1 och 2 på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta och spädningsserie:

- 2000 CFU
- 500 CFU

Efter utplacering av 0,1 ml (P2) av lösning 1, 2 och 3 på agarplatta blev förväntat antal CFU per platta och spädningsserie:

- 2000 CFU
- 500 CFU
- 200 CFU

3.6.3 Botanigard ES, B09

Vid samma tillfälle gjordes försöket med ytterligare ett preparat Botanigard ES, B09. Förväntat resultat på plattorna var 50, 100 respektive 250 CFU. Denna batch har använts vid sprutförsöken i växthus på SLU och har vid tidigare vitalitetstest visat låg vitalitet.

4. Resultat

4.1 Vitalitetstest utförda av externa laboratorier

4.1.1 Lenes Laboratorium

Vad gäller de delvis avdödade proven ligger P3 lite lågt i förhållande till P1. P3 är 1/6 av P1, men borde vara hälften. Man har påpekat i rapporten att P3 blev infekterad av jästsvampar vilket kan vara en anledning till det låga antalet kolonier på plattorna. B1 borde vara hälften så stor som B3, men är lika, se Tabell 11.

Resultaten från Lenes Laboratorium ligger generellt högt, över 100 % av förväntat värde. Vid jämförelse mellan ny och gammal produkt är vitaliteten 135 respektive 130 % av förväntat värde för Botanigard och 150 respektive 110 % för Preferal, se Tabell 12.

Resultatet gav något bättre vitalitet hos den nya produkten än den gamla.

4.1.2 Botaniska analysgruppen i Göteborg AB

Den första resultatrapporten från Botaniska analysgruppen i Göteborg var otydlig och ofullständig. Efter diskussion med laboratoriet har räknefel och spädningfel förklarats.

För beräkning av koncentrationerna i ursprungsproven har resultaten av spädningar till förväntat antal cfu per platta = 20 använts, se bilaga 2. Koncentrationerna i ursprungsproven finns presenterade i Tabell 11.

Vad gäller de delvis avdödade proven ligger P3 lite för högt i förhållande till P1. B1 borde vara hälften så stor som B3, men är lite högre, se Tabell 11.

Resultaten från Botaniska analysgruppen ligger oväntat högt för Botanigard, mellan 189 och 450 % av förväntat värde. Vid jämförelse mellan ny och gammal produkt är vitaliteten lika för Botanigard, cirka 450 % och 65 respektive 300 % för Preferal. Även den gamla produkten av Preferal ligger oväntat högt, se Tabell 12.

Resultatet visar samma vitalitet hos den nya produkten som den gamla för Botanigard, men avsevärt högre vitalitet för gammal produkt av Preferal.

4.1.3 Bioforsk Planteohelse

Vad gäller de delvis avdödade proven ligger B1 bra i förhållande till B3. P3 borde vara hälften så stor som P1, men är något högre, se Tabell 11.

Resultaten från Bioforsk ligger generellt lågt, mellan 10 och 20 % av förväntat värde för Botanigard och kring 2 % för Preferal. Ett undantag är P2, d v s gammal produkt, som har avsevärt högre vitalitet, 20 % av förväntat värde. Vid jämförelse mellan ny och gammal produkt är vitaliteten 20 respektive 15 % av förväntat värde för Botanigard och 2,5 respektive 20 % för Preferal, se Tabell 12.

Resultatet gav något bättre vitalitet hos den nya produkten för Botanigard och avsevärt bättre för gammal produkt av Preferal.

4.1.4 Eurofins

Vad gäller de delvis avdödade proven ligger P3 lite lågt i förhållande till P1. P3 är 1/3 av P1, men borde vara hälften. B1 borde vara hälften så stor som B3, men är lika stor, se Tabell 11.

Resultaten från Eurofins ligger likvärdigt med SLU och generellt lågt, mellan 30 och 60 % av förväntat värde för Botanigard och mellan 2 och 3 % för Preferal. Vid jämförelse mellan ny och gammal produkt är vitaliteten lika för båda preparaten, 30 % av förväntat värde för Botanigard och 3,0 % för Preferal, se Tabell 12.

Resultatet gav ingen skillnad mellan gammal och ny produkt.

4.2 Vitalitetstest utförda av SLU

4.2.1 Antal koloniformande enheter i spädningarna

Vid försöken med Botanigard, prov B2, ligger resultaten mellan 80 och 100 % av förväntat antal kolonier i kurant produkt, se Tabell 3. Resultaten gäller antal kolonier per platta vid spädning så att förväntat värde blir 5, 50 och 250 CFU. Resultaten stämmer bra inbördes. Spädningen som förväntades ge 500 CFU blev så full av kolonier att avläsningen inte var möjlig vid andra avläsningstillfället. Vid första avläsningstillfället var antalet kolonier endast något fler vid spädningen till 500 än vid 250. Troligtvis begränsar det stora antalet kolonier tillväxten. Vid andra analysstillfället blev tillväxten av kolonier oförklarligt hög vid

spädningen till 50 CFU per platta. Spädningen till 100 CFU per platta låg som förväntat. Vid analysen som utfördes den 12/12 fick vi även stora variationer mellan replikaten.

Tabell 3. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie B2.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	21/11 Analys						12/12 Analys					
	Avläsning 24/11			Avläsning 25/11			Avläsning 16/12			Avläsning 17/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
5	4,0	2,3	80	4,6	2,9	92						
50	49,8	18,8	100	52,4	21,0	105	184,8	144,0	367	-	-	-
100										97,3	68,5	97
250	203	33,2	82	213	37,6	85						
500	230	162	46	-	-	-						

Vid försöken med Botanigard, prov B3, ligger resultaten betydligt lägre, mellan 25 och 32 % av förväntat antal kolonier i kurant produkt, se Tabell 4. Resultaten gäller antal kolonier per platta vid spädning, så att förväntat värde blir 50, 250 och 500 CFU. Tillväxten har varit sämre än förväntat men resultaten stämmer bra inbördes. Spädningen som förväntades ge 5 CFU gav endast enstaka kolonier och i vissa fall inga alls. Denna spädning är inte lämplig när vitaliteten är så låg, eftersom slumpen får alltför stort inflytande. Vid analysen som utfördes den 12/12 fick vi stora variationer mellan replikaten.

Tabell 4. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie B3.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	21/11 Analys						12/12 Analys					
	Avläsning 24/11			Avläsning 25/11			Avläsning 16/12			Avläsning 17/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
5	0,4	0,5	8,0	0,4	0,5	8,0						
50	15,8	4,3	32,0	15,8	3,1	32,0	129,2	139,2	258,4			
100							95,0	72,3	95,0			
250	63,7	3,9	25,0	62,8	2,6	25,0						
500	123	14,1	25,0	123	15,3	25,0						

Vid försöken med Botanigard, prov B1, ligger resultaten också lågt, mellan 12 och 18 % av förväntat antal kolonier i kurant produkt, se Tabell 5. Resultaten gäller antal kolonier per platta vid spädning så att förväntat värde blir 5, 50, 250 och 500 CFU.

