

Voorstudie ultrasone geluidsgolven tegen zuur in tulp

Werkt de Bulbsweep tegen Fusariumbesmettingen?

Roselinde Duyvesteijn, Suzanne Breeuwsma, Martin van Dam en Marjan de Boer.

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Projectnummer: 14000-04

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, boomkwekerij en Fruit**

Address : Postbus 85, 2160 AB Lisse
: Prof. van Slogterenweg 2, Lisse
Tel. : +31 252 462121
Fax : +31 252 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Werking van ultrasone geluidsgolven	7
1.2 Ultrasone geluidsgolven tegen zuur.....	7
2 MATERIAAL EN METHODE	9
2.1 Verspreiding van zuur voorkomen met behulp van Bulbsweep.....	9
2.2 Blootstelling van Fusarium aan ultrasoon geluid in tijdreeks	9
3 RESULTATEN	11
3.1 Verspreiding zuur niet voorkomen door Bulbsweep.....	11
3.2 Ultrasone geluidsgolven hebben effect op schimmelsporen.....	12
4 CONCLUSIE EN DISCUSSIE	13
5 AANBEVELINGEN.....	15

Samenvatting

Er is vanuit de KAVB gevraagd om de effectiviteit van de ultrasone geluidsgolven tijdens het spoelen van tulpen te onderzoeken. Er is gekeken of ultrasone geluidsgolven in staat zijn besmetting met Fusarium te voorkomen. Hiervoor is in samenwerking met ArcaZen de Bulbsweep uitgetest onder praktijkomstandigheden. De Bulbsweep is een apparaat dat ultrasone geluidsgolven opwekt. Een vellenbak met daarin een Bulbsweep werd besmet met Fusarium sporen. Vervolgens zijn er tulpenbollen door getransporteerd. Het was niet mogelijk een verschil vast te stellen tussen het aantal zieke bollen met of zonder een ultrasone behandeling. In een tijdreeks is getest of ultrasone geluidsgolven ook daadwerkelijk schimmelsporen van Fusarium doden. Hieruit bleek dat er na 5 minuten een effect te zien was. Dit effect is echter marginaal en zal geen groot effect hebben op het voorkomen van besmettingen.

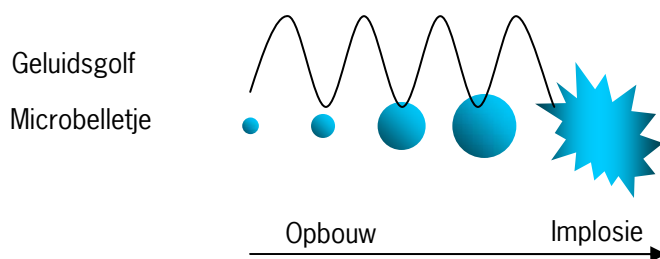
1 Inleiding

Er is de afgelopen twee jaar veelvuldig aan PPO gevraagd of ultrasone geluidsgolven in staat zijn om schimmels en bacteriën te doden. Met behulp van deze techniek zou dan de buitenkant van de bol op niet-chemische wijze ontsmet kunnen worden. Op dit moment zijn er meerdere bedrijven die installaties verkopen die ultrasone geluidsgolven produceren. De meest bekende is ArcaZen, maar ook Variclean kan de apparatuur leveren. Het is echter tot nu toe nog onduidelijk of de methode daadwerkelijk werkt. Op aanvraag van de KAVB is daarom besloten een kleine oriënterende proef uit te voeren.

1.1 Werking van ultrasone geluidsgolven

Tijdens het uitvoeren van de proeven is er gebruik gemaakt van de Bulbsweep van de firma Arcazen. Dit apparaat produceert ultrasone geluidsgolven die drukverschillen in het water veroorzaken. Hierdoor ontstaan er kleine belletjes (microbelletjes). Bij elke geluidsgolf worden deze belletjes groter totdat ze imploderen (Figuur 1). Dit proces noemt men cavitatie. De kracht die vrijkomt tijdens het imploderen van microbelletjes is voldoende om aanwezige cellen zwaar te beschadigen of soms zelfs compleet te vernietigen. Het is al langer bekend dat bacteriën zeer effectief gedood worden door middel van deze techniek. Het effect op schimmels en schimmelsporen is echter tot nu toe onduidelijk.

