

Bekæmpelsesmiddel forskning fra Miljøstyrelsen
Nr. 79 2003

Måling af bioaerosoler under udbringning af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler og ved efterfølgende arbejdsprocesser i potteplanter

Bent Löschenkohl, Karin Thygesen og Steen Lykke Nielsen
Danmarks JordbrugsForskning

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	9
1 FORMÅL	11
2 BAGGRUND	13
3 MATERIALER OG METODER	15
3.1 ANALYSE AF INDHOLDET AF LEVENDE SPORER OG RENHEDEN AF SYV MIKROBIOLOGISKE BEKÆMPELSMIDLER	15
3.2 FØRSØG 1	15
3.3 FØRSØG 2	17
3.4 FØRSØG 3	17
4 RESULTATER	19
5 DISKUSSION	23
5.1 DISKUSSION AF RESULTATERNE I RELATION TIL PROJEKTETS DELMÅL	24
5.2 PERSPEKTIVER	24
6 REFERENCER	25
BILAG: DETALJER VEDR. UDFØRELSE AF FØRSØG 1 OG 2.	27

Forord

Sideløbende med nærværende projekt, hvor koncentrationen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i luften under sprøjtninger og efterfølgende arbejdsprocesser er blevet målt i erhvervsvæksthusgartnerier, blev der i et andet projekt undersøgt om mikrobiologiske bekæmpelsesmidler kan give allergi hos væksthusearbejdere. Resultaterne af dette projekt er publiceret af Larsen, P. & Bælum, J. 2002. Sundhedsmæssige problemer ved brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i væksthuse. Bekæmpelsesmiddelforskning nr. 61, Miljøstyrelsen 2002, 25-29.

Sammenfatning og konklusioner

Formålet med projektet var at kvantificere koncentrationen af to mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i luften under og efter udbringningen. De to midler indeholdt henholdsvis svampene *Verticillium lecanii* og *Trichoderma harzianum*. Det var de levende sporer af disse to svampe, der blev registreret. Formålet var endvidere at undersøge, om der frigøres levende sporer til luften under arbejdsprocesser, som tidsmæssigt kommer efter applikationen. Derudover blev syv markedsførte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler analyseret for, om koncentrationen af levende sporer stemte overens med den af firmaet opgivne, og om der forekom andre mikroorganismer end den angivne. Til måling af levende sporer i luften blev anvendt en egenkonstrueret "impact" sporefælde, hvor luften blev suget ind gennem tre dyser, der var rettet mod tre petriskåle med et medium, som svampesporerne kunne spire på.

Resultatet af undersøgelsen af de syv mikrobiologiske bekæmpelsesmidler viste, at alle midler indeholdt den angivne mikroorganisme i renkultur. Tre af midlerne indeholdt 10^3 flere levende sporer end opgivet på etiketten. Denne "overdosering" er muligvis tilsigtet, for at give produktet en længere lagerholdbarhed, fordi der løbende sker en decimering af de levende sporer.

Resultatet af målinger af koncentrationen af *V. lecanii* under forskellige arbejdsprocesser i forbindelse med produktion af pottechrysanthemum viste, at størrelsesordenen for "colony forming units": CFU/m³ luft beregnet som tidsvægtet gennemsnit under afvejning i de to forsøg var $4,4 \times 10^4$ og $4,8 \times 10^4$. Under sprøjtning blev målt værdier fra $9,4 \times 10^3$ til $5,4 \times 10^4$. Disse værdier ligger inden for den koncentration af svampesporer, som Eduard *et al.* (2001) angiver, forårsager øje- og næseirritation (2×10^4 - 5×10^5 svampesporer pr. m³), og værdierne ligger omkring det niveau på 50×10^3 CFU/m³ svampesporer, som Gorny & Dutkiewicz (2002) foreslår som grænseværdi for erhvervsmæssig eksponering. Belastningen, som væksthusearbejdere bliver udsat for, afhænger imidlertid også af, i hvor lang tid de er udsat for høje koncentrationer. Målinger viste et meget hurtigt fald i koncentrationen af sporer i luften efter iblanding af *T. harzianum* i sphagnum, og resultaterne af måling af sporerkoncentration i luften, efter gentagne sprøjtninger med en hydraulisk sprøjte, viste en stor variation i koncentrationen af sporer i luften. Resultaterne viste således, at det tidsmæssigt var meget variabelt, hvor stor en eksponering væksthusearbejderne blev udsat for

Der blev registreret levende sporer i luften under alle øvrige arbejdsprocesser foruden under arbejdsprocesserne: Afvejning og Sprøjtning. Øvrige arbejdsprocesser omfattede aftagning af plast, der havde dækket planterne, flytning af planterne til et andet hus, planter sat på afstand, knibning og pakning. De fundne værdier var meget lave, men tilstedeværelsen af levende sporer i luften op til 10 uger efter applikationen antyder, at *V. lecanii* kan etablere sig i plantekulturen og kan vedligeholde sig. Det kan imidlertid ikke afgøres, om disse sporer var blevet frigjort til luften fra planterne under arbejdsprocesserne, eller om sporerne var udtryk for en generel

"baggrundsstøj", som stammede fra tidligere eller igangværende sprøjtninger andre steder i gartneriet.

Summary and conclusions

The aim of the project was to quantify the concentration of viable spores of two microbiological pest control agents in the air during and after application. The two microbiological control agents contained the fungi *Verticillium lecanii* and *Trichoderma harzianum* as active ingredients, respectively. Further, the aim was to investigate whether viable spores were released during working processes taking place after the application. Furthermore, seven commercial microbiological control agents were analysed for purity and concentration. Measurement of viable spores in the air was carried out using a self-made impact air sampler, collecting the spores on a fungus-growing medium.

The investigation of the seven microbiological control agents showed that all products contained the declared microorganism in pure form. In three of the products the concentration of the microorganism was up to 10^3 times higher than declared on the label.

The results of the measurements of the concentration of spores of *V. lecanii* in the air during different working processes showed that the number of colony forming units (CFU) per m^3 calculated as time weighted average during weighing of the product in two trials were $4,4 \times 10^4$ and $4,8 \times 10^4$. During application by spraying, values from $9,4 \times 10^3$ to $5,4 \times 10^4$ were recorded. These concentrations of spores are of an order that provokes eye and nose irritation (2×10^4 - 5×10^5 spores pr. m^3) according to Eduard *et al.* (2001), and the concentrations are approximately of the order of 5×10^4 CFU/ m^3 spores that Gorny & Dutkiewicz (2002) propose as occupational limit for industrial installations. However, the exposure of the glasshouse workers depends on the period of time they are exposed to high concentrations of spores.