Tabell 5. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie B1.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	24/11 Analys					
	Avläsning 27/11			Avläsning 28/11		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
5	0,6	1,3	12,0	0,6	1,3	12,0
50	7,0	1,9	14,0	8,0	2,0	16,0
250	41,4	4,2	17,0	45,0	4,8	18,0
500	77,6	22,1	16,0	90,2	21,3	18,0

Vid försöken med Botanigard, prov B09, ligger resultaten ungefär som förväntat, se Tabell 6. Resultaten gäller antal kolonier per platta vid spädning så att förväntat antal blir 50 CFU. Tidigare försök har visat en lägre vitalitet hos denna batch.

Tabell 6. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie B09.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	12/12 Analys					
	Avläsning 15/12			Avläsning 16/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
50	50,6	15,8	101,2	50,6	15,5	101,2
100				246,0	128,4	246,0
250						

Vid försöken med Botanigard WP, B4, ligger resultaten mellan 11 och 16 % av förväntat resultat, se Tabell 7.

Tabell 7. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie B4.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	27/11 Analys					
	Avläsning 1/12			Avläsning 2/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
50	8,0	3,3	16,0	8,0	3,7	16,0
100	11,4	5,5	11,4	11,2	5,6	11,2
250	35,4	6,2	14,2	35,8	6,5	14,3
500	75,0	17,1	15,0	75,2	18,0	15,0

De resultat från analys av Preferal, prov P1, som stämmer bäst överens inbördes är spädningarna 500 respektive 2000 CFU per platta. I dessa båda fall ligger resultaten mellan 3,9 och 4,7 % av förväntat antal kolonier i kurant produkt, se Tabell 8. I det fall då granulatet slammades upp direkt i 1000 ml vatten blev resultatet något lägre 3,5 och 3,9 % av förväntat antal CFU.

Tabell 8. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie P1.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	25/11 Analys						15/12 Analys					
	Avläsning 28/11			Avläsning 1/12			Avläsning 18/12			Avläsning 19/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
100	3,0	2,5	3,0	3,6	3,0	3,6						
200	8,7	2,7	4,3	11,0	3,3	5,5						
500	19,3	4,1	3,9	23,5	4,0	4,7	19,6	6,6	3,9	24,4	7,5	4,9
2000	78,4	4,3	3,9	84,0	4,6	4,2	83,8	9,5	4,2	97,0	8,2	4,9
2000 test	69,6	5,3	3,5	77,0	7,6	3,9						

De resultat från analys av Preferal, prov P2, som stämmer bäst överens inbördes är spädningarna 100 respektive 200 CFU per platta. I dessa båda fall ligger resultaten mellan 25,0 och 26,8 % av förväntat antal kolonier i kurant produkt, se Tabell 9.

Tabell 9. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie P2.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	25/11 Analys						15/12 Analys					
	Avläsning 28/11			Avläsning 1/12			Avläsning 18/12			Avläsning 19/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
100	25,0	1,2	25,0	26,8	2,2	26,8						
200	50,0	8,0	25,0	51,8	7,2	25,9	40,6	9,1	20,3	42,6	8,6	21,3
500	115,6	9,4	23,1	113,2	10,3	22,6	102,4	12,2	20,5	115,2	15,4	23,0
2000	-	-	-	-	-	-	335,2	37,6	16,8			

De resultat från analys av Preferal, prov P3, som stämmer bäst överens inbördes är spädningarna 500 respektive 2000 CFU per platta. I dessa båda fall ligger resultaten mellan 3,0 och 3,1 % av förväntat antal kolonier i kurant produkt, se Tabell 10.

Tabell 10. Antal koloniformande enheter per platta i spädningsserie P3.
Std = standardavvikelse. Rel = resultat i förhållande till förväntat

Förväntat resultat per platta	27/11 Analys						15/12 Analys					
	Avläsning 1/12			Avläsning 2/12			Avläsning 18/12			Avläsning 19/12		
	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]	Antal	Std	Rel [%]
100	2,8	0,8	2,8	3,2	1,3	3,2						
200	6,2	2,8	3,1	6,2	2,8	3,1						
500	15,2	2,2	3,0	15,4	1,5	3,1	9,0	2,2	1,8	11,0	2,4	2,2
2000	59,4	4,8	3,0	61,0	3,2	3,1	38,6	4,2	1,9	43,4	5,7	2,2

4.2.2 Val av lämpliga spädningar och beräkning av antal koloniformande enheter i ursprungsproven

Antal koloniformande enheter (CFU) i ursprungsproven har beräknats från de spädningar som gav de mest tillförlitliga resultaten, se Tabell 13. Säkerheten i resultaten har värderats utifrån ett antal faktorer, såsom överensstämmelse mellan spädningar, antal kolonier på plattorna respektive spridning mellan replikaten. Vi anser att de spädningar som ger ett verkligt antal CFU per platta mellan 10 och 100 är mest trovärdiga. För resultat där antalet CFU är <10 anser vi att slumpen spelar för stor roll. Resultat där antalet CFU på plattan ligger mellan 100 och 250 är användbara, men kan ge svårigheter i avläsningen. För resultat där antalet CFU på plattan är större än 250 börjar kolonierna att konkurrera med varandra och kan inte utvecklas optimalt. Vi har därför i studien försökt använda plattor för beräkning där antalet CFU ligger mellan 10 och 100.

Vi har också prioriterat de spädningar som visar minst spridning mellan replikaten. Överensstämmelse mellan spädningar har beaktats och där resultaten ligger nära har ett medelvärde av de båda använts.

Botanigard, B1

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultat från spädningarna 250 respektive 500 CFU per platta använts, d v s 18,0 %.

B1 = 18,0 % av förväntat resultat (250 och 500 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,18 \cdot 2 \cdot 10^{10}$ CFU per ml = $0,36 \cdot 10^{10}$ CFU per ml

Botanigard, B2

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultat från spädningarna 50 respektive 250 CFU per platta använts, d v s ett medelvärde av 105,0 och 85,0 %.

B2 = 95,0 % av förväntat resultat (50 och 250 CFU /platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,95 \cdot 2 \cdot 10^{10}$ CFU per ml = $1,9 \cdot 10^{10}$ CFU per ml

Botanigard, B3

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultat från spädningarna 250 respektive 500 CFU per platta använts, d v s 25,0 %.

B3 = 25,0 % av förväntat resultat (250 och 500 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,25 \cdot 2 \cdot 10^{10}$ CFU per ml = $0,50 \cdot 10^{10}$ CFU per ml

Botanigard WP

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultat från spädningarna 250 respektive 500 CFU per platta använts, d v s ett medelvärde av 14,3 och 15,0 %.

B4 = 14,7 % av förväntat resultat (250 och 500 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,15 \cdot 4 \cdot 10^{10}$ CFU per gram = $0,6 \cdot 10^{10}$ CFU per gram

Botanigard, B09

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har resultatet från spädningen 50 CFU per platta använts, d v s 101,2 %

B09 = 101,2 % av förväntat resultat (50 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $1,01 * 2 * 10^{10}$ CFU per ml = $2,0 * 10^{10}$ CFU per ml

Preferal P1

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultat från spädningarna 500 respektive 2000 CFU per platta använts, d v s 4,9 %. Vi har använt resultat från analysen utförd den 15/12.

