



Detectie van wortelaaltjes in water

Exudaten, membraanfiltratie en zeeffiltratie

J.J. Amsing en C. Zijlstra

© 2003 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving 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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Publicatienr. 583; € 20,00

LNV-projectnummer: 397 III-1

PPO-projectnummer: 4110 3191

Dit onderzoek is gefinancierd door het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

Foto omslag: - Tweede-stadium-juvenielen J2 van wortelknobbelaaltjes *Meloidogyne* sp. in water.
- Inzet: set gestapelde 45 µm-zeven.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Business unit Glastuinbouw

Adres : Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer

Tel. : 0297-352525

Fax : 0297-352270

E-mail : infoglastuinbouw.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Probleemstelling	7
1.2 Doelstelling	8
2 EXUDATEN	9
2.1 Desk studie	9
2.1.1 Brainstormsessie	9
2.1.2 Literatuurstudie	10
2.2 Conclusies	11
2.3 Referenties.....	12
3 MEMBRAANFILTRATIE	13
3.1 Inleiding	13
3.2 Materialen en methoden	14
3.3 Resultaten en discussie.....	16
3.4 Conclusies	16
4 ZEEFFILTRATIE	17
4.1 Inleiding	17
4.2 Materialen en methoden	17
4.2.1 Algemeen.....	17
4.2.2 Afspoelhoeveelheid	20
4.2.3 Enkelvoudige zeven.....	21
4.2.4 Hoeveelheid voedingswater	21
4.2.4.1 Gestapelde zeven: 25 en 45 µm.....	21
4.2.4.2 Enkelvoudige zeef: 10 µm.....	22
4.2.5 Gietsnelheid	22
4.3 Resultaten en discussie	22
4.3.1 Afspoelhoeveelheid	22
4.3.2 Enkelvoudige zeven.....	23
4.3.3 Hoeveelheid voedingswater	25
4.3.3.1 Gestapelde zeven: 25 en 45µm.....	25
4.3.3.2 Enkelvoudige zeef: 10 µm.....	26
4.3.4 Gietsnelheid	27
4.4 Conclusies	28
4.5 Adviezen zeeffiltratie-procedure	28
BIJLAGE 1 TERMEN MEMBRAANPROCES	31
BIJLAGE 2 CONTROLEZEEF CERTIFICATEN	33
BIJLAGE 3 RESULTATEN PER PROEF	37

Samenvatting

Het onderzoek naar detectie van wortelaaltjes in water is erop gericht om hele lage besmettingen aan te kunnen tonen. Er is onderzoek verricht naar een mogelijkheid van indirecte detectie, namelijk op grond van biochemische detectie van door aaltjes uitgescheiden exudaten. Het detecteren op basis van exudaten heeft als groot voordeel dat men daarvoor het aaltje zelf niet fysiek in handen hoeft zien te krijgen wat doorgaans voor andere detectiemethoden (moleculair, biochemisch of morfologisch) wel noodzakelijk is. Methoden voor extractie van nematoden uit het water zijn ook onderzocht, te weten membraanfiltratie en zeeffiltratie.

• Exudaten

Het onderzoek naar de mogelijkheid van detectie op basis van exudaten bestond uit een desk studie: brainstormsessie en literatuurstudie. Vervolgonderzoek naar daadwerkelijke uitvoering van detectie op basis van exudaten strandde onder meer op het feit dat er geen soort-specifieke exudaten bekend zijn die door aaltjes worden afgescheiden, een voorwaarde om een dergelijke detectiemethode mogelijk te maken.

• Membraanfiltratie

Een oriënterende proef met een membraanfilter (poriegrootte: 0,69 µm) heeft niet datgene opgeleverd wat ervan werd verwacht. Veertien tot 30% van de in het voedingswater* aanwezige tweede-stadium-juvenielen J2 van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla* werd niet teruggevonden in het retentaat van het filter. Vanwege de grote verliezen in combinatie met het feit dat membraanfiltratie behoorlijk hoge apparaat- en proceskosten met zich meebrengt, heeft het onderzoek aan membraanfiltratie geen vervolg gekregen.