Registrations of spores in the air immediately after mixing *T. harzianum* into peat moss showed a very quick drop of the concentration, and the results of registration of spores in the air after repeated applications showed highly variable concentrations. In conclusion the results show that the exposure of the glasshouse workers varies greatly.

Viable spores were registered in the air during all working processes besides weighing of the product and spraying. These working processes comprised removal of plastic cover from a table with plants, transport of plants to another glasshouse, spacing of plants, cutting and wrapping up the final product. During these working processes only very low concentrations of airborne spores were registered, but the presence of viable spores up to ten weeks after application indicates that *V. lecanii* is able to establish and retain itself in a plant culture. However, it was not possible to determine whether the spores were released to the air from the plants during the working processes or whether they originated from former applications in the nursery.

1 Formål

Projektets formål er:

- at kvantificere koncentrationen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i luften under og efter applikationen.
- at undersøge, om der frigøres mikrobiologisk middel til luften under arbejdsprocesser, der følger efter sprøjtning.
- at undersøge, om koncentrationen af levende sporer i markedsførte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler stemmer overens med den fra firmaet anførte.

2 Baggrund

En bioaerosol er en aerosol bestående af partikler af biologisk oprindelse eller med biologisk aktivitet, og som påvirker levende væsener gennem infektivitet, allergi, endotoksicitet eller andre processer. Partikelstørrelsen svarer til en aerodynamisk diameter på 0,5 – 100 µm. (Hirst, 1995).

Normalt er bioaerosoler luftens naturlige indhold af mikroorganismer og opstår ved vindens ophvirvling af støv, ved aktiv frigivelse af svampesporer til luften og ved indtørring af regnstænk. Indholdet af svampesporer varierer med døgnet, årstiden og naturen i det omgivende landskab.

Svampesporer i bioaerosoler i væksthuse kan stamme fra den naturlige frigørelse af svampesporer, fra svampesporer mekanisk frigjort ved arbejdsprocesser og fra sprøjtning med mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Naturlige kilder til svampesporer er døde blade nederst på planterne, hvor der ofte er sporulering af *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Botrytis cinerea* og andre svampe afhængig af planteart. Frigørelsen af mikroorganismer under arbejdsprocesser kan være stor. Dutkiewicz (1978) målte indhold af mikroorganismer (svampe og bakterier) i luften i kornlagre og møller og fandt totalværdier varierende fra $2,3 \times 10^4$ til 1.3 mill. partikler/m³. Forster *et al.* (1989) målte 2×10^5 mikroorganismer pr. m³ luft i et lokale i en sukkerfabrik, hvor roerne blev snittet i mindre stykker. Glab *et al.* (1987) angiver værdier på $9,5 \times 10^4$ til $6,9 \times 10^5$ CFU/m³ af bakterier fra 4 polske svinestalde. Nielsen og Breum (1995) angiver værdier for det totale antal mikroorganismer i luft i hønsier på $4,9 \times 10^8$ til $7,0 \times 10^8$ CFU/m³ luft. Alwis *et al.* (1999) angiver niveauet af svampesporer i luften i et savværk og en flismølle til 10^3 - 10^5 CFU/m³. Anonym (2002) målte totale antal svampesporer i forskellige arbejdsområder i et biobrændselanlæg til, i 12 ud af 14 områder, at være over 2×10^4 levende sporer/m³ luft og i 9 ud af de 14 områder til at være over ½ mill./m³. Derudover blev der registreret bakterier i luften.

Fortyndingen af bioaerosoler i væksthuse er langsom om natten og om vinteren, hvor luftvinderne er lukket. På varme dage, hvor der luftes, kan fortyndingen være hurtig.

Mikrobiologisk bekæmpelse af skadevoldere er forholdsvis nyt, og i Danmark er den kommercielle anvendelse begrænset til væksthuse. Der anvendes midler med sporer af *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Verticillium* og *Paecilomyces* til bekæmpelse af svampesygdomme og insekter. Udbringningen af præparaterne har ændret sig fra opblanding i vækstmediet til udsprøjtning. I dette forsøg blev anvendt svampene *Verticillium lecanii* og *Trichoderma harzianum*.

Ved sprøjtning rammer hovedparten af sprøjtevæsken planter og inventar, men det kan ikke undgås, at de finere dråber forbliver luftbårne og tørrer ind, og at indholdet af sporer danner bioaerosoler. En vis fraktion af små sprøjtedråber er tilstræbt, idet de ved luftens turbulens under sprøjtningen kan ramme plantedele, der ikke rammes direkte med sprøjten. Ved efterfølgende håndtering af planterne kan der ske en frigørelse af sporerne med fornyet

dannelse af bioaerosoler, typisk et andet sted i gartneriet end hvor der blev sprøjtet og under arbejdsforhold, hvor der ikke anvendes personligt værn. Der findes ikke undersøgelser af, hvorvidt de tilførte sporer vokser og danner nye sporer, der kan bidrage til nye bioaerosoler.

Ved frigørelse af svampesporer skal de gennemtrænge det stillestående grænselag, som eksisterer omkring faste overflader som f.eks. blade, for at komme ud i den turbulente luftmasse, der passivt kan føre sporerne af sted. Dette kan ske ved aktiv udskydning, som det kendes for kønnede sporer. En del svampesporer dannes i slim og spredes, når regndråber rammer sporemassen. Herved sprøjtes der sporeholdige vanddråber ud, der for *V. lecanii* er målt til op til 2 m (Williams *et al.* 1998).

Bioaerosoler kan måles med forskelligt apparatur efter forskellige principper. Ingen af metoderne er fuldkomne, og ved valg af metode må der tages hensyn til frekvensen af målinger, den målte luftvolumen, metodens fleksibilitet over for varierende koncentrationer, og ikke mindst hvor arbejdskrævende prøveudtagningen og den efterfølgende tælling og identifikation af mikroorganismene er. Ved mange af metoderne, som er rettet mod bakterier og svampe, indgår en dyrkning på agar. Herved måles kun den levende del af mikrofloraen, selvom døde mikroorganismer også kan være allergene. Specielt for bioaerosoler dannet efter sprøjtning vil mange af de indtørrede dråber rumme mere end én spore, og der dannes klumper af sporer. Ved direkte måling på agar vil en sporeklump blive registreret som én CFU (Colony Forming Unit), medens målemetoder, hvori der indgår en opløsning i vand, vil registrere de enkelte sporer i en sporeklump.

