

Onderzoek naar en ontwikkeling van een nieuw bacterieel biopesticide voor de biologische bestrijding van trips en spint.

Willem Jan de Kogel, Plant Research International B.V.
Willem Ravensberg, Koppert B.V.



Productschap  Tuinbouw

KOPPERT
BIOLOGICAL SYSTEMS

Onderzoek naar en ontwikkeling van een nieuw bacterieel biopesticide voor de biologische bestrijding van trips en spint.

Willem Jan de Kogel, Plant Research International B.V.
Willem Ravensberg, Koppert B.V.

Inhoudsopgave

Samenvatting.....	3
Inleiding.....	4
Onderzoek aan bacterie-isolaat A2.....	6
Onderzoek aan andere bacterie-isolaten.....	10
Vervolgonderzoek aan bacterie-isolaat J5.....	13
Algemene discussie.....	19

Samenvatting

In de periode 2003-2005 hebben Plant Research International B.V. en Koppert B.V. in nauwe samenwerking met het Productschap Tuinbouw onderzoek gedaan aan bacteriën als bestrijdingsmiddel voor insecten en mijten. De belangrijkste doel-organismen waren trips en spint, beide belangrijke plagen in diverse teelten.

Aanleiding voor het onderzoek was de vondst dat bepaalde endofyten (bacteriën die in de plant leven) hoge sterfte van trips konden veroorzaken wanneer deze insecten met de bacterie bespoten werden. Het onderzoek was erop gericht voldoende gegevens te verzamelen op grond waarvan een bacterieel pesticide tegen trips en spint ontwikkeld kon worden. In het onderzoek werden zowel gegevens over de effectiviteit van de bacteriën tegen plaag-insecten en -mijten verzameld als ook gegevens over de effecten van temperatuur, luchtvochtigheid, concentratie etc. Daarnaast is aandacht besteed aan effecten op niet-doelorganismen. Een biologisch middel moet immers veilig zijn voor mens en milieu. Bovendien moet een middel inpasbaar zijn in biologische en geïntegreerde teelt, en mag daarom bijvoorbeeld geen negatieve effecten hebben op nuttige predatoren en parasieten.

In de loop van het onderzoek zijn verschillende bacterie-isolaten onderzocht en steeds is getoetst of deze isolaten qua werking en veiligheid voldoende perspectief boden als mogelijk nieuw bestrijdingsmiddel. Uiteindelijk zijn de onderzochte bacterie-isolaten om verschillende redenen allemaal afgevalen.

Wat deze studie wel heeft opgeleverd is het inzicht dat verschillende soorten bacteriën die in of op de plant kunnen voorkomen een dodend effect op insecten en mijten kunnen hebben. Hoewel het hier beschreven onderzoek niet geresulteerd heeft in een nieuw bestrijdingsmiddel heeft het wel laten zien dat bacteriën in en op de plant in potentie grote effecten op gewasbelagers kunnen hebben.

Inleiding

Trips en spint zijn lastige plagen in diverse teelten. Zowel in siergewassen (chrysant, roos e.v.a.) als in glasgroenten (komkommer, paprika, aubergine, etc) bestaan grote problemen met de bestrijding van deze plagen. Daarnaast spelen trips- en spintproblemen een rol in diverse vollegrondsteelten zoals prei, kool en aardbei, maar ook in de teelt van bollen, boomkwekerijgewassen, groot en klein fruit.

Effectieve middelen, in het bijzonder curatieve middelen ontbreken. De problematiek met de beschikbare chemische middelen is hierin gelegen dat er middelen wegvallen en dat deze middelen vaak slecht inpasbaar zijn in geïntegreerde teelten, of dat de insecten en mijten resistentie ontwikkelen. Bij de huidige biologische gewasbescherming moeten bestrijders vaak preventief en massaal worden ingezet wat veel arbeid en hoge kosten met zich meebrengt. Bovendien grijpen de huidige biologische bestrijders voornamelijk aan op de juveniele stadia. Biologische correctiemiddelen met curatieve werking tegen (volwassen) trips en spint zijn geheel afwezig.

Bij Plant Research International (PRI) wordt onderzoek gedaan aan de ontwikkeling van innovatieve milieuvriendelijke methoden van gewasbescherming. Een van de strategieën om dat doel te bereiken is het zoeken naar nieuwe antagonisten of pathogenen van gewasbelagers (insecten, mijten). Een door PRI geïdentificeerde bron van potentieel interessante micro-organismen zijn endofyten. Endofyten zijn micro-organismen die het inwendige van de plant kunnen koloniseren. Hierbij kan verondersteld worden dat er nauwe relaties kunnen ontstaan tussen plant en endofyt die tot wederzijds voordeel kunnen leiden. Een zo'n voordeel voor de plant zou een beschermende werking tegen gewasbelagers kunnen zijn.

In een screening bij PRI zijn enkele honderden bacteriële endofyten getest op hun activiteit tegen het insect Californische trips (*Frankliniella occidentalis*). Hierbij is een klein aantal bacteriën gevonden dat in meer of mindere mate activiteit vertoont tegen trips. Eén isolaat, A2, bleek echter bijzonder actief te zijn: directe bespuiting van trips leidde tot 100% mortaliteit binnen 5 dagen. Ook bespuiting van bladmateriaal met de bacterie had hoge mortaliteit onder trips tot gevolg. Voor kasspint (*Tetranychus urticae*) bleek er een vergelijkbare activiteit te zijn. Op andere insectensoorten (bladluizen, kevers, rupsen) werd geen of een veel minder sterke activiteit gevonden. Er leek dus een bepaalde selectieve werking te zijn. Bovendien leek de werkzaamheid met name goed te zijn op volwassen trips, hetgeen als uniek beschouwd mag worden. Andere middelen en natuurlijke vijanden werken veelal alleen op de jonge stadia. Ook ten aanzien van de overdracht van virussen, die door volwassen trips wordt gedaan, is dit een belangrijk aspect.