• Zeeffiltratie

Met betrekking tot de efficiëntie waarmee aaltjes uit voedingswater worden gezeefd, zijn de volgende aspecten onderzocht: enkelvoudige en gestapelde zeven, maaswijdte, afspoelhoeveelheid, hoeveelheid voedingswater en snelheid waarmee het voedingswater met J2 van *M. hapla* op de zeef wordt gegoten.

- De efficiëntie van enkelvoudig gebruikte zeven met een maaswijdte van 5 - 75 µm is in afnemende volgorde: 5 µm > 45 µm = 75 µm > 25 µm > 10 µm. Hoewel J2 van *M. hapla* een diameter heeft van ongeveer 14 µm waren de 5 en 10 µm-zeven lang niet in staat alle J2 uit het water te zeven. Deze twee zeven zijn vervaardigd van polyester zeefgaas en blijken ook mazen te bevatten groter dan 14 µm. Omdat onder praktijkomstandigheden 5 µm-zeefgaas snel dichtslibt, is het onderzoek vervolgd met 25 en 45 µm-zeven. Deze zijn evenals de 75 µm-zeef vervaardigd van roestvrij staal zeefgaas met maaswijdten die zeer goed overeenkomen met de nominaal opgegeven maaswijdte.

- De hoeveelheid water (200 - 800 ml) waarmee de aaltjes van de zeef worden gespoeld, bleek niet van invloed te zijn op de efficiëntie.

- De efficiëntie kan belangrijk worden verhoogd door een set van vier gestapelde zeven te gebruiken. Afhankelijk van de hoeveelheid te filtreren voedingswater (10, 20 en 40 liter), leverde een set van 45 µm-zeven een efficiëntie op van respectievelijk 90,0%, 89,0% en 86,4%. Een set van 25 µm-zeven kwam tot een efficiëntie van respectievelijk 81,3%, 81,8% en 73,8%.

- De snelheid waarmee het voedingswater op de zeef wordt gegoten (15, 30 en 60 liter/min.) is van invloed op de efficiëntie. Langzaam gieten is beter dan snel gieten. Is er tijdens het opgieten een waterlaag op de zeef aanwezig, wat bij 25 µm-zeefgaas steeds het geval was, dan biedt dit aaltjes waarschijnlijk meer kans om met kop of staart in een maas terecht te komen en zo verloren te gaan. Dit is waarschijnlijk de reden waarom de efficiëntie van een 25 µm-zeef lager is dan van een 45 µm-zeef, waarbij nauwelijks of geen waterlaag op de zeef aanwezig was.

Samenvattend: een set van vier gestapelde 45 µm-zeven, vervaardigd van roestvrij staal zeefgaas, biedt de meeste garantie om zoveel mogelijk J2 van *M. hapla* uit het water te filtreren (ca. 90%). De randvoorwaarden waaraan daarbij moet worden voldaan, zijn vermeld onder 'Adviezen zeeffiltratie-procedure' (par. 4.5).

* De term 'voedingswater' is gebruikt voor het water, inclusief aaltjes, dat aan het membraanfilter en de zeven is toegediend.

1 Inleiding

De titel van dit project luidt: 'Detectie van wortelaaltjes in plantmateriaal, water en teelt van kasrozen'. Niettemin draagt dit rapport de titel 'Detectie van wortelaaltjes in water'. De reden dat beide titels verschillen, houdt verband met het feit dat alleen gewerkt is aan detectie van wortelaaltjes in water. Op het eerste gezicht lijkt dit een beperking, maar in onderstaande probleemstelling wordt verduidelijkt dat detectie van wortelaaltjes in plantmateriaal en in de teelt van kasrozen ook via het aantonen van aaltjes in water kan.

