



# Ringrotbestrijding met behulp van ozon

Jan van der Wolf, Jan Bergervoet, Pieter Kastelein & Patricia van der Zouwen







# Ringrotbestrijding met behulp van ozon

Jan van der Wolf, Jan Bergervoet, Pieter Kastelein & Patricia van der Zouwen

© 2009 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 – 48 60 01  
Fax : 0317 – 41 80 94  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
Inleiding	1
Uitvoering en resultaten	2
Methoden en resultaten	3
Conclusies en discussie	8

# Inleiding

Fust (zoals aardappelkisten) speelt een rol bij de verspreiding en overleving van quarantaine organismen zoals ringrot. Onderzoek in de VS en Duitsland heeft aangetoond dat ringrotbacteriën zich maanden tot wel enkele jaren in stand houden op droge kisten, waardoor via de kisten nieuwe partijen besmet kunnen raken.

In het maatregelenpakket ter bestrijding van quarantaine organismen op besmette bedrijven stelt de overheid eisen aan het schoonmaken en ontsmetten van kisten. Daarnaast is kistenreiniging en ontsmetting als preventieve bedrijfshygiënische maatregel van belang om de ongemerkte uitbreiding van quarantaine organismen een halt toe te roepen.

Bij de inventarisatie van kistenreinigingsmethoden bleek geen geschikte machine aanwezig. De kistenreinigingsmachines zijn ofwel gebaseerd op het gebruik van grote hoeveelheden schoon bronwater, ofwel op het gebruik van recirculerend water. Alleen het handmatig reinigen (met een stoomcleaner) en ontsmetten (met een spuit) blijft als mogelijkheid over. Hoewel dit goed kan werken is standaardisatie en handhaving van deze methode lastig. Per bedrijf moeten soms duizenden kisten schoongemaakt en ontsmet worden. Bovendien is het preventief inzetten van deze methode voor veel telers niet aantrekkelijk omdat deze methode zeer arbeidsintensief is.

Door het kistenreinigingsbedrijf van Frans Renne wordt een nieuwe kistenreinigingsmachine ontwikkeld die de hierboven geschetste bezwaren zou kunnen ondervangen. De methode is gebaseerd op ontsmetting met Ozon ( $O_3$ ) van recirculerend spoelwater en van kisten. De ozon wordt geproduceerd door een ozongenerator.

Er is geen directe informatie over het effect van ozon op ringrot. In de EPPO richtlijnen voor de bestrijding van ringrot wordt ozon niet genoemd. Wel is enige informatie over *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (een nauw verwante bacterie) waarbij bij een concentratie van 1,1 mg/liter gedurende 5 minuten 99,9% doding werd aangetoond.

Van ozon is bekend dat het een brede ontsmettende werking heeft. Organische belasting van water heeft invloed op de effectiviteit van ozon. Qua praktijk is ozon wel ideaal omdat het direct kan worden opgewekt en geen residuen in het milieu achterlaat. Ook is deze methode geschikt voor de biologische teelt.

De volgende aspecten dienen onderzocht te worden om een effectieve toepassing mogelijk te maken.

1. Het effect van ozon op ringrotbacteriën en de noodzakelijke dosering en inwerktijd (laboratorium)
2. Het effect van ozon op hout van transportkisten die besmet zijn met ringrotbacteriën (laboratorium)
3. Het effect van ozon in organisch belast (maar d.m.v. filtering gereinigd) spoelwater (semi-praktijk)
4. Effectiviteit van ozon voor de bestrijding van ringrot in een proefopstelling van de kistenreiniger van Renne
5. Ontwikkelen van een toetsmethode om naleving van de voorgeschreven reinigings- en ontsmettingsmethoden te kunnen controleren
6. Opstellen van de richtlijnen en randvoorwaarden bij reinigings- en ontsmettingsprotocollen.

Binnen dit (deel)project werden de kennisvragen 1 en 3 beantwoord.

## Uitvoering en resultaten

De experimenten in het kader van de onderzoeksvragen 1 en 3, waarin het effect van ozon op *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) in kraanwater en in organisch belast spoelwater wordt bepaald, worden uitgevoerd onder gnotobiotische omstandigheden in het laboratorium. Deze experimenten hebben tot doel, inzicht te verkrijgen in de effectiviteit van ozon voor de ontsmetting van water nadat hiermee kuubskisten zijn gereinigd. De effecten van ozonconcentratie en inwerktijd worden in afzonderlijke experimenten onderzocht. Alle labexperimenten met drie herhalingen worden twee keer uitgevoerd.