P1 = 4,9 % av förväntat värde (500 och 2000 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,05 * 2 * 10^9$ CFU per gram = $0,1 * 10^9$ CFU per gram

Preferal P2

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultaten från spädningarna 100 respektive 200 CFU per platta använts, d v s ett medelvärde av 25,9 och 26,8 %.

P2 = 26,4 % av förväntat värde (100 och 200 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,3 * 2 * 10^9$ CFU per gram = $0,5 * 10^9$ CFU per gram

Preferal P3

Vid beräkning av ursprungsprovets koncentration har ett medelvärde av resultat från spädningarna 200, 500 respektive 2000 CFU per platta använts d v s 3,1 %.

P3 = 3,1 % av förväntat värde (500 och 2000 CFU/platta) ger i ursprungsprovet:
 $0,031 * 2 * 10^9$ CFU per gram = $0,06 * 10^9$ CFU per gram

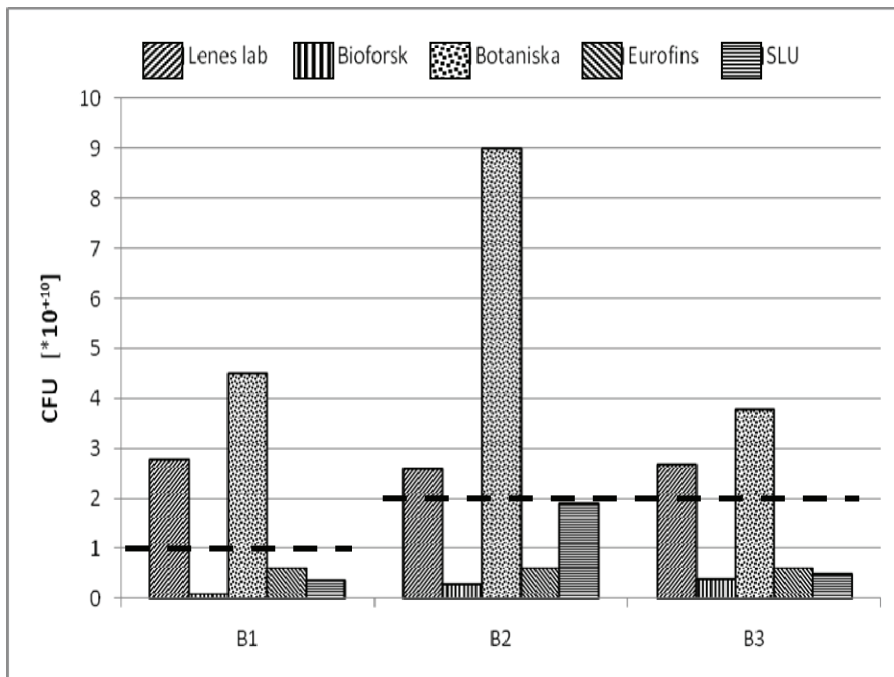
4.3 Sammanfattning av resultat

Resultaten av vitalitetstest utförda av de externa laboratorierna presenteras i Tabell 11, Tabell 12, Figur 4 och Figur 5.

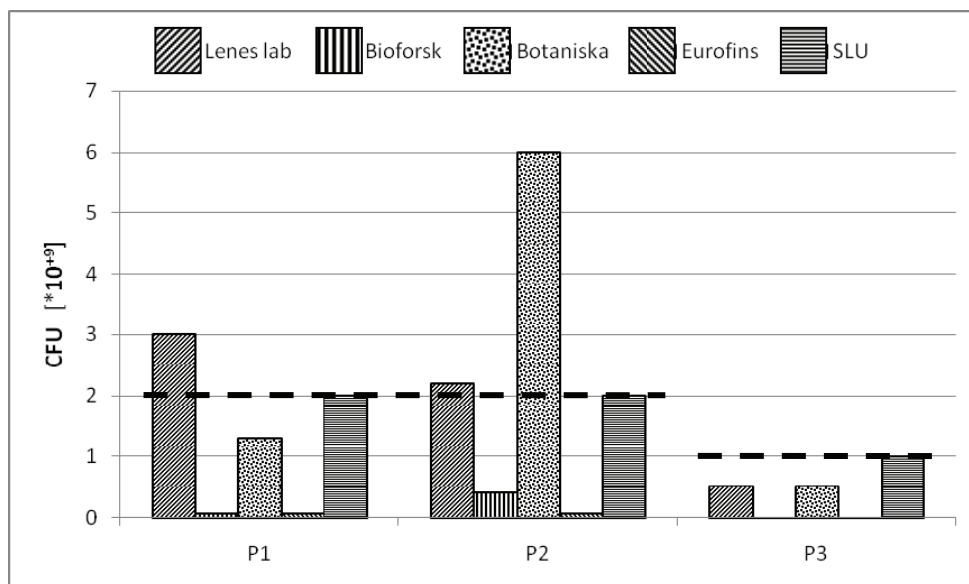
Försöken visade att resultaten från två av laboratorierna låg högt, medan de andra två visade låga resultat. Inte i något fall har ny produkt visat sig ha högre vitalitet än den gamla. Förhållandet mellan kurant produkt och de som innehåller 50 % avdödat material är inte som förväntat. se Figur 4 och Figur 5.

Tabell 11. Antal kolonibildande enheter (CFU) i proven enligt analyser av externa laboratorier

Preparat	Lenes lab CFU/ml el g	Bioforsk CFU/ml el g	Botaniska CFU/ml el g	Eurofins CFU/ml el g	Förväntat resultat CFU/ml el g
B1	$2,8 * 10^{10}$	$0,1 * 10^{10}$	$4,5 * 10^{10}$	$0,6 * 10^{10}$	$1 * 10^{10}$
B2	$2,6 * 10^{10}$	$0,3 * 10^{10}$	$9,0 * 10^{10}$	$0,6 * 10^{10}$	$2 * 10^{10}$
B3	$2,7 * 10^{10}$	$0,4 * 10^{10}$	$3,8 * 10^{10}$	$0,6 * 10^{10}$	$2 * 10^{10}$
P1	$3,0 * 10^9$	$0,05 * 10^9$	$1,3 * 10^9$	$0,06 * 10^9$	$2 * 10^9$
P2	$2,2 * 10^9$	$0,4 * 10^9$	$6,0 * 10^9$	$0,06 * 10^9$	$2 * 10^9$
P3	$0,5 * 10^9$	$0,03 * 10^9$	$0,5 * 10^9$	$0,02 * 10^9$	$1 * 10^9$



Figur 4. Resultatet av vitalitetstest för Botanicgard ES, utförda av olika laboratorier. B1 – B3 betecknar de olika proven. Full vitalitet och utspädning enligt förpackningens anvisningar borde givit: $1 \cdot 10^{+10}$; $2 \cdot 10^{+10}$ respektive $2 \cdot 10^{+10}$ CFU/ml (markerat med streckad linje).