Ved målinger af bioaerosoler i forbindelse med mikrobiologisk bekæmpelse er målorganismen kendt, og, efter indledende målinger, også hvilken koncentration den kan forventes at optræde i. Da bekæmpelsen bygger på tilførsel af levende sporer, kan der under applikationerne anvendes en målemetode, der bygger på dyrkning af organismene på substrat. De svampe, der anvendes i mikrobiologiske midler i dag, kan ikke identificeres på sporer ved direkte mikroskopi, og målemetoder, der bygger på efterfølgende mikroskopi af en klæbrig flade, kan derfor ikke anvendes. Til det foreliggende projekt blev der anvendt en selvkonstrueret "impact" sporefælde.

3 Materialer og metoder

Der blev målt sporerkoncentration i luften efter sprøjtning med et mikrobiologisk middel indeholdende svampen *Verticillium lecanii* i Forsøg 1 og 2. I Forsøg 3 blev målt sporekoncentration i luften efter opblanding af et mikrobiologisk middel indeholdende svampen *Trichoderma harzianum* i et voksemedium. *V. lecanii* anvendes til at bekæmpe insektskadedyr, og *T. harzianum* anvendes til at bekæmpe plantepatogene svampe.

Der blev anvendt en sporefælde af egen konstruktion bestående af en kasse af plast, hvor 3 petriskåle stod på en porøs bund i midten. Over hver af petriskålenes centrum var der placeret en luftdyser, 2,5 cm lang og 0,9 cm i diameter, der udmundede 2,5 cm over agaroverfladen. Under den porøse bund var der en blæser, der sugede luften ud af sporefælden, og et ur. Sporefælden sugede 0,00678 m³luft pr. minut. Indledende undersøgelser viste, at en sugetid på 310 sekunder pr. måling var anvendelig i de fleste situationer (resultater ikke vist). Der blev anvendt 9 cm petriskåle med kartoffeldextroseagar (KDA) tilsat 25 ppm Novobiocin for at hæmme vækst af bakterier. Efter eksponering blev petriskålene inkuberet i 3 dage ved stuetemperatur og antal kolonier opgjort herefter.

3.1 Analyse af indholdet af levende sporer og renheden af syv mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

Syv markedsførte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler blev analyseret for koncentration af levende sporer af mikroorganismen og for renhed. Ét gram blev afvejet med 3 decimaler, opløst og fortyndet med sterilt vand til en koncentration på 25-50 CFU pr. ml., hvorefter der blev udført pladespredning på kartoffeldextroseagar for svampe og "plate count agar" (trypton-glucose-gær-agar) for midler indeholdende bakterier af slægten *Bacillus*. For svampe blev antallet af kolonier opgjort og bestemt til slægt ved mikroskopering. For *Bacillus*-midler blev antal kolonier opgjort. Afvigende kolonier blev rendyrket og bestemt til art vha. fedtsyreanalyse, idet bakteriearter hver især har en specifik fedtsyresammensætning i plasmamembranen. Undersøgelsen omfattede midlerne Supresivit, Preferal, Vectobac-12, Mycotal, Dipel, Binap og Bactimos.

3.2 Forsøg 1

Der blev målt koncentration af sporer af *V. lecanii* i luften under forskellige arbejdsprocesser i løbet af kulturperioden for pottechrysanthemum i et erhvervsvæksthusgartneri. Chrysanthemum stikkes i salgspotten, 3 stiklinger pr. potte, hvorefter de sprøjtes med *V. lecanii* mod insekter og efterfølgende dækkes med plast. Efter 10 dage har stiklingerne dannet rod, plasten tages af, og der sprøjtes igen med *V. lecanii*, hvorefter et befugtningsanlæg oversprøjter planterne med en kort vandtåge, afhængig af indstrålingen. Efter yderligere 3 dage flyttes planterne fra formeringshuset til et andet hus, sættes på afstand på borde og knibes. Efter ca. 4 uger fra stikning kortdagsbehandles

planterne for at inducere blomstring, hvorefter de pakkes og sælges 10-12 uger efter stikningen. Der blev fulgt to produktionshold med 14 dages mellemrum. Enkelte målinger blev dog foretaget på senere hold, fordi det ikke var muligt at udføre dem på det planlagte tidspunkt, eller fordi produktionsmæssige forhold ændrede kulturforløbet.

Produktionen omfattede følgende arbejdsprocesser: Afvejning, sprøjtning ved stikning, aftagning af plast, sprøjtning efter aftagning af plast, flytning af planter fra formeringshus, planter sættes på afstand, knibning og pakning.

Afvejning af det mikrobiologiske middel skete i et væksthushus, 8 x 20 m, hvor et kemikalierum på 3 x 4 m var afgrænset af 240 cm høje vægge.

Kemikalierummet havde åben forbindelse over væggene til resten af væksthuset. Ved afvejningen benyttede væksthusharbejderen gummiforklæde, gummihandsker og maske. Der blev afvejet 1 gram Mycotal og 2 gram Vertalec fra plastbøtter med låg til en skål. Derefter blev midlerne rørt op i vand ude i væksthuset, ca. 8 meter fra afvejningen og fyldt på en sprøjte. Begge de anvendte midler består af sporer af *V. lecanii* fortyndet med kaolin. Sporesugefælden blev placeret på samme bord som vægten, i ca. 50 cm afstand

Sprøjtning ved stikning skete efterhånden, som der var stukket 2-3 borde, og blev foretaget med en lille sprøjte, hvor sprøjtevæsken var under trykluft. Der blev anvendt en kort sprøjtebom med 2 dyser, Hardy 4-6 bar. Sprøjteførerer var iført gummiforklæde, gummihandsker og maske. Under sprøjtningen fortsatte arbejdet med stikning ved nabobordene, hvor 2-4 væksthusharbejdere var beskæftigede uden at bære personlige værn. Sporefælden blev placeret på et nabobord, så tæt ved sprøjtningen som praktisk muligt, i en afstand af 2-12 meter.