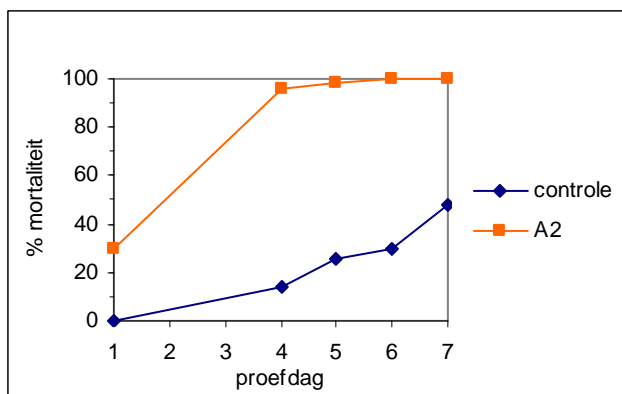
PRI heeft contact gezocht met Koppert BV, die onderzoek doet aan nieuwe biologische bestrijdingsmethoden, o.a. op het gebied van microbiologische gewasbeschermingsmiddelen. Koppert BV heeft een ruime expertise op de gebieden onderzoek, productontwikkeling, productie, toelating, vermarkting en advies op het gebied van biologische gewasbeschermingsmiddelen. PRI en Koppert hebben het Productschap Tuinbouw voorgesteld om op basis van het bovengenoemde bacterie-

isolaat A2 een onderzoek uit te voeren naar de mogelijkheden voor de ontwikkeling van een biologisch bacterieel biopesticide tegen trips en spint. Het Productschap Tuinbouw heeft dit voorstel gehonoreerd en de resultaten op hoofdlijnen van het onderzoek worden in dit verslag beschreven.

Onderzoek aan bacterie-isolaat A2

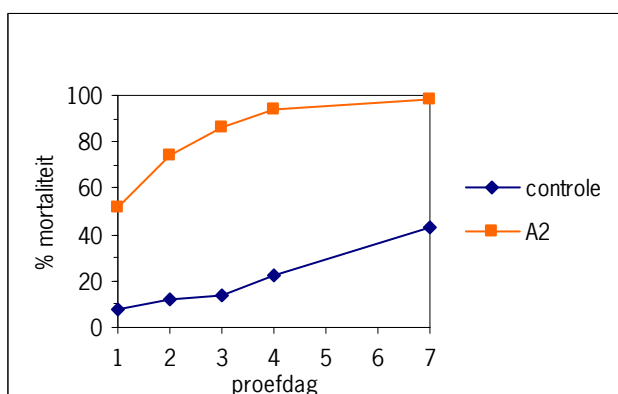
Activiteit op trips en spint

De activiteit van de A2 bacteriën op trips en spint is als volgt bepaald. De bacteriën werden opgekweekt in een vloeibare culture. Een volgroeide bacterieculture (die ongeveer 10^9 cellen per ml bevat) werd gebruikt om trips of spint mee te bespuiten. De trips of spint werd van te voren op een bladpons van een bonenblad gezet die in een petrischaal met agar was geplaatst. De petrischalen werden afgesloten en bij 21°C en 75% relatieve luchtvochtigheid (RH) bewaard (tenzij anders aangegeven). Op verschillende tijdstippen na de bespuiting werd het aantal levende en dode beesten bepaald. Uit figuur 1 blijkt dat een bespuiting van volwassen trips resulteert in 100% sterfte (mortaliteit) na 5 dagen. Bespuiting met alleen groeimedium zonder bacteriën (controle) heeft geen sterfte tot gevolg.



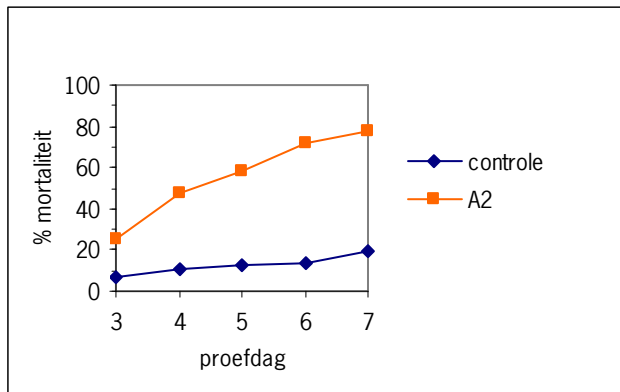
Figuur 1: Effect van een bespuiting met bacterie-isolaat A2 tegen volwassen trips vrouwtjes.

Een vergelijkbaar effect werd waargenomen bij bespuitingen van spintmijten. Wanneer spint op dezelfde manier als bij trips bespoten wordt treedt ook hier hoge sterfte op binnen enkele dagen (zie Figuur 2).



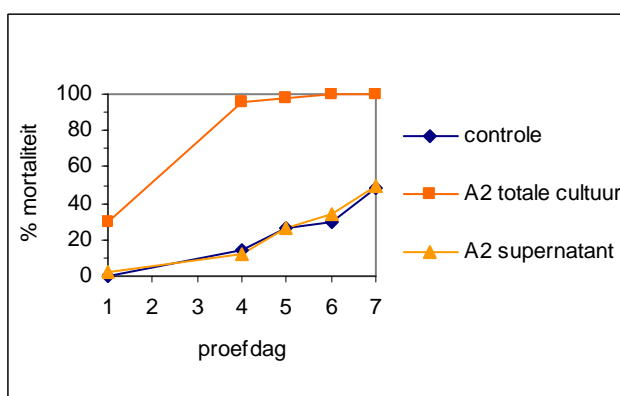
Figuur 2: Effect van een bespuiting met bacterie-isolaat A2 tegen volwassen spintmijten.

Wanneer larven van trips op deze manier behandeld worden blijkt dat deze minder gevoelig zijn dan de volwassen beesten (Figuur 3). Toch treedt ook hier een behoorlijke sterfte op.



Figuur 3: Effect van een bespuiting met bacterie-isolaat A2 tegen trips larven.