1.1 Probleemstelling

De teelt van kasrozen op substraat wordt in ernstige mate geconfronteerd met aantastingen door wortelaaltjes. Vooral het noordelijk wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla* komt veelvuldig voor. Daarnaast worden soms ook aantastingen aangetroffen door wortellesieaaltjes, *Pratylenchus penetrans* en *P. vulnus*. Een belangrijke reden om over te schakelen van grond naar substraat is juist geweest om de aaltjes kwijt te raken. Inmiddels wordt ongeveer 90% van het areaal aan kasrozen op substraat geteeld. Maar helaas is men de aaltjes nog niet kwijt en leveren ze regelmatig groeischaade op.

Om aantasting te voorkomen zijn onder andere aaltjesvrij plantmateriaal en water een eerste vereiste. Wat betreft het plantmateriaal wordt geadviseerd alleen gebruik te maken van stek of stentlingen. Dat wil zeggen plantmateriaal waarvan de wortels nooit ergens in contact zijn geweest met grond. Niettemin kan het op de vermeerderingsbedrijven gebeuren dat stek en stentlingen toch besmet raken met aaltjes. Dit is het geval als de te bewortelen stekken en stentlingen geplaatst worden op tafels die niet goed gereinigd zijn en waarop voordien door aaltjes aangetaste planten hebben gestaan.

Het aantonen van door aaltjes aangetaste stekken en stentlingen op basis van wortelmonsters is niet eenvoudig omdat de verblijfsduur van het plantmateriaal op de vermeerderingsbedrijven voor de aaltjes te kort is om tot vermeerdering te komen. Mogelijk dat drainwater afkomstig van deze tafels een gelegenheid biedt om besmettingen met aaltjes aan te tonen. Maar de besmettingsgraad in het drainwater zal dan naar verwachting laag tot zeer laag zijn. De vraag doet zich dan voor hoe lage besmettingsgraden aan aaltjes in water op een snelle, gevoelige en betrouwbare manier kunnen worden opgespoord. Een dergelijke methode kan behalve op de vermeerderingsbedrijven ook op de teeltbedrijven worden gebruikt om aaltjes, niet alleen in drainwater aan te tonen voor het bijtijds opsporen van een aantasting, maar vooral in bassinwater waarin de besmettingsgraad ook laag zal zijn.

Bij lage besmettingsgraden is het vaak niet eenvoudig om het aaltje zelf in handen te krijgen om op basis daarvan een identificatie uit te voeren. De huidige detectiemethode is om aaltjes met behulp van zeven uit het water te filtreren. Maar bij lage hoeveelheden aaltjes of aaltjesdichtheden moeten daarvoor veel liters water worden gefiltreerd. Om dit te omzeilen, is voorgesteld te zoeken naar detectie- en identificatietechnieken waarvoor niet het aaltje zelf direct nodig is, maar die gebruik maken van bijvoorbeeld exudaten van wortelaaltjes. En dan wel een zodanige detectietechniek dat kan worden volstaan met een monstergrootte van bijvoorbeeld een liter. Voorwaarde daarvoor is dat aaltjes soortspecifieke stoffen afscheiden. Is toch een grote hoeveelheid water nodig om voldoende exudaten te bemachtigen, dan is detectie op basis van exudaten minder zinvol, omdat dan ook geprobeerd kan worden de aaltjes zelf te pakken te krijgen en hierop te detecteren. Hiervoor komen dan filtratietechnieken in aanmerking.

Om na te gaan of detectie op basis van exudaten in kleine watermonsters mogelijk is, is dit project in het leven geroepen. Voorwaarden waaraan de detectie van aaltjes in water zou moeten voldoen, zijn:

- detectie op soort
- kwantitatief is geen must
- lage dichtheden detecteerbaar (gevoelig)
- geringe monstergrootte
- snel en betrouwbaar
- gebruiksvriendelijk (gemakkelijk uitvoerbaar en betaalbaar)

Naast een studie naar detectie op basis van exudaten van aaltjes, is ook de efficiëntie van twee filtratietechnieken onderzocht om aaltjes uit water te filtreren. Daarbij ging het om micro- en macrofiltratie met behulp van respectievelijk membranen en zeven.