Aftagning af plast skete ved, at to væksthusharbejdere, i hver sin ende af bordet på ca. 9 meter, løftede platen af, rystede vandet af undersiden og pakkede platen sammen i gangen mellem bordene. Væksthusharbejderne bar ikke værn under dette arbejde undtagen handsker. Sporefælden blev placeret på et nabobord i en afstand af 2-12 meter.

Sprøjtning efter aftagning af plast blev foretaget umiddelbart efter aftagning af plast, og omfattede 20-30 borde. Sprøjtningen blev foretaget med en Hardy pumpe-sprøjte forsynet med en kort sprøjtebom med 2 dyser, Hardy 4-6 bar. Sprøjteførerer var iført gummiforklæde, gummihandsker og maske. Normalt var der ikke andre væksthusharbejdere beskæftiget i væksthuset under denne sprøjtning. Sporefælden blev placeret på et nabobord, så tæt ved sprøjtningen som praktisk muligt, i en afstand af 2-12 meter.

Flytning af planter fra formeringshus skete ved, at 1-2 væksthusharbejdere satte bakker med 12 potter på reolvogne. De nærmeste bakker blev løftet, og de fjerneste bakker på bordet blev skubbet hen til reolvognen. Reolvognen blev kørt til et andet væksthushus, og den modsatte arbejdsgang blev anvendt ved aflæsning. Der blev ikke anvendt personligt værn. Sporefælden blev placeret på naboborde, i en afstand af 2-12 meter og blev flyttet med arbejdet efterhånden som, det var praktisk muligt.

Planter blev sat på afstand ved, at 1-2 væksthusharbejdere tog potterne op af bakkerne og fordelte dem jævnt på bordet. Der blev ikke anvendt personligt værn. Sporefælden blev placeret på samme bord, eller naboborde, i en afstand

af 1-12 meter og blev flyttet med arbejdet, efterhånden som det var praktisk muligt.

Knibning skete 3-4 dage efter planterne var blevet sat på afstand og blev udført ved, at 1-4 væksthusearbejdere brækkede toppen af nyvæksten for at fremme forgrening. Der blev ikke anvendt personligt værn. Sporefælden blev placeret på samme bord eller naboborde, i en afstand af 1-12 meter og blev flyttet med arbejdet efterhånden som, det var praktisk muligt.

Pakning skete ved, at 1-3 væksthusearbejdere bar et bælte med et bundt kegleformede plastposer på maven. Med den ene hånd blev en pose åbnet, og med den anden blev en plante sat i posen, hvor den faldt det sidste lille stykke. Posen blev derefter revet fri, planten i posen blev sat i styroporbakker med plads til 12 og blev båret eller skubbet til bordenden, hvor de blev sat på reolvogn. Der blev ikke anvendt personligt værn. Sporefælden blev placeret på samme bord eller naboborde, i en afstand af 1-12 meter og blev flyttet med arbejdet efterhånden som, det var praktisk muligt.

3.3 Forsøg 2

I Forsøg 2 blev der målt sporekoncentration i luft efter sprøjtning med *V. lecanii* efter stikning af pottechrysanthemum i et erhvervsvæksthusgartneri. Alle arbejdsprocesser i forbindelse med fyldning af potter, stikning og potter sat på afstand skete samlet på et mindre område, der er en del af et større væksthuse, og som står i åben forbindelse med dette.

Chrysanthemum stikkes i 11 cm plastpotter, hvorefter de sprøjtes med et mikrobiologisk middel indeholdende *V. lecanii* med en lille sprøjte med et tryk på 4,2 bar og forsynet med en Hardy runddyse 1553-14. Sprøjtevæsken blev fremstillet ved at blande 20 g Mycotol og 40 g Vertalec og 1 l skummetmælk til 10 l vand. Der blev fremstillet sprøjtevæske en gang om ugen, hvorefter sprøjtevæsken opbevares i kølerum. Der blev sprøjtet på 3 forskellige datoer: 15. maj, 9. juni og 30. juni. På hver dato blev der udført mellem 4 og 7 sprøjtninger. Efter hver sprøjtning blev der målt sporer i luften i varierende tidslængder med den ovenfor beskrevne sporefælde.

Sprøjteføreren anvendte ikke åndedrætsværn, og der blev arbejdet ved naboborde under sprøjtningen. Der blev sprøjtet, når der var stukket 4-5 borde. Derefter blev bordene dækket med hvid plast og kørt ind i formeringsenheden. Efter 10 dage blev plasten fjernet. Bordets dimensioner var ca. 2 x 6 meter og rummede 675 potter, der stod tæt i forband.

3.4 Forsøg 3

I Forsøg 3 blev der målt sporekoncentration af *Trichoderma harzianum* i luften efter afvejning og opblanding i spagnum, der anvendes som voksemedium. Afvejning og opblanding skete i et væksthuse, 20 x 20m.

4 Resultater

Resultaterne af undersøgelsen af syv mikrobiologiske midlers indhold af levende sporer opgjort som CFU/g middel og som renhed opgjort som evt. forekomst af andre mikroorganismer, er vist i Tabel 1.

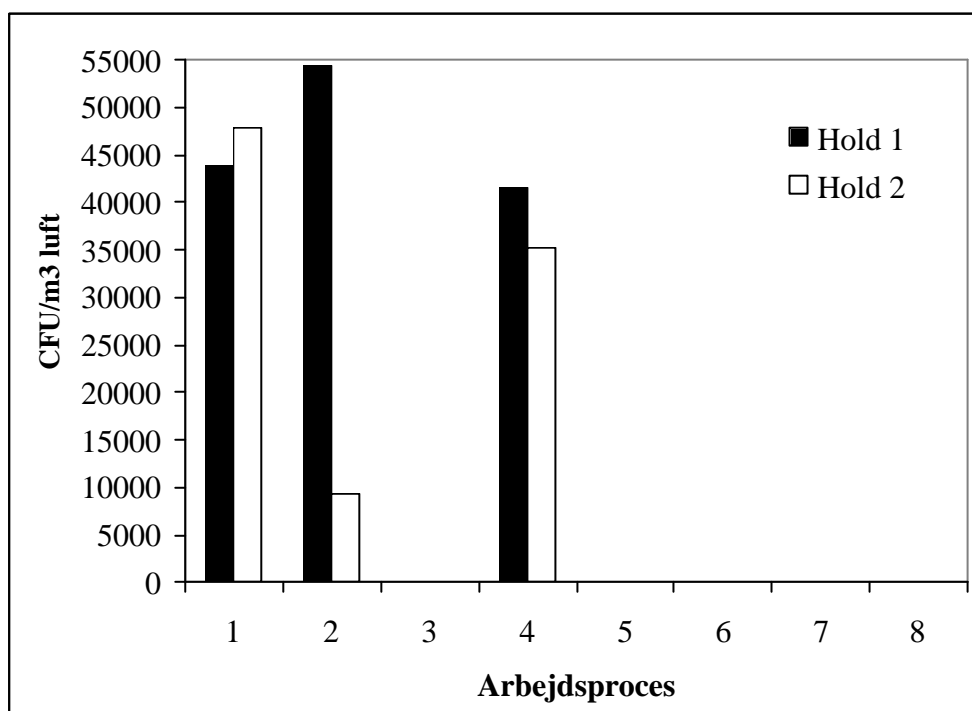
Tabel 1. Analyse af syv mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