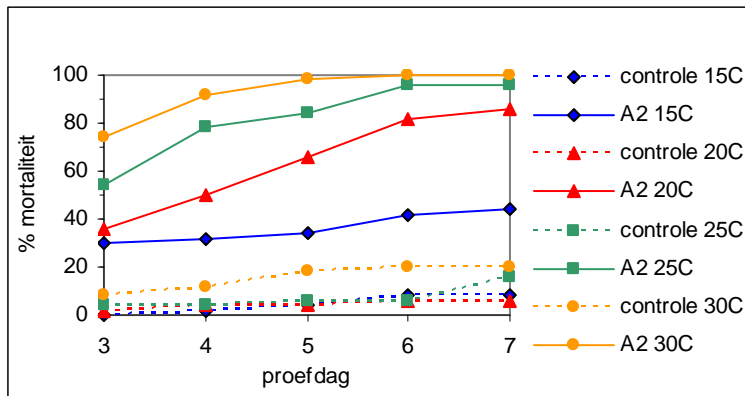
Bespuiting van zowel trips als spint met het bacterie-isolaat A2 heeft dus hoge sterfte tot gevolg, met name van de volwassen beesten. De vraag is of deze sterfte veroorzaakt wordt door de levende bacteriën of door eventuele in het medium uitgescheiden toxines. Om op deze vraag een antwoord te krijgen zijn volwassen trips bespoten met zowel een volgroeide bacterie culture (net zoals in de bovenbeschreven experimenten) als met een volgroeide culture waaruit alle bacteriecellen zijn verwijderd door middel van centrifugeren (het zogenaamde supernatant). Uit Figuur 4 blijkt dat dit supernatant (zonder bacteriecellen) geen sterfte tot gevolg heeft. Blijkbaar zijn de levende bacteriën nodig om de sterfte van de insecten te bewerkstelligen en bevat het supernatant geen actieve toxines die tripssterfte tot gevolg hebben.



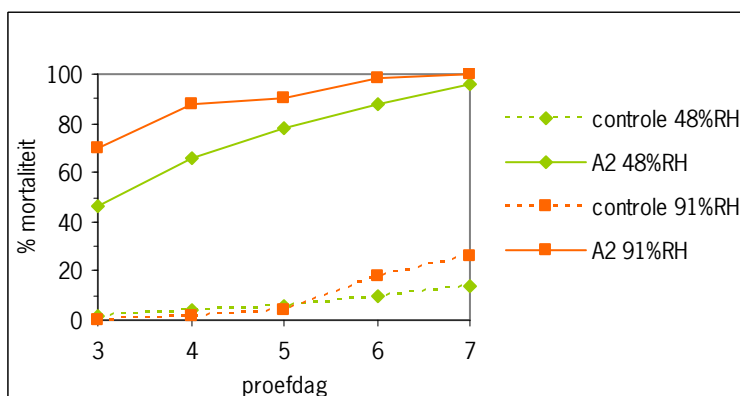
Figuur 4: Effect van een bacterieculture (met bacteriecellen) en het supernatant van een dergelijke culture (zonder bacteriecellen) tegen trips.

Uit verdere experimenten met bacterie-isolaat A2 blijkt onder andere dat het effect op trips afhankelijk is van de temperatuur (Figuur 5) en de relatieve luchtvochtigheid (Figuur

6). Hoe warmer en hoe vochtiger, hoe beter het effect op trips. Beneden de 20 graden neemt het effect sterk af. Opvallend is dat er ook bij lage luchtvochtigheid nog behoorlijke effecten op trips zijn.

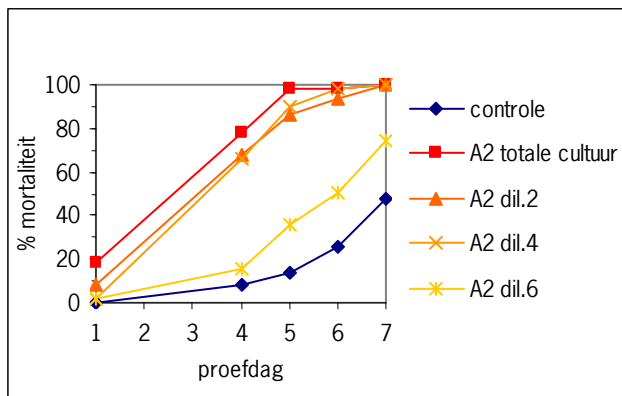


Figuur 5: Effect van temperatuur op de effectiviteit van bacterie-isolaat A2 tegen trips.



Figuur 6: Effect van luchtvochtigheid op de effectiviteit van bacterie-isolaat A2 tegen trips.

De tot nu toe beschreven experimenten maakten steeds gebruik van een volgroeide bacterie-culture die ongeveer 10^9 bacteriën per ml bevat. Vanuit praktisch oogpunt zou het goed zijn als ook lagere bacteriedichtheden effectief zijn. Om te testen of dat het geval is zijn verschillende verdunningen van de volgroeide culture getest (Figuur 7). Het blijkt dat 100- en 10.000-voudige verdunningen (dil.2 en dil.4) nog effectief zijn. Bij verdere verdunning neemt het effect af.



Figuur 7: Effect van verdunning van de bacterie-culture op de effectiviteit tegen trips.

Samenvattend blijkt uit bovenstaande experimenten een goede activiteit op trips en spint. Ook blijkt dat de bacterie effectief is onder reële omstandigheden voor wat betreft temperatuur en luchtvochtigheid. De bacterieculture kan behoorlijk verdund worden voor de toepassing. Ook bleek uit verdere experimenten dat de bacterie eenvoudig kweekbaar is en dat de houdbaarheid (shelflife) goed is. Al deze factoren zijn gunstig in verband met de ontwikkeling van een biologisch gewasbeschermingsmiddel op basis van deze bacterie.

Toxicologische aspecten voor niet-doel organismen

Naast de effectiviteit op trips en spint is het ook van belang te weten of er risico's voor niet-doel organismen zoals de mens zijn. Om dit in kaart te brengen is een toxicologische studie uitgevoerd door bureau ENVIRON. De bacterie blijkt een algemeen voorkomende bacterie te zijn waarvan lange tijd gedacht werd dat deze ongevaarlijk was voor mensen. Echter in de laatste decennia is er meer bewijs gekomen dat deze bacterie in sommige gevallen voor mensen gevaarlijk kan zijn. Dit geldt in het bijzonder voor mensen die in slechte lichamelijke conditie verkeren. Zo zijn bijvoorbeeld infecties van deze bacterie in ziekenhuizen bij mensen met een slecht functionerend immuunsysteem bekend. Er blijkt weinig bekend te zijn over welke eigenschappen van de bacterie precies betrokken zijn bij dit soort infecties.

Op grond van deze informatie, en na consultatie van de CTB helpdesk, is in gezamenlijk overleg door PT, Koppert en PRI besloten dat er teveel risico's en onzekerheden aan deze bacterie kleven om hier een registratietraject als nieuw bestrijdingsmiddel mee in te gaan.