Het onderzoek in dit project maakt deel uit van het DWK Gewasbeschermingsonderzoeksprogramma, te weten onderdeel 397 III: 'Detectie, monitoring, risicobenadering en -perceptie en ondersteuning van fytosanitaire taken' en is uitgevoerd door Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V., Business unit Glastuinbouw in Aalsmeer in samenwerking met Plant Research International (PRI) in Wageningen.

1.2 Doelstelling

Doel van het onderzoek naar detectie van wortelaaltjes in plantmateriaal, water en de teelt van kasrozen is om de aanwezigheid van wortelaaltjes vast te stellen op basis van aaltjesbesmettingen in water. Een methode waarvoor het niet nodig is de aaltjes zelf te extraheren had daarbij de voorkeur. Detectie op basis van exudaten zou een mogelijkheid kunnen zijn. Onderzoek hiernaar had tot doel na te gaan of detectie op basis van exudaten mogelijk is en zo ja, wat dan de meest efficiënte aanpak is om op een gebruiksvriendelijke manier de aanwezigheid van aaltjes in water op basis van exudaten aan te tonen en deze te ontwikkelen. Indien detectie op basis van exudaten geen haalbare kaart is, dan moeten de aaltjes zelf uit het water worden geëxtraheerd door middel van filtratietechnieken. Het onderzoek naar de micro- en macrofiltratietechnieken met behulp van respectievelijk membranen en zeven had tot doel na te gaan wat de efficiëntie is van beide filtratietechnieken.

2 Exudaten

Het onderzoek naar de mogelijkheid om aaltjes in water aan te tonen op basis van exudaten van aaltjes, is uitgevoerd door middel van een desk studie. Deze studie is gestart met een brainstormsessie met deelnemers afkomstig van PPO bollen en bomen, PPO glastuinbouw, PD, Wageningen Universiteit leerstoelgroep Nematologie en PRI. De brainstormsessie heeft aandachtspunten opgeleverd waarvan er een aantal zijn uitgewerkt. Hiervoor zijn diverse nematologen geraadpleegd en is een literatuurstudie uitgevoerd.

2.1 Desk studie

2.1.1 Brainstormsessie

Op maandag 25 maart 2002 is een brainstormsessie gehouden "Detectie van wortelaaltjes in water".

Deelnemers: Joop van Doorn en Anne Sophie van Bruggen (PPO bollen en bomen), Gerrit Karssen (PD), Hans Helder (WU Nematologie), Jan Bergervoet en Carolien Zijlstra (PRI) en Jan Amsing (PPO Glastuinbouw)

1. Inleiding brainstormsessie: waarom en doel (zie hoofdstuk 1 'Inleiding')

De brainstorm heeft een breder karakter gekregen dan alleen detectie op basis van exudaten. Ook andere, mogelijk nog niet eerder beproefde, methoden konden aan de orde worden gesteld (b.v. detectie via beeld-imaging, flow-cytometrie, eiwit detectie en DNA detectie).

2. Brainstorm

De huidige methode om aaltjes in water aan te tonen, is om 100 liter water te concentreren tot 1 liter en de daarin aanwezige aaltjes morfologisch te identificeren. Dit is omslachtig, tijdrovend en niet altijd betrouwbaar. Indien echter 1 liter water wordt genomen dan is het niet zeker dat je daarbij ook een aaltje te pakken krijgt als deze in zeer lage concentraties aanwezig zijn. Er wordt gehoopt dat aaltjes soortspecifieke stoffen (exudaten) uitscheiden. Als deze exudaten kunnen worden gedetecteerd dan is het niet meer noodzakelijk om het aaltje zelf in handen te krijgen en kan worden volstaan met kleine watermonsters omdat exudaten door de hele watervoorraad gelijkmatig zijn verspreid. Voorwaarde voor kleine watermonsters is dan wel de mogelijkheid te detecteren met een zeer lage detectiegrens.