Figur 5. Resultatet av vitalitetstest för Preferal, utförda av olika laboratorier. P1 – P3 betecknar de olika proven. Full vitalitet och utspädning enligt förpackningens anvisningar borde givit: $2 \cdot 10^{+9}$; $2 \cdot 10^{+9}$ respektive $1 \cdot 10^{+9}$ CFU/ml (markerat med streckad linje).

Tabell 12. Resultat i % av förväntat värde

Preparat	Lenes lab % av förväntat	Bioforsk % av förväntat	Botaniska % av förväntat	Eurofins % av förväntat
B1	280	10	450	60
B2	130	15	450	30
B3	135	20	189	30
P1	150	3	65	3
P2	110	20	300	3
P3	50	3	50	2

Resultaten av vitalitetstest utförda av SLU presenteras i Tabell 13, Figur 4 och Figur 5. SLU:s resultat ligger i de flesta fall lågt och överensstämmer bäst med resultat från Eurofins och Bioforsk, se Figur 4 och Figur 5. Försöken visade att den äldre Botanigården, prov B2, hade bäst vitalitet med 100 % av förväntat värde. Den nyare Botanigården, prov B3, visade betydligt lägre resultat med 25 % av förväntat värde. B1 är en blandning av B3 med kurant och avdödad produkt i förhållandet 50:50 viktsprocent. Vid försöken blev vitaliteten hos prov B1 4/5 av prov B3, men borde vara hälften. Vitaliteten hos det preparat som används vid sprutförsöken hos SLU, Botanigård B09, visade sig vara som förväntat. Pulverpreparatet Botanigård WP, B4 visade sig ha sämre vitalitet än förväntat cirka 15 %. Resultaten från försöken med Preferal visade att preparatet hade låg vitalitet generellt. Gammal produkt, Preferal P2, hade bäst vitalitet med 25 % av förväntat värde. Ny produkt, Preferal P1, hade betydligt sämre vitalitet, cirka 5 % av förväntat värde. P3 är en blandning av P1 och avdödad produkt i förhållandet 50:50 viktsprocent. Förhållandet mellan ny (P1) och delvis avdödad produkt (P3) visade sig vara som förväntat.

Tabell 13. Antal koloniformande enheter (CFU) i proven enligt analyser av SLU

Preparat	CFU/ml el g	Förväntat resultat CFU/ml el g	% av förväntat
B1	$0,4 * 10^{10}$	$1 * 10^{10}$	40
B2	$1,9 * 10^{10}$	$2 * 10^{10}$	100
B3	$0,5 * 10^{10}$	$2 * 10^{10}$	25
B4	$0,6 * 10^{10}$	$4 * 10^{10}$	15
B09	$2,0 * 10^{10}$	$2 * 10^{10}$	100
P1	$0,1 * 10^9$	$2 * 10^9$	5
P2	$0,5 * 10^9$	$2 * 10^9$	25
P3	$0,06 * 10^9$	$1 * 10^9$	6

5. Diskussion

5.1 Skillnader mellan prov från samma batch analyserat av olika laboratorier

Studien visar att ett och samma prov taget från samma batch kunde ge mycket olika resultat, beroende på vilket laboratorium som utfört analysen. Skillnader i resultat var i vissa fall cirka två tiopotenser. Skillnader mellan prov av kurant produkt och prov med inblandning av avdödat material doldes därför av de stora variationerna.

Botanigård ES är en suspension som är mycket tjockflytande. Vi har i projektet pekat på svårigheten att mäta upp detta preparat bl a genom att det fastnar i pipettspetsen. Vi har från laboratorierna fått ett antal förslag på hur problemet kan kringgås. Förslag som framkommit

har varit grundlig sköljning av pipettspetsen, låta pipettspetsen ligga kvar i lösningen och klippa av spetsen för att underlätta tömningen. Vid arbetet med testen vid SLU har vi även reflekterat över att suspension fastnar på utsidan av pipettspetsen och vilket bidrag till fel det skulle kunna ge. En fråga som kvarstår är alltså hur mycket hanteringen av detta tjocka, inhomogena preparat inverkar på variationerna.

För att försöka hitta skillnader mellan labben kan vi jämföra en analys av Botanigård, B3. Här har Lenes Lab. fått koncentrationen levande sporer lika med $2,7 \cdot 10^9$ medan SLU har fått $0,5 \cdot 10^{10}$, Botaniska analysgruppen $3,8 \cdot 10^{10}$, Eurofins $0,6 \cdot 10^{10}$ och Bioforsk $0,4 \cdot 10^{10}$. Eurofins har använt samma metod som SLU och borde få någorlunda samma resultat. Det har man fått i detta fall, men andra resultat avviker. Eurofins har inte redovisat hur man har hanterat pipettspetsen, ej heller hur man tolkat omrörning då och då, men inverkan av faktorerna är osäkra.

Inkubation har skett vid ljus och mörker vid Lenes Lab., Botaniska analysgruppen, Eurofins och SLU medan endast vid mörker vid Bioforsk. Ljustillgången kan kanske spela en viss roll, men eftersom resultaten från Bioforsk överensstämmer i detta fall relativt bra med resultaten från SLU och Eurofins så syns ljustillgången ha liten betydelse.

Temperaturen vid inkubation skiljer sig obetydligt mellan laboratorierna. Lenes Lab. inkuberade vid 24°C medan SLU, Eurofins, Botaniska analysgruppen och Bioforsk inkuberade vid 26°C . Temperaturen påverkar möjligen tillväxten, men knappast groningen vid så små temperaturskillnader.

En annan faktor som kan spela roll är luftfuktigheten. Bioforsk har angett inkubation vid 70 % RH. Inget annat laboratorium har angett någon luftfuktighet och på SLU har inte luftfuktigheten mätts.

Bioforsk skiljer sig genom att ha autoklaverat kranvattnet före spädning. På SLU har vi inte noterat några problem med föroreningar i odlingen.

Temperaturen på spädvattnet har legat mellan 16 och 17 grader hos Lenes Lab., mellan 18 och 20 hos Bioforsk och mellan 18 och 19 hos SLU. Lenes Lab. har genomgående haft något lägre temperatur på spädvattnet. Temperaturen hos spädvattnet vid Botaniska analysgruppen var mellan 20 och 22 grader. Det är oklart om temperaturen i spädvattnet påverkar groningen och tillväxt senare vid inkubation.

pH har legat mellan 6,4 och 6,5 vid Lenes Lab., på 8,6 vid Bioforsk, på 8,2 vid Botaniska analysgruppen och mellan 8,6 och 8,8 vid SLU. Inverkan av pH på resultatet utreds i ett pågående examensarbete vid SLU. En fråga är om ett högre pH påverkar tillväxten negativt eftersom de flesta av deltagande laboratorierna har höga pH-värden på sitt vatten.

Eurofins har inte meddelat temperatur eller pH på spädvattnet, ej heller luftfuktighet vid inkubation vid försöken.