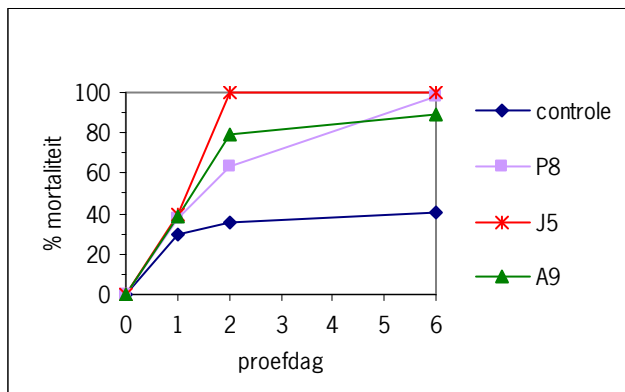
Conclusie:

No-go beslissing met betrekking tot isolaat A2.

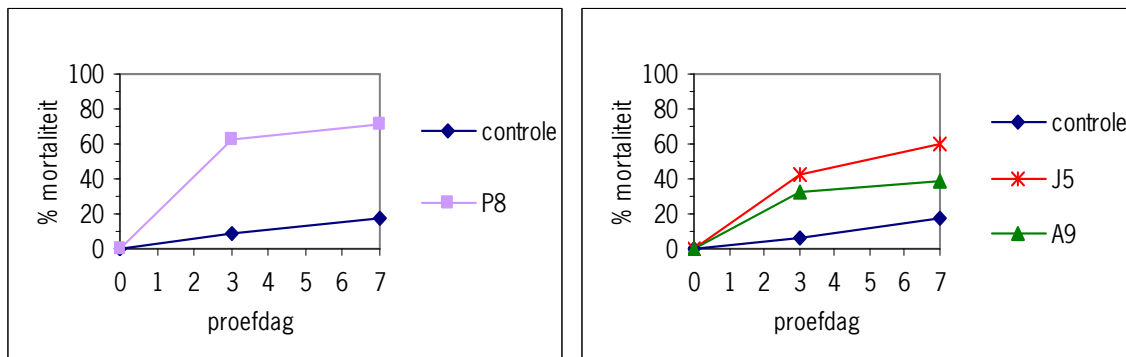
Onderzoek aan andere bacterie-isolaten

Activiteit op trips en spint

In de loop van het onderzoeksproject zijn naast isolaat A2 nog tientallen andere (voornamelijk endofytische) bacterie-isolaten getest op hun effect op trips en spint. Enkele van deze isolaten bleken effectief op spint en in beperkte mate effectief op trips te zijn. Het effect van drie van deze isolaten op volwassen spint (Figuur 8) en trips (Figuur 9) is weergegeven.

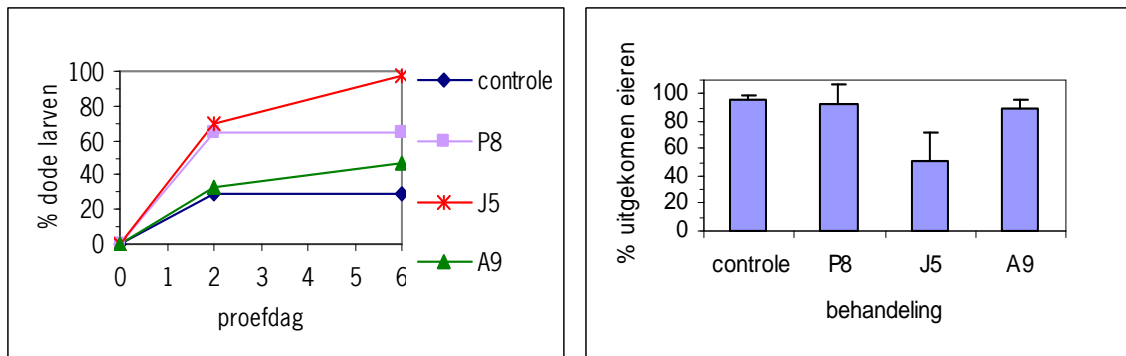


Figuur 8: Effect van bacterie-isolaten P8, J5 en A9 tegen volwassen spint.



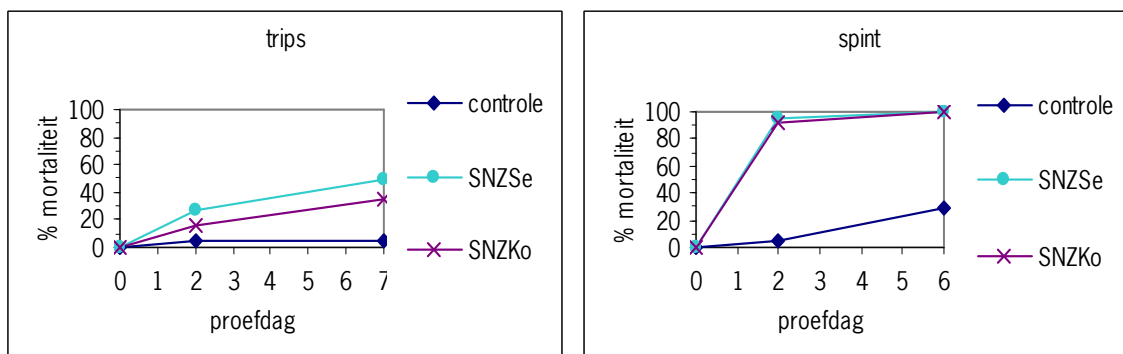
Figuur 9: Effect van bacterie-isolaten P8, J5 en A9 tegen volwassen trips.

Het effect op larven en eieren blijft, net als bij isolaat A2, achter bij het effect op volwassen beesten (Figuur 10).



Figuur 10. Effect van bacterie-isolaten P8, J5 en A9 tegen larven en eieren van spint.

Op grond van deze resultaten is besloten dat isolaat J5 voor wat betreft biologische activiteit op spint (en in mindere mate op trips) een kandidaat is voor verder onderzoek. Naast de endofytische isolaten zijn ook enkele bacterie-isolaten van andere herkomsten getoetst. De keuze voor deze bacteriën was gebaseerd op verwantschap met de bovengenoemde effectieve isolaten. Uit deze verdere toetsing kwam een tweetal bacteriën naar voren die evenals J5 goede effectiviteit tegen spint en matige activiteit tegen trips hadden (Figuur 11).