Handelsnavn	*Opgivet cfu	Fundet cfu	Renhed
Supresivit	$1,4 \cdot 10^{10}$	$3,8 \cdot 10^{10}$	Renkultur af <i>Trichoderma</i> sp.
Preferal	$1 \cdot 10^9$	$8,2 \cdot 10^8$	Renkultur af <i>Paecilomyces</i> sp.
Vectobac-12	$1,2 \cdot 10^6$	$11 \cdot 10^9$	Renkultur af <i>Bacillus</i> sp.
Mycotal	$10 \cdot 10^{10}$	$3,8 \cdot 10^9$	Renkultur af <i>Verticillium</i> sp.
Dipel	$1,6 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^{10}$	Renkultur af <i>Bacillus</i> sp.
Binap	$1 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^7$	Renkultur af <i>Trichoderma</i> sp.
Bactimos	-	$2,6 \cdot 10^8$	Renkultur af <i>Bacillus</i> sp.

Opgivet af producenten.

Alle midler indeholdt den angivne mikroorganisme. Midlerne Vectobac-12, Dipel og Binap indeholdt 10^3 flere CFU end opgivet (tabel 1).

Resultaterne af måling af sporer af *V. lecanii* i luften under forskellige arbejdsprocesser fra Forsøg 1 er vist i Figur 1 og Tabel 2.



Figur 1. Tidsvægtet gennemsnit af CFU/m³ luft af *V. lecanii* under 8 forskellige arbejdsprocesser: Afvejning af *V. lecanii*-middel (1), Sprøjtning ved stikning (2), Plast tages af (3), Sprøjtning i forbindelse med at plast tages af (4), Flytning af planter fra formeringshus (5), Planter sat på afstand (6), Knibning (7) og Pakning (8). Der blev fulgt to hold planter med kulturstart med to ugers mellemrum (Hold 1: Sorte søjler; Hold 2: Hvide søjler).

Tabel 2. Måling af sporer af *V. lecanii* i luft angivet som CFU/m³ luft i relation til arbejdsprocesser i pottechrysanthemum, Forsøg 1.

Arbejdsproces	CFU/m ³								
	*Gen t	Ant- mål	Tid	Gnm	Min	Max	Geo	TWA	AUC
Afvejning af middel	1	5	29	42705	0	177623	2339	43774	1269467
	2	5	30	49864	0	106562	4734	47807	1434196
Sprøjtning ved stikning	1	5	31	6013	116	18704	1959	54401	167418
	2	5	27	8794	29	27811	1497	9420	254350
Plast tages af	1	13	77	2	0	29	1	1	87
	2	10	62	3	0	29	1	3	173
Sprøjtning efter roddannelse	1	6	36	41803	0	75860	6702	41637	1498925
	2	6	36	38156	1359	62446	23479	35306	1271028
Flytning af planter	1	19	122	47	0	202	81	39	4785
	2	20	135	146	0	607	30	115	15568
Planter på afstand	1	5	28	0	0	0	0	0	0
	2	10	56	107	58	145	192	107	5478
Knibning	1	14	80	118	0	173	83	117	8789
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Pakning	1	30	181	36	0	145	7	35	6129
	2	30	186	26	0	116	4	25	4640

*Gent: Gentagelse, Antmål: Antal gange sporefælden har suget luft ind, Tid: Den tidsperiode i hvilken sporefælden har udført det antal målinger, der er angivet under antmål, Gnm: Aritmetrisk gennemsnit, Min og Max: Laveste og højeste CFU-værdi registreret. Geo: Geometrisk gennemsnit, TWA: Tidsvægtet gennemsnit, AUC: Areal under kurve. -: Målinger ikke udført.

Fig. 1 giver et overblik over størrelsen af CFU/m³ luft registreret og udregnet som tidsvægtet gennemsnit, og Tabel 2 giver detaljer. Resultaterne viser, at der blev registreret de højeste CFU/m³-værdier under afvejning og sprøjtning. Der blev imidlertid også registreret sporer i luften under efterfølgende tidsmæssigt adskilte arbejdsprocesser, både under Flytning af planter, Planter sat på afstand, Knibning og Pakning. Sidstnævnte arbejdsproces lå 8 uger efter sidste behandling.

Resultaterne af Forsøg 2 er vist i Tabel 3a-c.

Tabel 3a. Måling af sporer af *V. lecanii* i luften efter syv sprøjtninger af stiklinger 15. maj, Forsøg 2.

CFU/m ³ luft							
Antal sprøjtninger	Antal målinger	Tid	Min	Max	Gnm	TWA	AUC
1	3	16	838	55392	30452	20887	334185
2	8	46	28,9	36224	4741	2178	100188
3	4	23	1359	29112	9201	5018	115423
4	12	73	0	27291	2578	1430	104394
5	5	30	405	8153	2613	1633	49002
6	3	16	231	18589	10793	8182	130919
7	2	11	347	19283	9815	5354	58890

Tabel 3b. Måling af sporer af *V. lecanii* i luften efter fire sprøjtninger af stiklinger 9. juni, Forsøg 2.

CFU/m ³ luft							
Antal sprøjtninger	Antal målinger	Tid	Min	Max	Gnm	TWA	AUC
1	10	55	28,9	9193	1677	1589	87395
2	5	27	116	29257	7297	4710	127175
3	11	68	28,9	376	131	107	7271
4	8	47	116	41977	9479	7688	361332

Tabel 3c. Måling af sporer af *V. lecanii* i luften efter fem sprøjtninger af stiklinger 30. juni, Forsøg 2.