En annan skillnad mellan labben som vi känner till är proceduren vid omrörning, då granulat av Preferal ska lösas i vatten. I metodförslaget står omrörning då och då under en timmes tid. Här vet vi att Lenes Lab. har rört i intervaller om 1 minut 4 gånger under 1 timme. På SLU har omrörning skett konstant under 1 timme. Vi har inte kunnat påvisa att skillnaderna i resultat skulle bero på just detta moment.

5.2 Test med olika metoder för att slamma upp Preferal WG

Testet vid SLU att slamma upp Preferalgranulat direkt i 1000 ml vatten visade på något lägre vitalitet än vid den metod som finns dokumenterad i metodbeskrivningen. Skillnaden är dock liten och variationen i resultat är större mellan olika analystillfällen än då de olika metoderna tillämpas.

5.3 Skillnader mellan samma prov vid upprepning av analysen, samt spridning mellan replikat

Resultaten från SLUs egna analyser visar stor variation mellan analys av samma prov vid olika tillfällen. Då och då kan också stora spridningar mellan replikat i samma spädning förekomma. SLUs analys av B2 vid andra tillfället är ett sådant exempel där spädning till 50 CFU gav extremt många kolonier (cirka 185 i snitt), men även stor variation mellan replikaten (std=144). Spädningen till 50 CFU gav betydligt fler kolonier än spädningen till 100, vilket är svårförklarligt då 50-spädningen har gjorts direkt ifrån 100-spädningen. Detta skulle kunna indikera att provet är inhomogent.

5.4 Skillnader mellan olika batcher

Analyserna har visat på skillnader mellan olika batcher. Vid jämförelse mellan gammal och ny Botanigard har vi sett att den nya produkten har något högre vitalitet vid analys hos Lenes lab och Bioforsk, ungefär samma vid Eurofins och betydligt lägre hos SLU, se Figur 4.

Vid jämförelse mellan gammal och ny Preferal har vi sett en högre vitalitet hos den gamla produkten än den nya vid analys hos SLU, Botaniska analysgruppen och Bioforsk. Analyser från Lenes Lab. visade något högre för ny produkt och Eurofins visade ungefär samma. Se Figur 5.

Den batch av Botanigard, B09, som använts vid sprutförsöken i SLUs växthus visade vid dessa analyser en fullgod vitalitet. Den är också den nyaste av de batcher som testats i försöken vid SLU. I jämförelse med B3, som är den så kallade nya batchen, har B09 avsevärt bättre vitalitet och i samma storleksordning som den gamla, B2. B3 har inte i någon analys visat en avsevärt högre vitalitet.

B4 är en WP-produkt som slammats upp på laboratoriet och testats av SLU den 27/11. Resultat av analysen visade att WP-produkten hade betydligt sämre vitalitet än de ES-produkter som testats, oavsett batch.

6. Slutsatser

Resultaten visar att stora variationer i analysresultat mellan laboratorier, analystillfällen och replikat förekommer. Skillnader mellan prov av kurant produkt och prov med inblandning av avdödat material framgår inte tydligt i de stora variationerna. Vissa laboratorier har fått oväntat höga resultat, där tillväxten har varit högre än vad leverantören angett. Även SLU har i enstaka spädningar i en spädningsserie fått liknande resultat. Exempelvis har en spädning som visade över 250 % av förväntat resultat framställts från en lösning som visade 95 % av förväntat resultat. Detta väcker frågan om skillnaden i resultat beror på svårigheten att mäta upp, bereda och applicera ett homogent prov. Andra frågor som kommit fram är inverkan på resultatet av vattnets temperatur och pH, omrörning vid provpreparering, inkubationsförhållanden som temperatur, ljusstillgång och luftfuktighet, samt lagringstid och lagringsförhållanden.

Samtliga laboratorier gavs tillfälle att kommentera resultaten och använda metoder, men avstod.

De stora variationerna i resultaten, även från professionella laboratorier, dominerar helhetsbilden och påverkar dessutom möjligheterna att utföra pålitliga studier av olika tänkbara yttre parametrar. Slutsatsen är att det finns flera frågor som måste utredas, innan det går att anvisa en enkel, tillförlitlig vitalitetstest av biologiska växtskyddsmedel.

7. Referenser

Danmarks Miljøstyrelse. 2005. Winding, A., Danmarks Miljøundersøgelser
Quantification and Identification of Active Micro organisms in Microbial Plant Protection
Products. Environmental Project No. 982, 2005. Elektroniskt tillgänglig;
<http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2005/87-7614-521-2/pdf/87-7614-522-0.pdf>

Nedstam, B. 2008. Personlig information. Rådgivare på Jordbruksverket, Växtskyddscentra-
len, Alnarp

SJV. Växtskydd – Växthusodlingar, 2008-07-01, Elektroniskt tillgänglig;
[http://www.sjv.se/download/18.677019f111ab5ecc5be80002625/BotaniGard+mot+bomullsmj
%C3%B6llusen+Bemisia+tabaci.pdf](http://www.sjv.se/download/18.677019f111ab5ecc5be80002625/BotaniGard+mot+bomullsmj%C3%B6llusen+Bemisia+tabaci.pdf)

Svensson, S.A., Nilsson, A., Lundell, J. & Löfkvist, K. 2008. Appliceringsteknik för
prydnadsväxter i växthus, speciellt krukväxter. Opublicerat resultat från pågående projekt.

Bilaga 1, Resultatrapport från Lenes Laboratorium

Holtum den 8. december 2008

Vedrørende tælling af sporer i BotaniGard ES, pulverformulering og Preferal WG, pulverformulering:

Prøverne er efter modtagelse opbevaret i køleskab ved 5°C indtil brug.

Prøverne er mærket B1,B2 og B3 for Botanigard ES og P1,P2 og P3 for Preferal WG.

Botanigard ES:

Fra hver prøve er udtaget 1 ml, der er opblandet i 999 ml vandværksvand, direkte fra hanen i laboratoriet. Præparatet er omrørt i 5 minutter, hvorefter opløsningen har stået i 30 minutter. Omrøring igen i 5 minutter, hvorefter blandingen er fortyndet 8 gange. På 6 petriskåle med kartoffeldextroseagar (PDA) er der udtaget 100 my liter fra fortyndingsrækken og placeret på hver petriskål. Petriskålene er placeret ved 24 °C ved 12timers lys/mørke i 4 dage, hvorefter antal kolonidannende enheder er optalt.

Problemet med at opløse det meget tyktflydende præparat er løst ved at lade pipetten ligge i selve opløsningen i 5 + 30 minutter; den tid, som det tager at lave opløsningen.