Figuur 11: Effectiviteit van bacterie-isolaten SNZKo en SNZSe tegen spint en trips.

Toxicologische aspecten voor niet-doel organismen

Op grond van bovenstaande resultaten is besloten om bureau ENVIRON een studie te laten verrichten naar de toxicologische aspecten van isolaat J5. De belangrijkste conclusie van deze studie was dat het op grond van de beschikbare toxicologische gegevens gerechtvaardigd was om het onderzoek naar eventuele productontwikkeling op basis van isolaat J5, voort te zetten. Daarbij speelde onder andere een rol dat de bacterie niet groeit bij menselijke lichaamstemperatuur (37°C), zie Tabel 1.

Tabel 1. Groei van de bacterie-isolaten bij verschillende temperaturen. Bij menselijke lichaamstemperatuur (37°C) is geen bacteriegroei meer (* =geschatte hoeveelheid).

	uitgangscultuur	overnacht cultuur	vermeerdering
25°C			
P8	10 ⁷ CFU/ml*	4.4x10 ⁹ CFU/ml	440x
J5	10 ⁷ CFU/ml*	2.4x10 ⁹ CFU/ml	240x
A9	10 ⁷ CFU/ml*	1.4x10 ⁹ CFU/ml	140x
35°C			
P8	1.4 x 10 ⁷ CFU/ml	1.8 x 10 ⁸ CFU/ml	12.9x
J5	1.7 x 10 ⁷ CFU/ml	9.9 x 10 ⁸ CFU/ml	58.2x
A9	3.5 x 10 ⁵ CFU/ml	1.5 x 10 ⁹ CFU/ml	4285x
37°C			
P8	10 ⁷ CFU/ml*	1.0x10 ⁷ CFU/ml	0x
J5	10 ⁷ CFU/ml*	3.3x10 ⁶ CFU/ml	0.33x
A9	10 ⁷ CFU/ml*	6.6x10 ³ CFU/ml	0.0066x

Op grond van deze informatie is in gezamenlijk overleg door PT, Koppert en PRI besloten om het onderzoek voort te zetten met bacterie-isolaat J5.

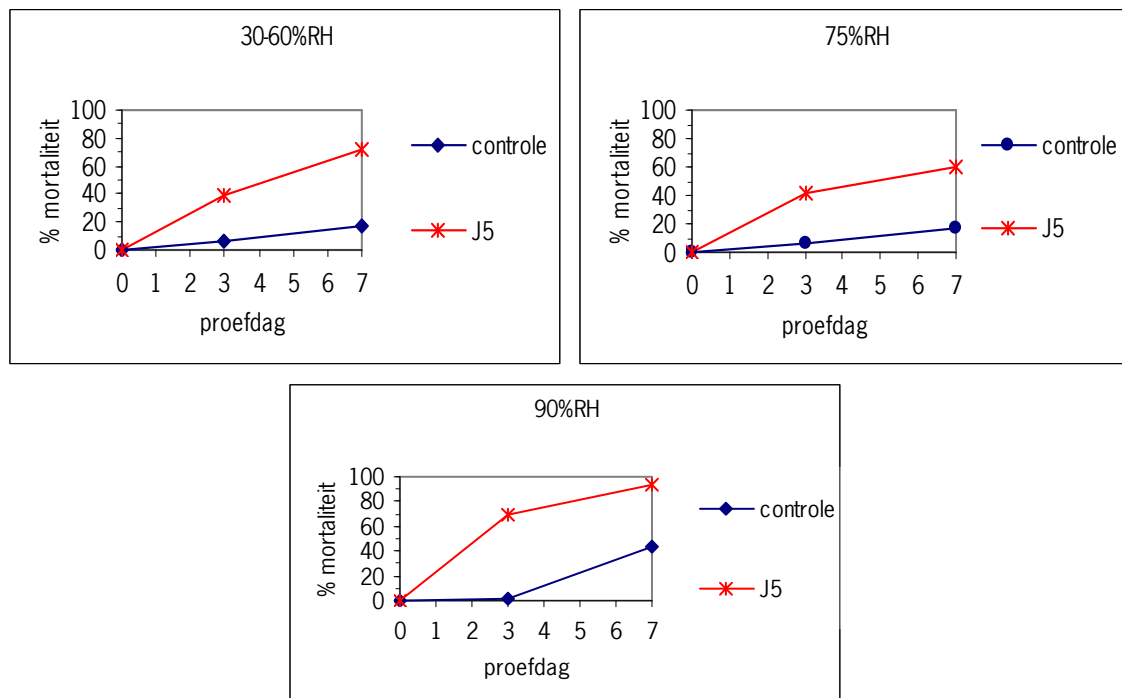
Conclusie:

Go beslissing met betrekking tot isolaat J5.

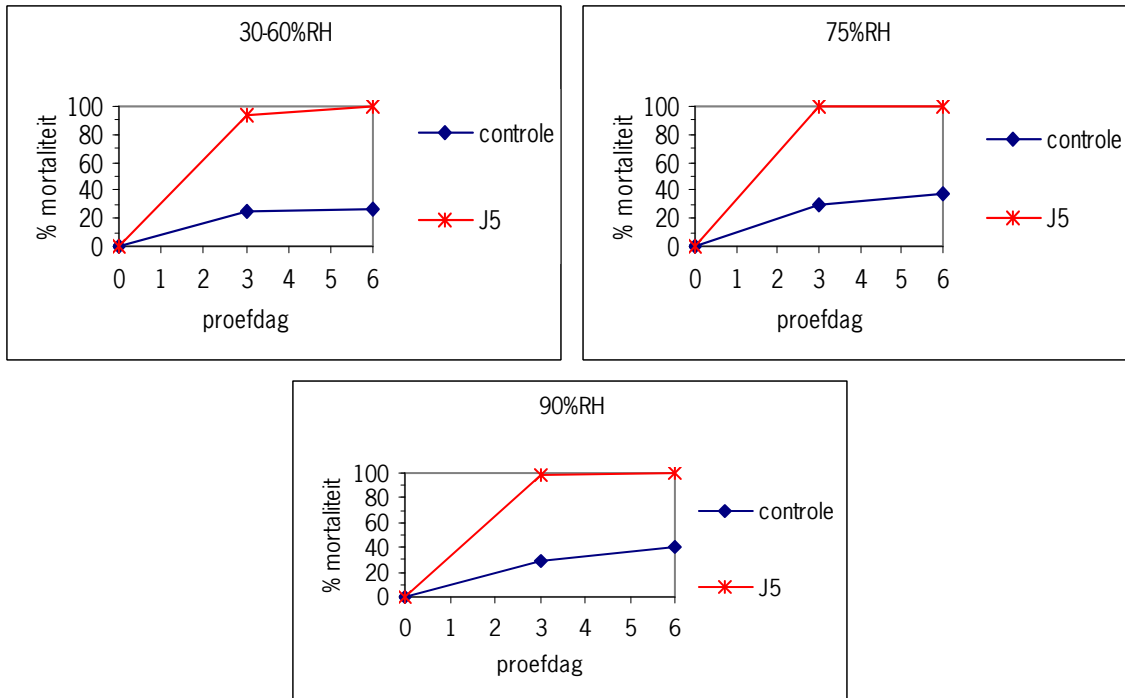
Vervolgonderzoek aan bacterie-isolaat J5