De proeven zijn ook uitgevoerd met het niet-quarantaine organisme *Dickeya* spp. (= *Erwinia chrysanthemi*). Dit is gedaan om te kijken of *Dickeya* spp. in experimenten buiten ingeperkte ruimtes in plaats van Cms gebruikt kan worden.

Het effect van behandelingen wordt bepaald m.b.v. uitplaten op agar medium en m.b.v. een vitaliteitskleuring in combinatie met flow cytometrie (FCM). Deze laatste techniek biedt de mogelijkheid om snel de verhouding dode en levende cellen te bepalen. Ook zal het levende, maar niet kweekbare bacteriën kunnen detecteren. M.b.t. de laatst genoemde techniek voor bepaling van het effect van de behandelingen zullen ook de resultaten gerapporteerd worden van het onderzoek waarop geschiktheid van die methode voor levend/dood bepaling gebaseerd is. In het bijzonder gaat het daarbij om de bepaling levend/dood van ringrot in combinatie met neutralisatiestap direct na antioxidant behandeling.

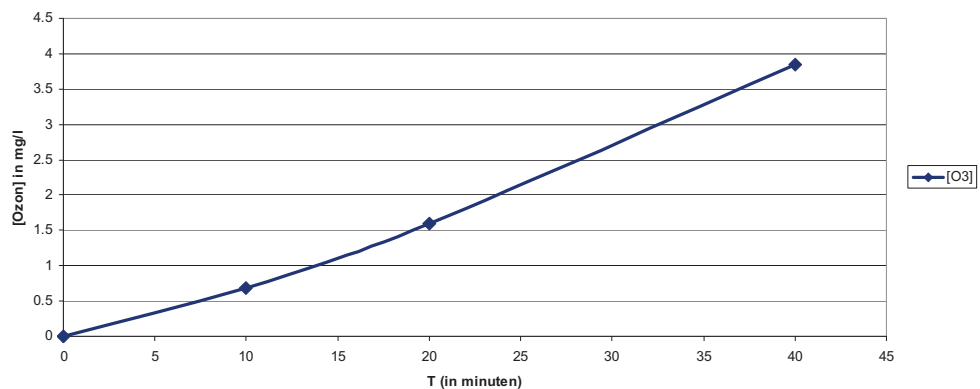
## Methoden en resultaten



Figuur 1. Ozongenerator (Excellent, Eerbeek).

### Productie van ozon in water

Het concentratie verloop van ozon in water met een ozon generator van Excellent (Eerbeek) (Fig. 1) werd eerst vastgesteld. De maximale concentratie werd bij een temperatuur van ca. 10 °C, bereikt na 40 minuten (Fig. 2).



Figuur 2. Concentratieverloop van ozon in water bij een temperatuur van 10 °C.



### Effect 0.1 N natriumsulfiet ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) op de vitaliteit van Dickeya en Cms

Om in tijdstudies ozon te neutraliseren kan volgens de literatuur de reductor natriumsulfiet gebruikt worden. Het effect van het neutralisatiemiddel op de vitaliteit van Cms en Dickeya werd onderzocht. In sommige experimenten werd wel in andere geen afkleding van cellen door natriumsulfiet gemeten. In Tabel 1 zijn de resultaten vermeld van het experiment waarin wel een negatief effect werd gevonden. Voor het verwijderen van ozon werd daarom een alternatieve methode gebruikt waarbij een aantal malen hard werd geschud om het ozongas te laten ontsnappen aan het water (Hassenberg *et al.*, 2008). Na schudden daalde de ozonconcentratie van ca. 3.8 naar minder dan 0.8 mg/ml.

Tabel 1. Effect van natriumsulfiet op de vitaliteit van Dickeya en Cms in water.