Temperatur og pH:

	T °C	pH
B1	17	6,4
B2	17	6,4
B3	20	6,4

Udregning af antal kolonidannende enheder:

Gennemsnittet af 6 petriskåle, opløftet i antal fortyndinger x 10 (100 my liter)

B1:

Antal kolonier: 30, 33, 32, 26, 24, 21=166/6=27,66
 $27,66 \times 10^8 \times 10 = 2,77 \times 10^{10} CFU.$

B2:

Antal kolonier: 28, 25, 23, 32, 22, 27 =157/6=26,1
 $26,1 \times 10^8 \times 10 = 2,61 \times 10^{10} CFU.$

B3:

Antal kolonier: 27, 29, 19, 30, 34, 23= 162/6=27
 $27 \times 10^8 \times 10 = 2,7 \times 10^{10} CFU.$

Preferal WG:

Fra hver prøve er udtaget 1g, der er opblandet i 100 ml vandværksvand, direkte fra hanen i laboratoriet. Præparatet er omrørt i 1 minut hver 15. minutter, hvorefter præparatet har stået i 20 minutter. Vandfasen er dekanteret op i 1000 ml vandværksvand fra hanen i laboratoriet, omrørt i 5 minutter og stået i 30 minutter. Præparatet er herefter fortyndet 8 gange. På 6

petriskåle med kartoffeldextroseagar (PDA) er der udtaget 100 my liter fra fortyndingsrækken og placeret på hver petriskål. Petriskålene er placeret ved 24 °C ved 12timers lys/mørke i 4 dage, hvorefter antal kolonidannende enheder er optalt.

Temperatur og pH:

	T °C	pH
P1	16	6,5
P2	17	6,5
P3	17	6,5

P1:

Antal kolonier: 4, 2, 1, 5, 2, 4=18/6=3,0
 $3,0 \times 10^8 \times 10 = 3,0 \times 10^9 \text{ CFU}$.

P2:

Antal kolonier: 3, 1, 2, 2, 3, 3=13/6=2,17
 $2,17 \times 10^8 \times 10 = 2,17 \times 10^9 \text{ CFU}$.

P3:

Antal kolonier: 0, 0, 1, 2, 0, 0= 3/6=0,5
 $0,5 \times 10^8 \times 10 = 0,5 \times 10^9 \text{ CFU}$.

Væksten i præparat P3 var præget af mange gærsvampe; derfor det lave antal kolonier af *Paecilomyces fumoroseus*, som ikke er tilfredsstillende.

Bilaga 2, Resultatrapport från Botaniska analysgruppen i Göteborg AB

Test av vitaliteten hos två biologiska växtskyddsmedel

Bakgrund

De två preparaten Botanigard ES och Preferal WG, med användning inom biologisk bekämpning, har testats med avseende på innehållet av entomopatogena svampar. Botanigard ES är en emulsion. En väl fungerande produkt skall innehålla 2×10^{10} CFU/ml av svampen *Beauveria bassiana*. Förkortningen B, som används nedan, avser detta preparat. Preferal WG är ett granulat. Preparatet förväntas innehålla 2×10^9 CFU/ml av svampen *Paecilomyces fumosoroseus*. Förkortningen P, som används nedan, avser detta preparat

Försöksupplägg

Vitaliteten hos svampsporererna i preparaten avgjordes genom att tillväxten av levande kolonier (CFU) på agarplattor studerades i ett antal olika spädningar.

Tabell 1. Försöksupplägg.

Preparat	Beteckning	Replikat (agarplattor)
B	B1	4
	B2	4
	B3	4
BP	P1	4
	P2	4
	P3	4

Metod

Förvaring av preparaten

Preparaten förvarades vid +6° fram till spädning och analys.

Gjutning av agarplattor

Det medium som användes var Potato Dextrose Agar (PDA). Ett färdigt medium innehåller 4g potatisextrakt, 20 g dextros och 15 g agar per 1000 ml vätska, med pH 5,6 ($\pm 0,2$). Mediet bereddes genom att 39 g PDA löstes i 1000 ml avjoniserat vatten under omrörning. Därefter autoklaverades agarn under 20 minuter i 121°C, och hölls sedan i petriskålar av plast. Skålarna kylades med halvöppna lock för att reducera kondensbildningen, och placerades sedan i kylskåp fram till ympningen av preparaten.

Preparering och spädning av preparat

Allt material som användes vid preparering och spädning var först steriliserat.

Spädning av preparat B:

Provet skakades under en minut. En milliliter av preparatet pipetterades i 999 ml vanligt kranvatten, omrördes med magnetomrörare i fem minuter och fick stå i 30 minuter innan fortsatt spädning. Därefter gjordes en ny omrörning. Eftersom preparatet är mycket tjockflytande, var det svårt att få ut allt ur pipettspetsen. Därför klipptes pipettspetsens ände bort, och steriliserades. Den innehöll ca 1 ml av lösning.

Spädning av preparat P:

Ett gram av preparatet vägdes upp och rördes ut i 100 ml ljummet kranvatten. Omrörning gjordes då och då under en timme, tills en tunn pasta hade bildats. Därefter fick pastan stå ytterligare en timme, så att bottensatsen lade sig. Svampsporererna förväntades nu befinna sig i den övre vattenfasen. Den dekanterades därför av, och fylldes upp till 1000 ml med vanligt kranvatten. Sedan suspensionen rörts om med hjälp av magnetomrörare under fem minuter, fick den stå ytterligare 30 minuter innan den åter omrördes, före fortsatt spädning.

Spädningsserier för preparat B.

Följande spädningar gjordes:

1. Enligt producenternas instruktion skulle det finnas 2×10^7 CFU i 1 ml av respektive lösning B1, B2 och B3 som var förberedd på den sätt som beskrivs ovan (d.v.s. spädd 1:1000). Vi spädde vidare 1 ml av var och en av lösningarna med 999 ml rent autoklaverat vatten (d.v.s. igen 1:1000) till den förväntade koncentrationen **2×10^4 CFU/ml**.
2. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 1 spädades med 999 ml rent vatten (d.v.s. igen 1:1000) till den förväntade koncentrationen **20 CFU/ml**.
3. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 1 spädades med 99 ml rent vatten (d.v.s. igen 1:100) till den förväntade koncentrationen **2×10^2 CFU/ml**. Då förväntas 0.1 ml (100 μ l) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) innehålla **20 CFU**.
4. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 2 spädades med **99 ml** rent vatten (d.v.s. 1:100) till den förväntade koncentrationen **0.2 CFU/ml**. Då förväntas 0.1 ml (100 μ l) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) innehålla **0.02 CFU**.
5. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 2 spädades med 9 ml rent vatten (d.v.s. 1:10) till den förväntade koncentrationen **2 CFU/ml**. 0,1 ml (100 μ l) (den mängd som appliceras på agarplatta) förväntades således innehålla **0.2 CFU**.

Spädningsvattnets temperatur var $+21 \pm 1^\circ\text{C}$, och pH var 8.2.

Spädningsserier för preparat P.

Följande spädningar gjordes:

1. Enligt producenternas instruktion skulle det finnas **2×10^6 CFU** i 1 ml av respektive lösning P1, P2 och P3 som var förberedd på den sätt som beskrivs ovan (d.v.s. spädd 1:1000). Vi spädde vidare 1 ml av var och en av lösningarna med 999 ml rent autoklaverat vatten (d.v.s. 1:1000) till den förväntade koncentrationen **2×10^3 CFU/ml**. 0.1 ml (100 μ l) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) förväntas innehålla **200 CFU**.
2. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 1 spädades med 999 ml rent vatten (d.v.s. igen 1:1000) till den förväntade koncentrationen **2 CFU/ml**. 0.1 ml (100 μ l) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) förväntas innehålla **0.2 CFU**.
3. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 1 spädades med 9 ml rent vatten (d.v.s. 1:10) till den förväntade koncentrationen **2×10^2 CFU/ml**. 0.1 ml (100 μ l) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) förväntas innehålla **20 CFU**.

4. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 1 späddes med **99 ml** rent vatten (d.v.s. 1:100) till den förväntade koncentrationen **20 CFU/ml**. 0.1 ml (100 µl) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) förväntas innehålla **2 CFU**.
5. 1 ml av den erhållna lösningen under punkt 2 späddes med **9 ml** rent vatten (d.v.s. 1:10) till den förväntade koncentrationen **0.2 CFU/ml**. 0.1 ml (100 µl) av denna lösning (den mängd som appliceras på agarplatta) förväntas innehålla **0.02 CFU**.

Placering av preparat på agarplattor.

Suspensionen rördes om med magnetorrörare i 5 minuter. Därefter ströks 100 µl (0,1 ml) ut på varje agarplatta. Agarplattorna förseglades med parafilm. Allt skedde under sterila förhållanden.

Inkubation.

Agarplattorna inkuberades under 26°C±1°C, och en ljusregim som växlade mellan 12 timmars ljus och 12 timmar mörker.

Resultat

Tabell 2. Förväntad och funnen koncentration i preparat B

Spädningsgrad	1 : 10 ¹¹	1 : 10 ¹⁰	1 : 10 ⁸
Förväntad koncentration:	0.02 CFU	0.2 CFU	20 CFU
B1, funnet replikat 1	0	2	40
B1, funnet replikat 2	0	1	51
B1, funnet replikat 3	0	5	38
B1, funnet replikat 4	0	2	52
medelvärde±standardavvikelse	0±0	2,5±1,7	45,3±7,3
B2, funnet replikat 1	0	–	85
B2, funnet replikat 2	1	4	102
B2, funnet replikat 3	0	6	97
B2, funnet replikat 4	2	8	76
medelvärde±standardavvikelse	0,75±0,96	6±2	90±11,7
B3, funnet replikat 1	3	3	35
B3, funnet replikat 2	3	4	55
B3, funnet replikat 3	5	2	39
B3, funnet replikat 4	1	10	22
medelvärde±standardavvikelse	3±1,6	4,75±3,6	37,8±13,6

Tabell 3. Förväntad och funnen koncentration i preparat P.

Spädningsgrad	1 : 10 ¹¹	1: 10 ¹⁰	1 : 10 ⁸	1 :10 ⁷
Förväntad koncentration:	0.02 CFU	0.2 CFU	2 CFU	20 CFU
P1, funnet replikat 1	0	0	1	17
P1, funnet replikat 2	0	0	0	9
P1, funnet replikat 3	0	0	1	11
P1, funnet replikat 4	0	0	0	15
medelvärde±standardavvikelse	0±0	0±0	0,5±0,58	13±3,7
P2, funnet replikat 1	0	0	2	57
P2, funnet replikat 2	0	0	0	62
P2, funnet replikat 3	0	0	1	70
P2, funnet replikat 4	0	0	1	49
medelvärde±standardavvikelse	0±0	0±0	1±0,82	59.5±8,82
P3, funnet replikat 1	0	0	3	7
P3, funnet replikat 2	0	0	0	3
P3, funnet replikat 3	0	0	2	4
P3, funnet replikat 4	0	0	1	7
medelvärde±standardavvikelse	0±0	0±0	1,5±1,29	5.25±2,06

Slutsats

Koncentrationen av svamp var mycket lägre än den förväntade i båda preparaten.

Bilaga 3, Resultatrapport från Bioforsk Plantehelse

Rapport på testing av vitalitet hos Botanigard ES og Preferal WG

Forsøket hadde til hensikt å teste soppsporenes vitalitet på to soppbaserte mikrobiologiske kontroll produkter, Botanigard ES og Preferal WG, gjennom utplating av preparatene på agarskåler og deretter avlesing av antall koloniformende enheter (CFU) etter innkubasjon.

Materiale og metode.

Prøvene ble oppbevart i mottatt forpakning i kjøleskap ved en temperatur på 5,5 °C fra vi mottok dem den 19.11.2008 inntil de ble testet 05.12.2008. Testen ble gjort som beskrevet i metoden "Försöksbeskrivning" (tilsendt sammen med preparatene) med unntak av at det ble brukt 24 timers mørke under innkuberingen. Det er det vi bruker som standard når vi kjører tilsvarende forsøk hos oss fordi disse soppene har sin opprinnelse fra jord, og er tilpasset mørke forhold. PDA ble laget som beskrevet i metoden, og alt materiell og kranvann som ble brukt ble autoklavert på forhånd. Preparat B var veldig tykflytende og vanskelig å få ut av pipettespissen. Problemet ble håndtert ved å løse opp preparatet i vannet brukt ved første fortynning (de 999 ml) ved å pipettere løsningen inn og ut gjentatte ganger av pipettespissen inntil det ikke var mer synlig preparat igjen i spissen.

Temperaturen på vannet som ble brukt til å røre ut preparat P i var på 18 °C. Vannet som ble brukt til fortynninger i resten av testene for preparat B og P var 20 °C og hadde pH 8,6.

Tabell 1 og 2 viser fortynningsseriene som ble gjort for B og P prøvene. For B prøvene ble det pipettert ut 0,1 ml av fortynningsseriene, 10^{-7} og 10^{-8} , på 5 agarskåler (replikater) pr prøve. For P prøvene ble det pipettert ut 0,1 ml av fortynningsseriene, 10^{-6} og 10^{-7} , også på 5 agarskåler pr prøve. De endelige fortynningene for B ble da 10^{-8} og 10^{-9} og for P ble det 10^{-7} og 10^{-8} .

Fortynningene ble platet ut på PDA skålene, forseglet med parafilm og innkubert ved 26 °C, 70 % RH og 24 h mørke. CFU's ble avlest etter 3 dager. CFUs fra 10^{-8} for B prøvene og fra 10^{-7} for P prøvene ble benyttet som beregningsgrunnlag fordi det var disse fortynningene som ga de best tellbare antall kolonier.

Tabell 1. Fortynningsserie for prøve B1, B2 og B3. Produsents oppgitte konsentrasjon på preparatet var 2×10^{10}

Fortynning av 2×10^{10}	Forventet CFU
1 ml + 999 ml	2×10^7
1 ml + 9 ml	2×10^6
1 ml + 9 ml	2×10^5
1 ml + 9 ml	2×10^4
1 ml + 9 ml	2×10^3
1 ml + 9 ml	2×10^2

Tabell 2. Fortynningsserie for prøve P1, P2 og P3. Produsents oppgitte konsentrasjon på preparatet var 2×10^9 .