Hans Helder schetst het volgende beeld aangaande exudaten:

- 1 nematode bevat ca. 5-6 ng eiwit.
- Als exudaat 1% vertegenwoordigt van het eiwit dan is dat ongeveer 50-60 pg per nematode.
- Daarvan zal 1 tot 10 % detecteerbaar zijn: ca. 0,5 tot 5 pg eiwit per nematode.
- Dat is erg weinig.

Dan is er nog de vraag: bestaan dergelijke soortspecifieke exudaten? Seksferomonen zijn wel bekend (vanillezuur, niet erg specifiek).

Via fluorescentiescan moet het wel mogelijk zijn om aan te tonen of er al dan niet ringverbindingen aanwezig zijn in water waarin aaltjes verblijven (potentiële exudaten). Ook via methodiek Henk Jalink (spectroscopische beeldanalyse) moet dit mogelijk zijn. Als er niets wordt aangetoond lijkt de hypothese om detectie gebaseerd op exudaten te ontwikkelen weinig perspectiefvol. Er wordt geopteerd om met name volwassen niet bevruchte vrouwtjes te bestuderen daar deze zeer waarschijnlijk wel seksferomonen uitscheiden.

Als detectie via exudaten niet mogelijk lijkt, dan zal het toch via het aaltje zelf moeten.

- op DNA nivo (wordt in feite al meegenomen in andere projecten 397-III).
- op eiwit nivo via antilichamen (vergt nadere deskstudie).
- via flowcytometer.

Concentratie zal dan wel van belang zijn. Dit kan middels zeven, elutriatiecentrifuge, kolommen met daaraan specifieke antilichamen (mits voorhanden).

De prijs van de nieuwe toets is van belang: huidige toetsen op aaltjes kosten 80-100 € per monster.

3. Aandachtspunten

- Wat is de minimale hoeveelheid exudaat die via antilichamen aangetoond zou kunnen worden via de beschikbare systemen?
- Is er uit literatuur iets bekend over soortspecifieke exudaten aaltjes?
- Kan er een experiment gedaan worden om via fluorescentiescan of methode Henk Jalink aan te tonen of er exudaten worden uitgescheiden door *Meloidogyne* en *Pratylenchus*?
- Wat is er bekend over serologische detectiemethoden nematoden?
- Kan er een inschatting gemaakt worden over kosten van een nieuwe te ontwikkelen toets?
- Hoe staat het met detectiegrens gaschromatografiesysteem (Harrie Verhoeven)?

4. Afspraken

- Uitvoering literatuurstudie, waarbij (deel van) bovengenoemde aandachtspunten worden meegenomen door Carolien Zijlstra.
- Aanleveren informatie over nematoden-detectie via flowcytometer, elutriatiecentrifuge techniek, monitorsysteem CytoBuoy (een sensor voor algen in kust- en oppervlaktewater) door Jan Bergervoet (PRI).

2.1.2 Literatuurstudie

Middels een literatuurstudie, als onderdeel van de desk studie, is een aantal aandachtspunten uit de brainstormsessie nader uitgewerkt.

Wat is de minimale hoeveelheid exudaat die via antilichamen aangetoond zou kunnen worden via de beschikbare systemen?

Een uitgebreide zoektocht in de literatuur heeft geen eenduidig antwoord opgeleverd over detectielimieten ten aanzien van serologische detectie. Uiteraard zal het type serologisch detectiesysteem ook mede bepalend zijn. Een artikel gaf echter concrete detectielimieten aan van toxines die gedetecteerd konden worden via een antilichaam. Deze lagen in de orde van grootte van 0,28 tot 89 ng/ml (Kawatsu et al., 2002). Uitgaande van de hypothese van de brainstormsessie (0,5 tot 5 pg exudaat per aaltje detecteerbaar) lijkt detectie van exudaten middels antilichamen om aanwezigheid van aaltjes in water aan te tonen niet haalbaar.