Ozon (mg/L)	Microorganismen [ $1 \cdot 10^9$ ]		Kraanwater	
	Dickeya		Cms	
			+ Na sulfiet	+ Na sulfite
0	+	0	+	0
3.8	+	0	+	0

### Effect op spoelwater

Spoelwater (ontvangen van Renne Kistenreiniging) werd gamma-gesteriliseerd om achtergrondbacteriën te doden. De sterilisatie werd gecontroleerd m.b.v. gietplaten in TSA. Direct na sterilisatie groeiden er geen bacteriën uit. Echter, na bewaring, bleken er toch bacteriën te groeien. Blijkbaar hebben (sporevormende?) bacteriën de behandeling overleefd. Het spoelwater is daarom ook nog eens geautoclaveerd. Daarna konden er geen kolonievormende bacteriën meer worden gevonden in spoelwater. Bacteriën werden toegevoegd aan spoelwater waarin het organisch materiaal 0.5, 1, 2 en 4 maal was geconcentreerd. Ook is het supernatant van het spoelwater getoetst, hierbij zijn alle grove delen d.m.v. centrifugering verwijderd (100.000G gedurende 20 minuten).

Het spoelwater werd getoetst bij een vaste behandelingstijd van 5 minuten en bij concentraties ozon van 0, 0.9, 1.9, 2.8 en 3.8 mg/L. Ozon werd opgewekt met een ozon generator (Excellent Ozon Systems, Eerbeek), in een reservoir van 60 liter en een temperatuur van 10 °C ( $\pm 2$ ).

De resultaten zijn samengevat in Tabel 2. Ozon is in geen enkele concentratie effectief gebleken, niet tegen Dickeya en niet tegen Cms. Ook in het supernatant bleek de behandeling niet afdoende. Mennoclean (2%  $\text{v/v}$ ) en waterstofperoxide (0.05%  $\text{v/v}$ ), twee bactericide producten, doodden wel alle bacteriën zowel in 1 maal geconcentreerd spoelwater als in kraanwater.



## Effect op kraanwater

Behandeling van suspensies in kraanwater met ozon leidde na 30 seconden alleen bij de hoogste concentratie (3 mg/L) tot een sterke afname van de aantallen kolonievormende bacteriën (Tabel 4). Na 5 minuten gaf kraanwater met een hoge concentratie ozon van 3 mg/L ozon een totale afdoding van zowel Cms als Dickeya te zien (Tabel 5).

Tabel 4. Resultaten effect verschillende concentraties geozoniseerd kraanwater bij een vaste inwerktijd van 30 seconden.

	Ozon-concentratie (mg/L)					
	0	0.25	0.50	1.0	2.0	3.0
Dickeya	++	++	++	++	++	+
Cms	++	++	++	++	++	+

Tabel 5. Effect van geozoniseerd kraanwater op Dickeya en Cms in verschillende toegevoegd in verschillende dichtheden bij een behandelingsduur van 5 minuten.

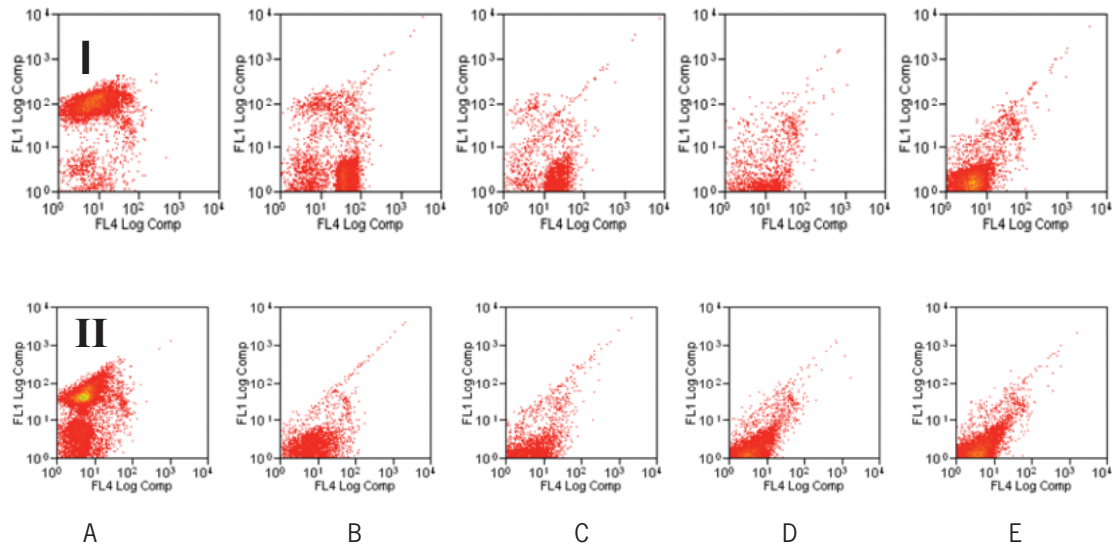
Cellen/ml	Dickeya	Cms	Dickeya	Cms	Dickeya	Cms	Dickeya	Cms
	10E3	10E3	10E5	10E5	10E7	10E7	10E9	10E9
Ozon conc. (mg/l)								
0	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-