CFU/m ³ luft							
Antal sprøjtninger	Antal målinger	Tid	Min	Max	Gnm	TWA	AUC
1	7	42	28,9	28101	5468	4721	198265
2	6	37	145	1561	463	298	11044
3	10	54	57,8	231	119	114	6172
4	8	50	0	896	242	211	10552
5	4	21	173	18907	5038	2552	53585

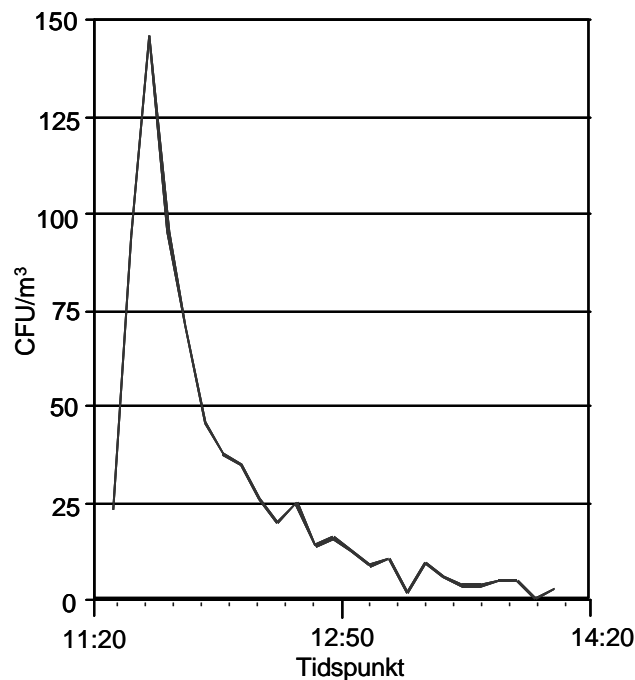
Antal målinger: Antal gange sporefælden har suget en prøve ind, Tid: Tidsperioden i hvilken sporefælden har kørt det antal gange, der er angivet under Antal målinger. Min og Max: Laveste og højeste CFU-værdi registreret. Gnm: Aritmetrisk gennemsnit, TWA: Tidsvægtet gennemsnit, AUC: Areal under kurve.

Målinger den 15. maj viste CFU/m³ udregnet som tidsvægtet gennemsnit på mellem 2178 og 20887 sporer efter sprøjtning ved alle sprøjtninger (Tabel 3a).

Målinger den 9 juni viste CFU/m³ udregnet som tidsvægtet gennemsnit på 1589, 4710 og 7688 sporer efter 3 sprøjtninger, og ingen stigning ved en enkelt mellemliggende sprøjtning (Tabel 3b).

Ved målinger den 30. juni var CFU/m³ udregnet som tidsvægtet gennemsnit efter første og sidste sprøjtning på henholdsvis 4721 og 2552. Mellem disse 2 sprøjtninger blev der udført 3 sprøjtninger, hvor der blev registreret lave sporemængder (Tabel 3c).

Resultaterne af Forsøg 3 er vist i Figur 2.



Figur 2. Koncentrationen af sporer af *T. harzianum* som CFU/m³ i luft under og efter opblanding af *T. harzianum* i voksemediet. Målingen strakte sig over 2 timer. Opblandingen startede kl. 11:23.

Ved afvejning og opblanding var sporerkoncentrationen i luften høj, hvorefter den faldt hurtigt.

5 Diskussion

Resultaterne af undersøgelsen af levende sporer i syv markedsførte mikrobiologiske midler viste store afvigelser for Vectobac-12, Dipel og Binap, hvor der blev påvist 10^3 flere CFU end opgivet af producenten. Det kan være tilsigtet, fordi der sker en decimering af antal levende sporer under lagringen. Ved at pakke en højere koncentration end opgivet på pakningen øges lagerholdbarheden.

Resultaterne fra Forsøg 1 viste, at den største koncentration af levende sporer i luften blev målt under arbejdsprocesserne: Afvejning og Sprøjtning. Størrelsesordenen for CFU/m³ beregnet som tidsvægtet gennemsnit under afvejning i de to forsøg var $4,4 \times 10^4$ og $4,8 \times 10^4$. Under sprøjtning blev målt værdier fra $9,4 \times 10^3$ til $5,4 \times 10^4$. Disse værdier ligger inden for den koncentration af svampesporer, som Eduard *et al.* (2001) angiver forårsager øje- og næseirritation ($2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ svampesporer/m³), og værdierne ligger omkring det niveau på 50×10^3 CFU/m³ svampesporer, som Gorny & Dutkiewicz (2002) foreslår som grænseværdi for erhvervsmæssig eksponering. Belastningen, som væksthusearbejderne bliver udsat for, afhænger imidlertid også af, i hvor lang tid væksthusearbejderne er udsat for høje koncentrationer. Resultatet af Forsøg 3 viste et meget hurtigt fald i koncentrationen af sporer i luften efter iblanding af et mikrobiologisk middel i sphagnum og resultaterne af måling af sporekoncentration i luften efter gentagne sprøjtninger i Forsøg 2 viste en stor variation i koncentrationen af sporer i luften. Resultaterne viste således, at det tidsmæssigt var meget variabelt, hvor stor en eksponering væksthusearbejderne blev udsat for. Den anvendte teknik til at måle sporer i luften registrerer kun levende sporer af svampe. Derved underestimeres antallet af sporer og andre mikroorganismer, som rent faktisk er tilstede. Nielsen og Breum (1995) opgjorde antallet af mikroorganismer i støv og luft i hønserier ved både at tælle det totale antal mikroorganismer ved mikroskopering og som CFU ved dyrkning og fandt, at måling vha. CFU underestimerede de reelle værdier med 5-200 gange.

I Forsøg 1 blev der registreret levende sporer i luften under alle øvrige arbejdsprocesser, der blev udført målinger under foruden Afvejning og Sprøjtning. De fundne værdier var meget lave, men tilstedeværelsen af levende sporer i luften op til 10 uger efter applikationen antyder, at *V. lecanii* kan etablere sig i plantekulturen og kan vedligeholde sig. Det kan imidlertid ikke afgøres, om disse sporer frigives til luften fra planterne under arbejdsprocesserne, eller om sporerne er udtryk for en generel baggrunds- ”støj”, som stammer fra tidligere eller igangværende sprøjtninger andre steder i gartneriet.