Is er uit literatuur iets bekend over soortspecifieke exudaten aaltjes?

Mendoza et al. (1999) beschrijven dat monoklonale antilichamen tegen uitscheidingsproducten van plantparasitaire aaltjes kruisreacties vertoonden met op de cuticula aanwezige stoffen van dierparasitaire aaltjes. Het betreft het enige gevonden artikel over detectie van exudaten van plantenparasitaire aaltjes via antilichamen. Soortspecifiek zijn ze dus niet.

Jonz et al (2001) beschrijven een feromoon van *Heterodera schachtii*, vanillezuur. Is niet soortspecifiek. Wordt door vrouwtjes uitgescheiden.

Het meeste werk aan onderzoek naar secreties van plantenparasitaire aaltjes is gericht op secreties geproduceerd door de dorsaal en subventraal gelegen slokdarmklieren, met name voor onderzoek aan interacties van plant/nematode-combinaties.

Wat is er bekend over serologische detectiemethoden nematoden?

Detectie van hele nematoden via antilichamen zal voornamelijk gericht zijn tegen antigenen op de cuticula. Interessant daarbij is dat het aannemelijk is dat de oppervlakte van die cuticula bij plantparasitaire aaltjes verandert tijdens de verschillende levensstadia. Er zijn antilichamen die cuticula van *Globodera rostochiensis* en *G. pallida* herkennen (Jones en Robertson, 1997). Er is een antilichaam dat *Meloidogyne incognita* onderscheidt van *M. javanica* (Ibrahim et al., 1996; Gravato-Nobre, 1999). Chen et al (2001) hebben soortspecifieke antilichamen ontdekt tegen antigenen op het oppervlak van juvenielen van *G. rostochiensis* en tegen *M. arenaria*. In combinatie met Dynabeads konden deze aaltjes uit suspensies worden geïsoleerd. Via dot blot experimenten, waarbij totaal eiwitextracten van vrouwtjes werden gebruikt, konden met een antilichaam *M. fallax* en *M. chitwoodi* van andere *Meloidogyne* soorten worden onderscheiden (Tastet et al., 2001).

What is flow cytometry?

Flow cytometers count and analyse individual particles in a fluid. Fast and one by one. The measurement consists of forward and sideward scattered light as well as fluorescence of the cells which are funneled in single file through a focussed laser beam at typically 1,000 or more cells per second. The practical analysis speed is a few minutes per sample. The detected optical signals from each passing particle are digitized and listed into correlated data.

Data are displayed as dual-parameter plots of combinations of light scatter and fluorescence depending on the particles being analysed. Forward light scatter is governed by particle size and sideward scatter is mostly sensitive for small cellular structures. The fluorescence, probed in several emission bands relates to the amount of cellular pigment and its composition. Applications range from simple phytoplankton counting and sizing to more elaborate physiological analysis, and species recognition using artificial neural net algorithms (<http://www.cytobuoy.com/technology/flowcytometry.html>).

2.2 Conclusies

De brainstormsessie bood weinig perspectief voor detectie van wortelaaltjes door middel van exudaten. Overleg met collega-nematologen en de literatuurstudie hebben geen geschikte informatie opgeleverd over soortspecifieke exudaten, die door aaltjes worden afgescheiden en op basis waarvan aaltjes op soort zouden kunnen worden gedetecteerd. Toepassing van flowcytometrie voor detectie van aaltjes vergt nog heel wat onderzoek daar er op dit moment geen soortspecifieke eiwitten bekend zijn die zich aan de buitenkant van het aaltje bevinden.