## Directe vitaliteitskleuring

Cms toegevoegd aan steriel kraanwater werd gekleurd met kleurstoffen voor een directe vitaliteitsbepaling, namelijk SYTO9 en propidium jodide. SYTO9 kleurt DNA van zowel levende als dode cellen groen fluorescent. Propidium-jodide, een rood fluorescente kleurstof kan alleen cellen met een beschadigde celmembraan binnendringen.

Cellen werden gedurende 5 minuten blootgesteld aan verschillende concentraties ozon (0, 0.6, 1.2, 1.8 en 2.4 mg/ml) ozon en vervolgens 30 seconden geschud. Aan 500 mL monster werd 0.5 µl SYTO9 en 1.5 µl propidium-jodide toegevoegd waarna er een incubatie van 10 minuten volgde. De flowcytometer werd gekalibreerd met bacteriecultures die varieerden in vitaliteit van (0, 20, 40, 60, 80 en 100%).

Op de Y-as is de mate van groene fluorescentie weergegeven (vitale cellen) (Fig. 3). Op de X-as de mate van rood fluorescente kleuring (niet vitale cellen). Zichtbaar is een afname van groene en toename van rood fluorescente deeltjes van A naar B. Bij een hoge concentratie ozon lijken de partikels alle kleurstof te verliezen mogelijk door een volledige desintegratie van de deeltjes als gevolg van de ozonbehandeling. Bij een toenemende ozonconcentratie neem het aantal vitale cellen af en het aantal niet vitale cellen toe.



Figuur 3. Vitaliteitsmetingen na behandeling van *Cms* met verschillende concentraties ozon gedurende 5 minuten m.b.v. flowcytometrie. I. *Dickeya* sp., II. *Cms*. De monsters werden gekleurd met SYTO9 en propidiumjodide. Op de Y-as worden de vitale cellen (SYTO9) weergegeven en op de X-as het aantal niet vitale cellen (propidiumjodide). Panel A) niet behandeld (geen ozon) B) 0,6 mg/L ozon, C) 1,2 mg/L ozon, D) 1,8 mg/L ozon, E) 2,4 mg/L ozon.

## Conclusies en discussie

1. Ozon is al bij een lage concentratie van 3.8 mg/L in kraanwater en een inwerktijd van 5 minuten dodelijk voor de ringrotbacterie (Cms) en Dickeya, ook als deze in bacteriën hoge dichtheden aanwezig zijn.
2. Aanwezigheid van organisch materiaal in het spoelwater inactieveert aanwezige ozon, waardoor er geen meetbare effectiviteit van de behandeling kan worden gevonden, ook niet als er met een hoge concentratie ozon en een lange behandelingsduur wordt gewerkt.
3. Natriumsulfiet lijkt in een concentratie van 1N negatief te werken op de vitaliteit van Dickeya en Cms. Het kan daarom niet worden gebruikt voor inactivatie van ozon in water. Ozon kan wel worden verwijderd door hard schudden.
4. Mennoclean en peroxide, toegepast in een concentraties van respectievelijk 2% en 0.05% doodden Cms en Dickeya effectief.
5. Ook directe vitaliteitskleuring geeft aan dat de bacteriecellen hun vitaliteit verliezen bij toepassing van ozon. Het ontstaan van vitale cellen die niet meer kweekbaar zijn (VBNC's) is derhalve niet aangetoond.

De resultaten geven aan dat een goede reiniging van kisten, waarbij organisch materiaal en slib worden verwijderd, vóór toepassing van ozon belangrijk is. De resultaten bij PRI zijn verder niet direct extrapol eerbaar naar de situatie bij Renne Kistenreiniging. Bij de kistenreiniging komt ozon in contact met hout, zit de bacterie in hout of vuil, vindt er een voortdurende verversing van het water plaats etc.

### Literatuur

Hassenberg, K., A. Frohling, M. Geyer, O. Schluter & W.B. Herppich, (2008).

Ozonated wash water for inhibition of *Pectobacterium carotovorum* on carrots and the effect on the physiological behaviour of produce. *European Journal of Horticultural Science* 73(1), 37-42.