Under arbejdsprocessen: ”Afvejning af det mikrobiologiske middel” blev der som tidligere nævnt registreret høje CFU/m³-værdier i luften. Disse kan reduceres ved at erstatte afvejningen med at udtage den nødvendige mængde middel med en måleske i én arbejdsgang og evt. gå udendørs og gøre det.

Resultaterne fra Forsøg 2 viste en meget stor variation i, hvor mange sporer der blev frigivet til luften efter hver enkelt sprøjtning med samme koncentration af sporer. Rådata fra forsøget er desværre ufuldstændige, så det

har ikke været muligt at beregne ændringer i koncentrationen af sporer i luften over tid, som det blev gjort i Forsøg 3.

5.1 Diskussion af resultaterne i relation til projektets delmål

Delmål 1: At måle koncentrationen af et applikeret mikrobiologiske bekæmpelsesmiddel i luften over tid. Der foreligger koncentrationsmålinger af udsprøjtet *V. lecanii* fra Forsøg 2. Der var stor variation mellem de koncentrationer, der blev registreret i forbindelse med de enkelte applikationer. Ufuldstændigt datamateriale gør det imidlertid ikke muligt at følge koncentrationen af sporer i luften over tid. Der foreligger koncentrationsmålinger over tid af iblanding af *T. harzianum* i et voksemedium bestående af sphagnum fra Forsøg 3.

Delmål 2: At måle koncentrationen af et mikrobiologisk bekæmpelsesmiddel i luften under efterfølgende karakteristiske arbejdsprocesser. Der foreligger resultater for dette fra Forsøg 1. Arbejdsprocesserne, hvor der direkte blev arbejdet med det mikrobiologiske middel, nemlig ved afvejning og sprøjtning, frigav høje koncentrationer af sporer til luften. I forbindelse med de andre mellemliggende og efterfølgende arbejdsprocesser blev der målt meget lavere koncentrationer af sporer i luften. Det kan ikke afgøres, om disse sporer frigives til luften fra planterne under arbejdsprocesserne, eller om sporerne er udtryk for en generel baggrunds-”støj”, som stammer fra tidligere eller igangværende sprøjtninger andre steder i gartneriet.

Delmål 3: At måle koncentration af CFU i syv markedsførte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler: Resultater foreligger.

5.2 Perspektiver

Resultaterne viser, at der under specifikke arbejdsprocesser og i visse tidsrum kan optræde koncentrationer af levende svampesporer, som ligger over eller på grænsen til den grænseværdi for erhvervsmæssig eksponering, som Gorny & Dutkiewicz (2002) foreslår. Det er endvidere sikkert, at det totale antal mikroorganismer i luften er langt højere end det målte, som kun medtager levende svampesporer. Der er brug for yderligere undersøgelser af, i hvor lange perioder de høje koncentrationer af mikroorganismer i luften holder sig. Resultaterne fra Forsøg 1, som viste, at blev der registreret levende sporer i luften under alle arbejdsprocesser op til 10 uger efter applikationen antyder, at den applikerede svamp *V. lecanii* kan etablere sig i plantekulturen og vedligeholde sig. Hvis det er tilfældet, vil svampen også kunne opformere sig under ideelle forhold og kunne frigive levende sporer på uventede tidspunkter. Der er brug for en nærmere undersøgelse af dette forhold.

6 Referencer

Alwis, K. U., Mandryk, J. & Hocking, A.D. 1999. Exposure to biohazards in wood dust: bacteria, fungi, endotoxins, and (1→3)-β-D-Glucans. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* 14, 598-608.

Anonym 2002. Arbejdsmiljø og biobrændsler. Slutrapport. Tech-Wise & Arbejdsmiljøinstituttet. Oktober 2002.

Dutkiewicz, J. 1978. Exposure to dust-born bacteria in agriculture. I. Environmental studies. *Archives of Environmental Health* 33, 250-259.

Eduard, W., Douwes, J., Mehl, R., Heederik, D. & Melbostad, E. 2001. Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms. *Occupational & Environmental Medicine* 58, 113-118.

Forster, H.W., Crook, B., Platts, B.W., Lacey, J. & Topping, M.D. 1989. Investigation of organic aerosols generated during sugar beet slicing. *American Industrial Hygiene Association Journal* 50, 44-50.

Glab, S., Wroblewska, I., Dutkiewicz, J., Wydmunch & Z., Matuszewska, E. 1987. Microbiological air pollution in a piggery in various feeding technologies nourishment. *Medycyna Weterynaryjna* 43, 438-440.

Górny, R.F. & Dutkiewicz, J. 2002. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European Countries. *Annals of Agriculture Environmental Medicine* 9, 17-23.

Hirst, J.M. 1995. Bioaerosols: Introduction, Retrospect and Prospect. I *Bioaerosol Handbook*, Lewis Publishers, Boca Raton.

Larsen, P. & Bælum, J. 2002. Sundhedsmæssige problemer ved brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i væksthuse. *Bekæmpelsesmiddelforskning* nr. 61, Miljøstyrelsen 2002, 25-29.

Nielsen, B.H. & Breum, N.O. 1995. Exposure to air contaminants in chicken catching. *American Industrial Hygiene Association Journal* 56, 804-808.

Detaljer vedrørende udførelse af Forsøg 1 og 2.

Forsøg 1

Afvejning af V. lecanii. 1.

Sporefælden placeret på bordet, 0,5 m fra vægten. Afvejning fra kl. 8.51 – 8.53, 1 g/l Mycotal og 2 g/l Vertalec. Temperatur 16 °C.

Afvejning af V. lecanii. 2.

Sporefælden placeret på bordet, 0,5 m fra vægten. Afvejning fra kl. 7.35 – 7.40, 240 g Vertalec, 120 g Mycotal og 60 g Alar. Temperatur 16 °C.

Sprøjtning med V. lecanii efter stikning. 1.

Sporefælden placeret på bord 8. Kl. 9.23- 9.28 bruses de 3 borde med vand, der sprøjtes 9.34 – 11.46, kl. 9.39 sprøjtes nabobordet til sporefælden. Når et bord er sprøjtet, lægges der plast på. Dette sker, medens der sprøjtes. Der arbejder 5 personer 1-10 m fra sprøjtningen, sprøjteføreren inkl. Sporefælden flyttes til bord 11 kl. 9.55, bord 8 og 9 bruses kl. 11.35 og sprøjtes kl. 11.41 – 11.46. Der lægges plast på 11.47 – 11.49. Pause kl. 12.00.