Nader onderzoek naar werking tegen trips en spint

In het vervolgonderzoek aan bacterie-isolaat J5 is onder andere aandacht besteed aan de effecten van milieuomstandigheden op de effectiviteit. Het effect van de luchtvochtigheid op de werkzaamheid van J5 tegen trips en spint is weergegeven in Figuur 12 en 13. Het blijkt dat de bacterie zowel bij lage als hoge luchtvochtigheid effectief is op spint en in mindere mate op trips.

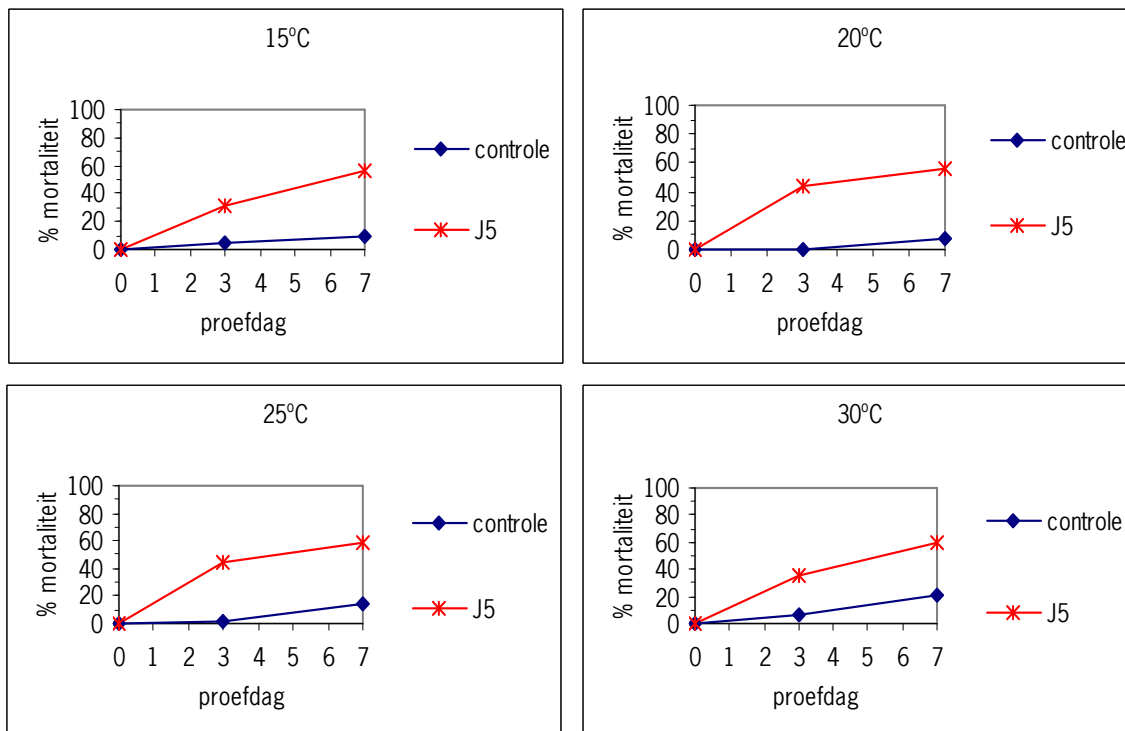


Figuur 12: Effect van luchtvochtigheid op de effectiviteit van bacterie-isolaat J5 tegen trips.



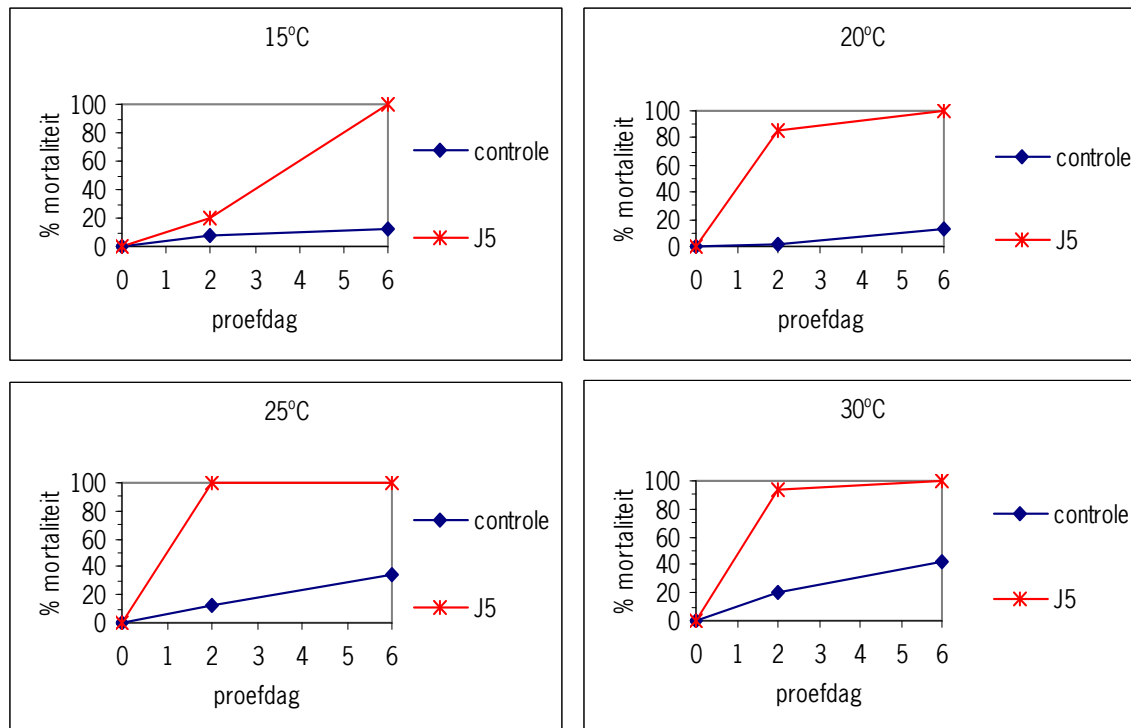
Figuur 13: Effect van luchtvochtigheid op de effectiviteit van bacterie-isolaat J5 tegen spint.