Fortynning av 2×10^9		Forventet CFU
1 g + til sammen 1000 ml væske	10^{-3}	2×10^6
1 ml + 9 ml	10^{-4}	2×10^5
1 ml + 9 ml	10^{-5}	2×10^4
1 ml + 9 ml	10^{-6}	2×10^3
1 ml + 9 ml	10^{-7}	2×10^2

Resultat

Tabell 3 viser gjennomsnittlig antall CFUs for utgangsprøvene B1, B2, B3, P1, P2 og P3. Resultatet viser at alle prøvene inneholder lavere konsentrasjon av CFU enn det som er oppgitt av produsenten og som derfor er det forventede innhold i kurante produkter. Prøvene P1 og P3 hadde en mye lavere konsentrasjon enn forventet, henholdsvis $4,60 \times 10^7$ og $2,80 \times 10^7$ i forhold til 2×10^9 i kurante produkter. Et exel-regneark med alle tall fra avlesingen av de 2 fortynningene på alle agarskålene er vedlagt i tilsendt email.

Tabell 3. Antall CFU for prøvene B1, B2, B3, P1, P2, og P3

Preparat	Antall CFU per prøve ^a	Konsentrasjon oppgitt av produsent
B1	$1,22 \times 10^9$	2×10^{10}
B2	$2,72 \times 10^9$	2×10^{10}
B3	$3,98 \times 10^9$	2×10^{10}
P1	$4,60 \times 10^7$	2×10^9
P2	$3,58 \times 10^8$	2×10^9
P3	$2,80 \times 10^7$	2×10^9

a) Per ml preparat for B1, B2, B3. Per g preparat for P1, P2 og P3

Rådata

Prøve	Gj.snitt (5 agar plater) CFU's på 10^{-8} fortynning	Antall CFU/ml emulsion
B1	12,2	1,22E+09
B2	27,2	2,72E+09
B3	39,8	3,98E+09

Prøve	Gj.snitt (5 agarplater) CFU's på 10^{-7} fortynning	Antall CFU/g granulat
P1	4,6	4,60E+07
P2	35,8	3,58E+08
P3	2,8	2,80E+07

Prøve nr	Fortynning	CFU's
B1	10 -9	1
B1	10 -9	1
B1	10 -9	0
B1	10 -9	0
B1	10 -9	0
Gjennomsnitt		0,4
B1	10 -8	13
B1	10 -8	11
B1	10 -8	10
B1	10 -8	11
B1	10 -8	16
Gjennomsnitt		12,2
B2	10 -9	3
B2	10 -9	2
B2	10 -9	2
B2	10 -9	5
B2	10 -9	4
Gjennomsnitt		3,2
B2	10 -8	20
B2	10 -8	33
B2	10 -8	31
B2	10 -8	29
B2	10 -8	23
Gjennomsnitt		27,2
B3	10 -9	3
B3	10 -9	3
B3	10 -9	7
B3	10 -9	3
B3	10 -9	0
Gjennomsnitt		3,2
B3	10 -8	45
B3	10 -8	41
B3	10 -8	41
B3	10 -8	38
B3	10 -8	34
Gjennomsnitt		39,8
P1	10 -8	0
P1	10 -8	0
P1	10 -8	2
P1	10 -8	0
P1	10 -8	0

Gjennomsnitt 0,4

P1 10 -7 3

P1 10 -7 4

P1 10 -7 7

P1 10 -7 2

P1 10 -7 7

Gjennomsnitt 4,6

P2 10 -8 6

P2 10 -8 3

P2 10 -8 1

P2 10 -8 0

P2 10 -8 3

Gjennomsnitt 2,6

P2 10 -7 36

P2 10 -7 33

P2 10 -7 36

P2 10 -7 36

P2 10 -7 38

Gjennomsnitt 35,8

P3 10 -8 0

P3 10 -8 2

P3 10 -8 0

P3 10 -8 0

P3 10 -8 0

Gjennomsnitt 0,4

P3 10 -7 3

P3 10 -7 2

P3 10 -7 3

P3 10 -7 3

P3 10 -7 3

Gjennomsnitt 2,8

Bilaga 4, Resultat från Eurofins

Produkt/Varuslag Preferal WG
Anledning till provtagning Egenkontroll
Analyserna påbörjades 2008-12-09
Provtagningsdatum 2008-11-14
Provet ankom 2008-12-03
Analysrapport klar 2008-12-23
Kundnr 8476664-1415264
Journalnr EB081480-08
Analysnamn Mögel total
Enhet CFU/g
Metod/ref. NMKL 98, 2005
Mäto. Ort L
Num
Provtyp
Provets märkning P1
Resultat 60000000

Produkt/Varuslag Botanigard ES
Anledning till provtagning Egenkontroll
Analyserna påbörjades 2008-12-09
Provtagningsdatum 2008-11-14
Provet ankom 2008-12-03
Analysrapport klar 2008-12-23
Kundnr 8476664-1415264
Egenkontroll av livsmedel
Journalnr EB081479-08
Analysnamn Mögelsvampar
Enhet CFU/ml
Metod/ref.
Mäto. Ort L
Num
Provtyp
Provets märkning B3
Resultat6000000000

Produkt/Varuslag Botanigard ES
Anledning till provtagning Egenkontroll
Analyserna påbörjades 2008-12-09
Provtagningsdatum 2008-11-14
Provet ankom 2008-12-03
Analysrapport klar 2008-12-23
Kundnr 8476664-1415264
Egenkontroll av livsmedel
Journalnr EB081477-08
Analysnamn Mögelsvampar
Enhet CFU/ml
Metod/ref.
Mäto. Ort L
Num
Provtyp
Provets märkning B1
Resultat6000000000

Produkt/Varuslag Preferal WG
Anledning till provtagning Egenkontroll
Analyserna påbörjades 2008-12-09
Provtagningsdatum 2008-11-14
Provet ankom 2008-12-03
Analysrapport klar 2008-12-23
Kundnr 8476664-1415264
Egenkontroll av livsmedel
Journalnr EB081482-08
Analysnamn Mögel total

Enhet CFU/g
Metod/ref. NMKL 98, 2005
Mäto. Ort L
Num
Provtyp
Provets märkning P3
Resultat20000000

Produkt/Varuslag Preferal WG
Anledning till provtagning Egenkontroll
Analyserna påbörjades 2008-12-09
Provtagningsdatum 2008-11-14
Provet ankom 2008-12-03
Analysrapport klar 2008-12-23
Kundnr 8476664-1415264
Egenkontroll av livsmedel
Journalnr EB081481-08
Analysnamn Mögel total
Enhet CFU/g
Metod/ref. NMKL 98, 2005
Mäto. Ort L
Num
Provtyp
Provets märkning P2
Resultat55000000

Produkt/Varuslag eBotanigard ES
Anledning till provtagning Egenkontroll
Analyserna påbörjades 2008-12-09
Provtagningsdatum 2008-11-14
Provet ankom 2008-12-03
Analysrapport klar 2008-12-23
Kundnr 8476664-1415264
Egenkontroll av livsmedel
Journalnr EB081478-08
Analysnamn Mögelsvampar
Enhet CFU/ml
Metod/ref.
Mäto. Ort L
Num
Provtyp
Provets märkning B2
Resultat5500000000