In dit project is gekeken naar de werking van ultrasone geluidsgolven door de ultrasone unit te installeren in de vellenbak (dit is een onderdeel van het spoelproces). Het gebruik van de vellenbak heeft het nadeel dat de microbelletjes ook imploderen tegen de vervuiling die van de bollen afkomt. Hierdoor gaat waarschijnlijk een deel van de effectiviteit van de techniek verloren. Het voordeel is dat zonder extra stap in de spoellijn de bollen gemakkelijk behandeld kunnen worden. Meer informatie over de werking van ultrasone geluidsgolven is te vinden in "Ultrasoon geluid als sterilisatiemethode" van Laurens Vehmeijer (wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht, P-UB-2007-08)



Figuur 1. Cavitatie. De opbouw van microbelletjes doormiddel van geluidsgolven

1.2 Ultrasone geluidsgolven tegen zuur

Zuur is een groot probleem in tulp en wordt veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipea*. Het is bekend dat tijdens het spoelproces schimmelsporen van *Fusarium* uit de zure bollen vrijkomen waarbij de kans groot is dat hiermee gezonde bollen ook worden besmet en eventueel aangetast. Ultrasone geluidsgolven zouden deze verspreiding en besmetting tegen kunnen gaan door de schimmelsporen te vernietigen. De onderzoeksvragen waren: Kan de besmetting van gezonde bollen met *Fusarium* sporen in de vellenbak worden voorkomen? Wat is het effect van ultrasone geluidsgolven op *Fusarium* sporen?

2 Materiaal en Methode

In deze proefopzet is gekozen voor een situatie zoals die ook in de praktijk voorkomt. De Bulbsweep installatie is in samenwerking met ArcaZen geïnstalleerd op een praktijkbedrijf en gebruikt zoals het door de teler zelf gedaan wordt. Door omstandigheden was het niet meer mogelijk om tijdens het rooiseizoen de proeven uit te voeren. In de proef is gebruik gemaakt van bollen (Leen van de Mark; 10/11) die één maand voor de proef waren gerooid. De proef is uitgevoerd in een vellenbak van 5000 L. In de vellenbak was de Bulbsweep gemonteerd met een output van $2 * 1000$ Watt. Omgerekend is er dan 2.5 Watt/liter vermogen gebruikt om ultrasone geluidsgolven op te wekken.

2.1 Verspreiding van zuur voorkomen met behulp van Bulbsweep

Het water van de vellenbak werd besmet met een Fusariumsuspensie bestaande uit 3 verschillende stammen van *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae* (Tu 47, Tu 58 en Tu 67). Na het aanbrengen van de besmetting werd eerst een watermonster genomen (uitgangssituatie was $8 * 10^3$ sp/ml). Terwijl de Bulbsweep uit stond werden $2 * 40$ bollen (Leen v.d.Mark; maat 10-11) één maal door de vellenbak getransporteerd. De eerste bol kwam na 10 seconden uit de vellenbak. De laatste bol na ongeveer 40 seconden. Dit werd nogmaals herhaald met $2 * 40$ bollen maar dan werden de bollen 3 maal door de vellenbak getransporteerd. Vervolgens werd de hele procedure herhaald met de Bulbsweep aan. Ter controle zijn $2 * 40$ bollen direct in containers gelegd zonder enige behandeling. Voor het uitzieken werden de bollen, per herhaling, vochtig (100% RV) weggelegd bij 24°C in afgesloten containers. De hoeveelheid bollen met Fusariumaantasting werd na 3 weken vastgesteld. Een toename van het percentage zure bollen ten opzichte van de controle, werd toegeschreven aan nieuwe infecties veroorzaakt door het dompelen in de besmette vellenbak.

Om de hoeveelheid Fusariumsporen tijdens het uitvoeren van de proef te volgen zijn telkens watermonsters ($2 * 50$ ml per monsternamen) genomen wanneer de bollen in de vellenbak gingen. Het aantal Fusariumsporen werd bepaald door de watermonsters (50 µl) in duplo op specifieke voedingsbodems uit te platen. Na 3 dagen 24°C werd het aantal kolonies geteld (er groeit één kolonie uit één schimmelspore). ANOVA ($P \leq 0.05$), uitgevoerd in Gen Stat (13th Edition), is gebruikt om de gegevens statistisch te analyseren.