Er is weinig effect van temperatuur op de effectiviteit van bacterie-isolaat J5 op trips (Figuur 14). Bij alle geteste temperaturen gaat uiteindelijk zo'n 50-60 % van de trips dood.



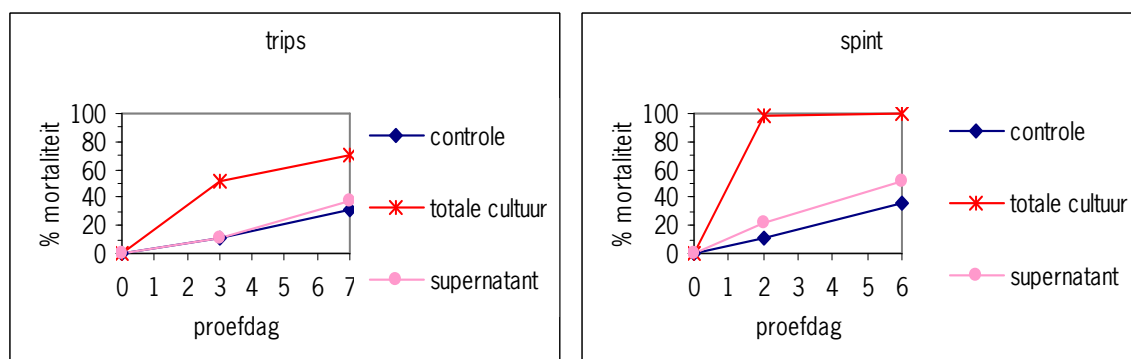
Figuur 14: Effect van temperatuur op de effectiviteit van bacterie-isolaat J5 tegen trips.

Bij het effect van temperatuur op de effectiviteit van bacterie-isolaat J5 tegen spint valt op dat bij alle testtemperaturen uiteindelijk 100% van de spint dood gaat. Wel wordt het effect sneller bereikt als de temperatuur hoger is (Figuur 15).



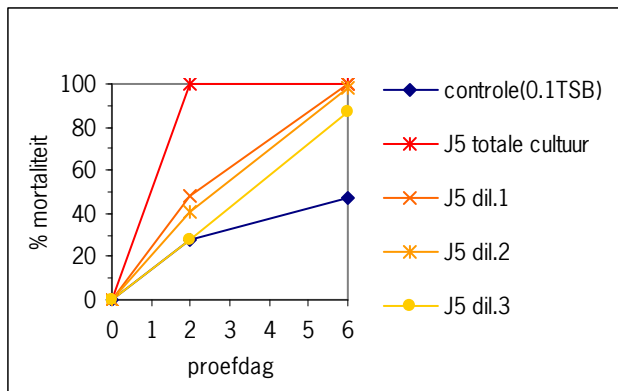
Figuur 15: Effect van temperatuur op de effectiviteit van bacterie-isolaat J5 tegen spint.

De werking van isolaat J5 berust, net als bij isolaat A2, op activiteit van de levende bacteriecellen. Het supernatant van een culture (zonder de levende cellen) is niet actief. Dat betekent dat de werking niet berust op toxines die in de culture aanwezig zijn en door de bacteriën zijn uitgescheiden (Figuur 16).



Figuur 16: Effect van een J5 bacterieculture (met bacteriecellen) en het supernatant van de culture (zonder bacteriecellen) tegen trips en spint.

Of het mogelijk is om de bacteriecultuur van J5 verder te verdunnen zonder effectiviteit te verliezen is weergegeven in Figuur 17. Het blijkt dat bij 10- of 100-voudige verdunningen (dil.1 en dil.2) nog steeds 100% doding van spint wordt bereikt. Wel duurt het langer voordat dat effect bereikt wordt. Bij een bespuiting van spint met een onverdunde culture (10^9 bacteriën per ml) is al na 2 dagen 100% van de spint dood; bij de verdunningen is op dag 2 pas ongeveer 40% dood.



Figuur 17: Effect van verdunning van een J5 bacteriecultuur op de effectiviteit tegen spint.

Effect op andere plaagorganismen

De effectiviteit van isolaat J5 is ook getest op een aantal andere plaagorganismen. De resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in Tabel 2.

Tabel 2. Effect van bacterie-isolaat J5 op verschillende plaagorganismen.

Plaagorganisme	Effectiviteit
Groene perzikluis (<i>Myzus persicae</i>)	Matig (60% doding na 6 dagen op lab-niveau)
Boterbloemluis (<i>Aulacorthum solani</i>)	Nee
Kaswittevlies (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)	Wisselend, geen effect op plantniveau
Tabakswittevlies (<i>Bemisia tabaci</i>)	Nee

Effect op natuurlijke vijanden

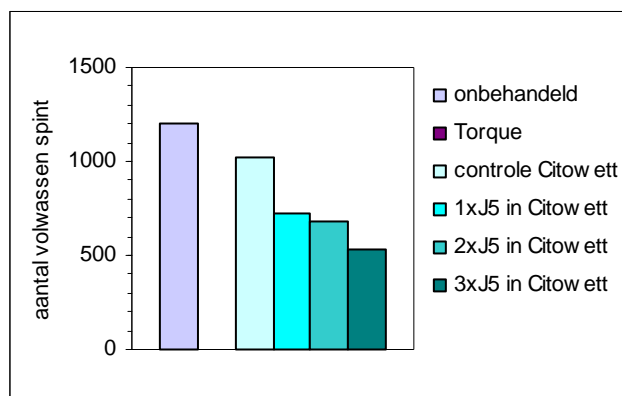
Het effect van bacterie-isolaat J5 is ook getest op enkele natuurlijke vijanden, dit in verband met de inpasbaarheid van J5 in een geïntegreerde teelt. De resultaten van deze studie staan in onderstaande tabel (Tabel 3). Op roofmijten werden geen negatieve effecten gevonden. De sluipwespen blijken echter gevoelig te zijn voor de bacterie wat aangeeft dat J5 niet of slecht te combineren zal zijn met de inzet van deze sluipwespen.