Sprøjtning med V. lecanii efter stikning. 2.

Der er sprøjtet tidligere på dagen, kl. 9.15-9.30. Sporefælden placeret på bord 3. Kl. 11.40 sprøjtes bord 8 og 7, kl. 11.46 sprøjtes bord 6, og der lægges plast på fra bord 8. Der stikkes til kl. 12.00 og igen fra kl. 12.39. Kl. 13.28 vandes bord 5 og 4 med vandslange, og kl. 13.33 sprøjtes bord 4 og 5. Sprøjtningen slutter kl. 13.38, og der lægges plast på. Kl. 13.50 flyttes sporefælden til bord 2.

Plast tages af stiklinger. 1.

Pause fra 9.00-9.20. Plast tages af fra 9.20 til 9.54. I denne periode er der en del trafik med vogne gennem huset. Arbejdet foregår 1,5-8 m fra fælden. 18,1°C.

Plast tages af stiklinger. 2.

Der arbejdes ikke fra 8.45-9.18. Plast tages af fra 9.18 til 9.32, i begyndelsen ca. 10 m fra sporefælden og til slut lige ved sporefælden. Fra 9.32 til 9.47 plukkes der syge stiklinger fra de samme borde. 19°C.

Sprøjtning efter plast aftagning. 1.

Der blev knebet fra kl. 7 og taget plast af fra 8-9. Der blev sprøjtet kl. 9.30-9.38 6-20 m fra sporefælden. 18-20°C.

Sprøjtning efter plast aftagning. 2.

Hele den gamle formering sprøjtes fra 10.08 – 10.35. Ved sprøjtningens begyndelse er afstanden til sporefælden ca. 25 m. Kl. 10.31 sprøjtes der 1 m fra fælden. Ved sprøjtningens afslutning er afstanden ca. 5 m. 18,1°C.

Flytning af planter fra bord til vogn. 1.

Planterne flyttes manuelt i bakker a 12 stk.. Ingen aktivitet før flytning. Flytning starter 8.43 med pause 9.03 – 9.23. Flytning slutter 10.30. Målingerne slutter 10.37. Ved starten af flytning er der 6-8 m fra arbejdet til sporefælden. Ved slutning af flytning er der ca. 1 m. 16,7°C.

Flytning af planter fra bord til vogn. 2.

Planterne flyttes manuelt i bakker a 12 stk. To personer flytter fra 8.47-10.12 med pause 9.00-9.20. I begyndelsen ca. 6 m fra sporefælden og til sidst umiddelbart ved sporefælden. 18°C.

Flytning af planter fra vogn til bord. 1.

Planterne flyttes manuelt i bakker a 12 stk. Der flyttes planter 10.54 – 11.17. Afstanden til sporefælden er fra 8 til 1 m gennem arbejdsperioden. 19,6°C.

Flytning af planter fra vogn til bord. 2.

Planterne flyttes manuelt i bakker a 12 stk. Der flyttes planter 11.20 – 11.58. Afstanden til sporefælden er fra 8 til 1 m gennem arbejdsperioden. Der knibes 10.33-11.34 i en afstand af 8-1 m fra sporefælden. 17°C.

Knibning 1.

Der knibes 10.33-11.34 i en afstand af 8-1 m fra sporefælden Samtidig flyttes der planter på afstand fra 11.20. 17°C.

Knibning 2.

Der blev knebet fra kl. 7, taget plast af fra 8-9 og sprøjtet 9.30-9.38. Der måles fra 9.43, hvor to person kniber 2 m fra sporefælden og 2 personer 16 m fra sporefælden. Der knibes til 11.03. Gennem perioden har 4 personer knebet 5-9 m fra sporefælden. 18-20°C.

Pakning 1.

Der blev knebet fra kl. 7, taget plast af fra 8-9 og sprøjtet 9.30-9.38. Der blev pakket fra 11.22-12.37 i en afstand af 6-20 m fra sporefælden. 18-20°C.

Pakning. 2.

Variierende pakkeaktiviteter fra 9.22 til 12.00. Fra 9.22 til 10.05 pakker en person 0,5-1 m fra sporefælden. Fra 10.12 til 10.22 pakker en person ca. 9 m fra sporefælden. Fra 10.30 til 10.55 pakker 2 personer 0,5 – 6 m fra sporefælden. Fra 11.07 til 11.42 pakker 2 personer 0,5 – 10 m fra sporefælden. 18°C.

Forsøg 2

Sprøjtning med Verticillium lecanii efter stikning. 30. juni.

Der blev sprøjtet kl. 8:20, kort før målingerne startede kl. 8:30. Kl. 9:15-9:20 blev bord 1-4 sprøjtet. Pause fra kl. 9:30-9:50. Bord 5 blev sprøjtet kl. 9:58, og bord 1-3 blev sprøjtet kl. 10:35-10:40, og bord 5 kl. 10:57. Bord 1-4 blev sprøjtet kl. 11:30-11:41 og igen kl. 12:23-12:28. Der var pause fra kl. 12:30. Målingerne ophørte kl. 12:44. 23°C

Sprøjtning med Verticillium lecanii efter stikning. 9. juni.

Målingerne startede kl. 10:12 efter pause. foregående sprøjtning var kl. 9:05. Bord 1-4 blev sprøjtet kl. 11:05-11:10, og igen kl. 11:49-11:55. Bord 1 blev sprøjtet kl. 12:29. Pause kl. 12:35-13:00. Bord 2-5 sprøjtes kl. 13:38-13:43, og bord 1-2 sprøjtes kl. 14:25, hvor målingerne ophørte. 20°C

Sprøjtning med Verticillium lecanii efter stikning. 15. maj.

Målingerne startede kl. 10:20 efter en sprøjtning. Bord 1-3 blev sprøjtet kl. 11:03-11:08. Bord 4-5 blev sprøjtet kl. 11:20-11:25, og bord 1-4 igen kl. 12:01-12:07, og bord 5-6 kl. 12:31. Pause kl. 12:35-13:05. Bord 1-2 blev sprøjtet kl. 13:50 og straks efter blev der afvejet og blandet til sprøjtevæske. Bord 3-7 blev sprøjtet kl. 14:20, og bord 1-2 kl. 14:36. Målingerne standsede kl. 14:42. 23°C