2.2 Blootstelling van Fusarium aan ultrasoon geluid in tijdreeks

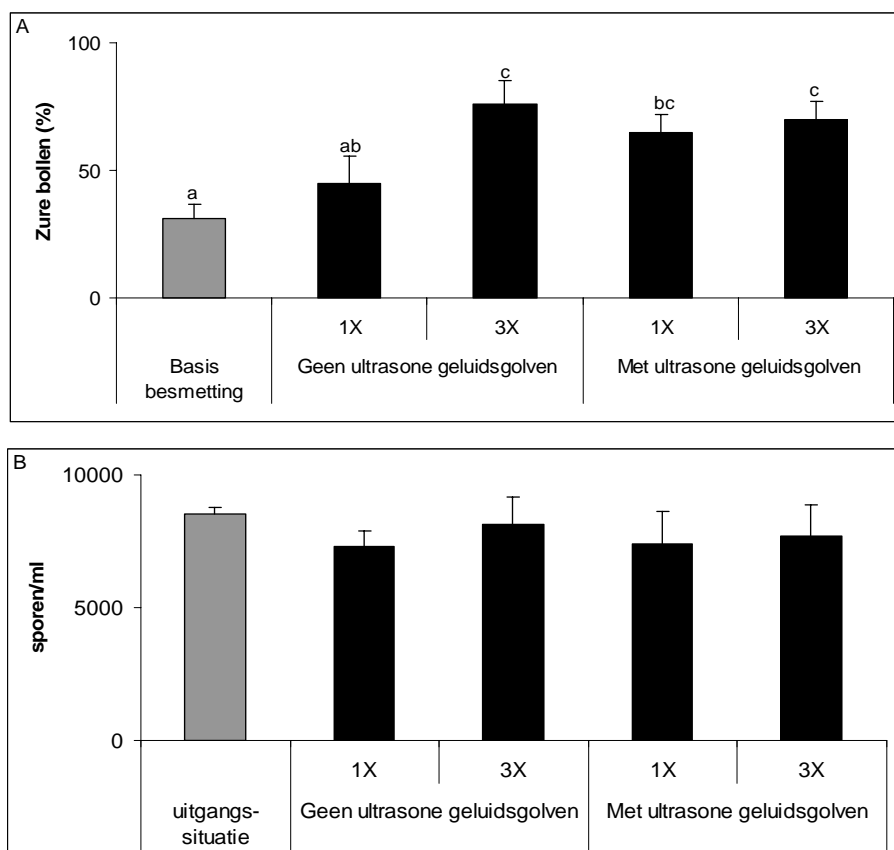
In dezelfde proefopstelling beschreven als hierboven werd opnieuw een Fusariumbesmetting toegevoegd aan de vellenbak. Vlak voor het aanzetten van de Bulbsweep maar na het aanbrengen van de besmetting werd een watermonster ($2 * 50$ ml) genomen (tijdstip 0). Daarna werd er na 1, 5, 10 en 15 minuten een watermonster genomen. Het aantal Fusarium sporen werd bepaald door de watermonsters (50 µl) in duplo op specifieke voedingsbodems uit te platen. Na 3 dagen 24°C werd het aantal kolonies geteld als maat voor het aantal sporen. ANOVA ($P \leq 0.05$), uitgevoerd in Gen Stat (13th Edition), is gebruikt om de gegevens statistisch te analyseren.

3 Resultaten

3.1 Verspreiding zuur niet voorkomen door Bulbsweep

De bollen werden één- of driemaal door de vellenbak getransporteerd met of zonder ultrasone geluidsgolven. Daarna werden de bollen vochtig en warm weggelegd zodat de zuurinfecties zich goed konden ontwikkelen.

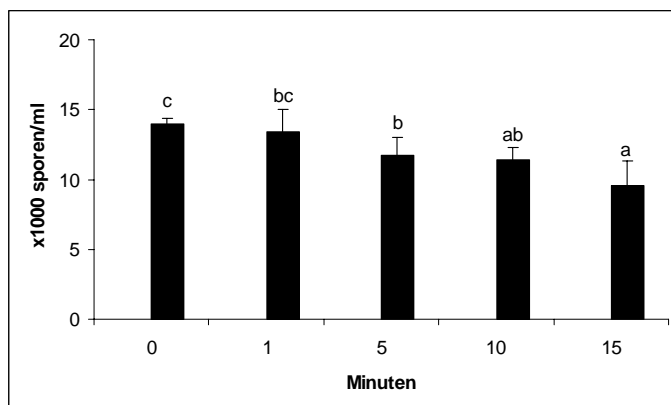
Opvallend is het hoge percentage zuur dat is ontstaan in de onbehandelde bollen (Figuur 2A; basisbesmetting 31%). Bij navraag bij de teler van deze partij bleek dat er maar 1% zuur in zat. Waarschijnlijk zijn de condities tijdens het vochtig (100% RV) en warm wegleggen optimaal geweest waardoor latente zuur infecties zichtbaar zijn geworden. Echter, wanneer de bollen door de vellenbak getransporteerd werden met een Fusarium besmetting ontstond er een hoger percentage geïnfecteerde bollen. Ook nam de besmetting toe naarmate de bollen vaker in de besmette vellenbak gedompeld werden. Het maakt niet uit of de Bulbsweep wel of niet aanstaat (Figuur 2A). De watermonster-analyses laten zien dat het aantal Fusariumsporen niet afnam door het ultrasoon geluid in de korte tijd dat de bollen in de vellenbak aanwezig waren (Figuur 2B).



Figuur 2. Nabootsing van praktijksituatie om het effect van ultrasone geluidsgolven op verspreiding van zuur te bepalen. Bollen zijn één (1x) of driemaal (3x) door de vellenbak getransporteerd. Het effect van de Bulbsweep op de ontwikkeling van zure bollen is weergegeven bij A. Het effect van de Bulbsweep op het aantal Fusarium sporen staat weergegeven bij B. Significante verschillen zijn aangegeven met een letter (ANOVA, $P \leq 0.05$).