Tabel 3. Effect van bacterie-isolaat J5 op verschillende natuurlijke vijanden.

Natuurlijke vijand	Effect
Roofmijt (<i>Amblyseius cucumeris</i>)	Geen effect
Sluipwesp van witte vlieg (<i>Encarsia formosa</i>)	Hoge sterfte
Sluipwesp van bladluis (<i>Aphidius colemani</i>)	Hoge sterfte

Effect op spint op plantniveau

Het effect van bespuiting van bonenplanten die besmet zijn met spint bleek tegen te vallen. Planten waarop zich een gemengde populatie van spint bevond (volwassen beesten, larven, eieren) werden 1, 2, of 3 maal (0, 4 en 8 dagen na inzetten van de proef) bespoten met een culture van bacterie J5. Als referentie werd een eenmalige bespuiting met Torque (chemische controle) toegepast. Na 12 dagen werden de aanwezige volwassen spintmijten geteld (Figuur 18). Het maximale effect ten opzichte van onbehandelde planten is een reductie van het aantal volwassen spint met 50% (na 3 bespuitingen). Het effect van de chemische controle is 100%.



Figuur 18: Effect van 1,2 of 3 bespuitingen van spint op plantniveau met bacterie-isolaat J5. Torque is de chemische controle.

Een verklaring voor het tegenvallende resultaat ligt waarschijnlijk besloten in het feit dat er weinig effect van de bacterie is op eieren. Uit experimenten blijkt dat wanneer volwassen spinten bespoten worden met de bacterie er al binnen 2 dagen 100% doding kan worden bereikt van de volwassen spint. Toch worden ook onder die omstandigheden eitjes gelegd die gewoon uitkomen. In de bovenbeschreven proef waren zowel eieren als larven en volwassen spint aanwezig. Waarschijnlijk hebben de bespuitingen tot hoge sterfte onder de volwassen spint geleid, maar hebben de eieren (en larven) weinig last gehad van de bespuitingen.

Conclusie

Bespreking van deze resultaten door PT, Koppert en PRI hebben geleid tot de volgende conclusies.

1. Effect van J5 op volwassen spintmijten is goed.
2. Effect op plantniveau valt tegen.
3. Effect op trips en andere gewasbelagers is matig tot afwezig
4. Er is een nadelig effect van J5 op sluipwespen
5. Dit alles bij elkaar biedt te weinig perspectief om activiteiten op het gebied van productontwikkeling en toelating door te zetten.

Algemene discussie

Doelstelling van het hier beschreven project was om voldoende onderzoeksgegevens te genereren om uiteindelijk een biopesticide met voldoende werking tegen trips en spint te kunnen ontwikkelen. Dit middel zou inpasbaar moeten zijn in biologische en geïntegreerde teelt.

De doelstelling om een product te ontwikkelen is niet gehaald. In de loop van het project zijn de diverse bacteriën om verschillende redenen afgevallen. De meest effectieve bacterie A2, waar het onderzoek mee begonnen is, had goede werking op trips en spint. Deze bacterie viel echter af vanwege de onzekerheid met betrekking tot registratie en potentiële risico's voor niet-doel organismen.

Uit het vervolgonderzoek kwam een beperkt aantal bacteriën naar voren met een goede werking op spint, maar matige werking op trips. Het perspectief voor registratie van één van deze bacteriën, J5, was gunstig. Er waren op voorhand geen redenen om negatieve effecten op niet-doel organismen te verwachten. De effectiviteit op plantniveau in de kas viel echter tegen. De oorzaak hiervoor zit waarschijnlijk in het geringe effect van het middel op spint eieren. Een tweede negatieve factor was het nadelige effect op nuttige sluipwespen. Omdat er ook geen goede werking van J5 werd gevonden op andere plagen zoals bladluis en witte vlieg is besloten dat er geen perspectief als gewasbeschermingsmiddel is voor deze bacterie.

Wat deze studie wel heeft opgeleverd is het inzicht dat verschillende soorten bacteriën die in of op de plant kunnen voorkomen een dodend effect op insecten en/of mijten kunnen hebben. In hoeverre deze bacteriën planten in de natuurlijke situatie beschermen is niet bekend. Het blijkt mogelijk dit soort bacteriën van planten te isoleren, ze in kweek te brengen, en insecten er mij te doden door bespuiting. De hierboven beschreven bacteriën bleken vooral effectief tegen de volwassen levensstadia van trips en spint en zouden daarmee een welkome aanvulling kunnen vormen op bestaande biologische bestrijdingsmiddelen die vooral op de juveniele stadia (eieren, larven) aangrijpen.

Voordat een gewasbeschermingsmiddel in de praktijk gebruikt kan worden moet het eerst officieel toegelaten worden. Dit geldt ook voor biologische middelen. Dit zijn kostbare en langdurige procedures waarbij succes niet vooraf verzekerd is. Wil een fabrikant een dergelijke procedure starten dan moet er vooraf vertrouwen zijn dat het middel:

- effectief en robuust is
- een behoorlijke markt bedient
- veilig is
- tegen een redelijke kostprijs produceerbaar is
- een bepaalde houdbaarheid heeft

Bij het onderzoek naar de bacteriën zijn deze aspecten steeds aan de orde geweest en gebruikt bij de afweging het onderzoek aan een bepaalde bacterie voort te zetten dan wel te stoppen. Uiteindelijk heeft geen van de onderzochte bacteriën positief gescoord op al deze punten.