3.2 Ultrasonische geluidsgolven hebben effect op schimmelsporen

Het effect van de Bulbsweep op *Fusarium* sporen is gemeten in een tijdreeksexperiment. Hierbij werden de sporen constant blootgesteld aan de Bulbsweep. Na 1, 5, 10 en 15 minuten werd een watermonster genomen. Na 5 minuten blootstelling nam het aantal sporen dat uitgroeit significant af met 16% (Figuur 3). Na 15 minuten blootstelling aan ultrasonische geluidsgolven daalde het aantal sporen met 28% ten opzichte van de uitgangssituatie (t=0). Dit betekende in dit geval een afname van ongeveer 14.000 sporen/ml naar ongeveer 8.000 sporen/ml.



Figuur 3. *Fusarium* sporen blootgesteld voor 1, 5, 10 en 15 minuten aan ultrasonische geluidsgolven van de Bulbsweep. Significante verschillen zijn aangeduid met verschillende letters (ANOVA, P=0.05).

4 Conclusie en discussie

Ultrasone geluidsgolven hebben een dodend effect op de schimmelsporen van *Fusarium*. Zo nam na 15 minuten blootstelling het aantal sporen/ml met 28% af. Echter, deze afname zal waarschijnlijk niet voldoende zijn om zuurbesmetting tegen te gaan. Na 15 minuten blootstelling aan ultrasone geluidsgolven, is de sporen concentratie namelijk van ongeveer 14.000 sporen/ ml naar 8.000 sporen gedaald. Zoals gebleken is in 3.1, is een sporenconcentratie van 8000 sporen/ml ruim voldoende om een behoorlijke zuuraantasting te veroorzaken. Er moet in deze proeven wel rekening gehouden worden met het feit dat er een overmaat aan sporen is toegevoegd en dus ook met een toename in het zuur percentage. In de praktijk zal het aantal sporen variëren afhankelijk van de besmetting van een partij. Desalniettemin kon er geen significante sporenafname worden aangetoond nadat de bollen door de vellenbak getransporteerd waren met ingeschakelde Bulbsweep. Naar aanleiding van deze resultaten concluderen wij dat er in principe mogelijkheden zijn om met behulp van ultrasone geluidsgolven de kans op besmetting met *Fusarium*sporen tijdens het spoelen te verkleinen. Hiervoor is optimalisatie van de toepassing (vermogen en blootstellingsduur) echter wel noodzakelijk.

5 Aanbevelingen

Er zit, zoals uit de proeven is gebleken, potentie in het gebruik van ultrasone geluidsgolven tijdens het spoelen van de bollen. Er zijn echter nog veel onduidelijkheden en de methode/techniek zal moeten worden geoptimaliseerd. De aanbevelingen hieronder kunnen als leidraad fungeren voor een vervolgonderzoek.

- **Balans tussen vergroot vermogen en blootstellingsduur.** Voor een optimaal resultaat tegen *Fusarium* sporen zal er een goede balans tussen het vermogen en de blootstellingsduur gevonden moeten worden. Er is in deze proefopstelling gewerkt met ongeveer 2.5 watt/liter. Waarschijnlijk zal een groter vermogen meer effect bereiken in een kortere tijd. Daarnaast zal de blootstellingsduur verlengd moeten worden. Ook zal het effect van de afstand van de ultrasoonbron en de te ontsmetten bollen moeten worden onderzocht. Het aanpassen van de spoellijn is hierbij een vereiste. Of dit mogelijk is zal onderzocht moeten worden.
- **Bolschade bepalen.** Er zijn tot op heden zijn nog geen meldingen vanuit de praktijk bekend dat het gebruik van ultrasone geluidsgolven een negatief effect heeft op de bol zelf. Echter, wanneer de bol wordt blootgesteld aan een groter vermogen voor langere tijd kan dit misschien negatieve effecten hebben op de bol zelf. Dit zal ook onderzocht moeten worden.
- **Effect op andere ziekteverwekkers en plagen.** Het is goed mogelijk dat ook andere ziekteverwekkers en plagen die zich tijdens het spoelen van de bollen verspreiden, met behulp van ultrasoon geluid bestreden kunnen worden..Onderzoek zal uit moeten wijzen welke ziekten en plagen, dit zijn en hoe effectief dit is.
- **Schadedrempel vaststellen.** Het is in het belang van het onderzoek noodzakelijk de schadedrempels van de ziekten en plagen vast te stellen. Alleen hiermee kan bepaald worden of de afname door het gebruik van ultrasone geluidsgolven effectief en rendabel genoeg is.