Het lijkt er dus op dat op dit moment het opsporen van een aantasting door aaltjes het beste kan plaatsvinden door het aaltje zelf te pakken te krijgen en vervolgens te identificeren, ofwel op grond van morfologische kenmerken, ofwel via soortspecifieke PCR (Polymerase Chain Reaction). Voor de extractie van aaltjes uit water kunnen zeven worden gebruikt. Ook membraanfiltratie zou tot de mogelijkheden kunnen behoren. Welke filtratietechniek het meest praktisch en gevoelig is moet worden uitgezocht.

2.3 Referenties

- CHEN, Q., L. ROBERTSON, J. T. JONES, V. C. BLOK, M. S. PHILLIPS & D. J.F. BROWN, 2001. Capture of nematodes using antiserum and lectin-coated magnetised beads. *Nematology* 3: 593-601.
- GRAVATO-NOBRE, M.J., K.G. DAVIES, B. MULLIGAN, N. VON MENDE & K. EVANS, 2001. The identification of some cuticular and ES antigens shared by plant parasitic and free living nematodes. *International Journal of Nematology* 11: 157-167.
- IBRAHIM, S.K., K.G. DAVIES & R.N. PERRY, 1996. Identification of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, using monoclonal antibodies raised to non-specific esterases. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 79-88.
- JONES, J.T. & L. Robertson, 1997. Nematode secretions. *Cellular and molecular aspects of plant nematode interactions* 10: 98-106.
- JONZ, M. G., E. RIGA, A. J. MERCIER & J. W. POTTER, 2001. Partial isolation of a water soluble pheromone from the sugar beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using a novel bioassay. *Nematology* 3: 55-64.
- KAWATSU, K., Y. HAMANO, A. SUGIYAMA, K. HASHIZUME & T. NOGUCHI, 2002. Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Food Protection* 65: 1304-1308.
- MENDOZA, DE M.E.L., R.H.C. URTIS & S. GOWEN, 1999. Identification and characterization of excreted-secreted products and surface coat antigens of animal and plant-parasitic nematodes. *Parasitology* 118: 397-405.
- TASTET, C., F. VAL, M. LESAGE, L. RENAULT, L. MARCHÉ, M. BOSSIS & D. MUGNIÉRY, 2001. Application of a putative fatty-acid binding protein to discriminate serologically the two European quarantine root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, from other *Meloidogyne* species. *European Journal of Plant Pathology* 107: 821-832.

3 Membraanfiltratie

3.1 Inleiding

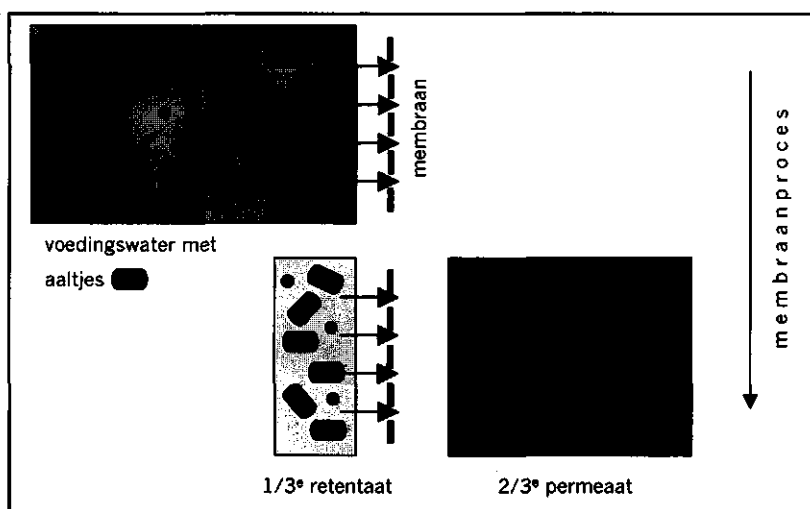
Nu detectie van aaltjes op basis van exudaten geen haalbare kaart is gebleken, moeten voor het aantonen van aaltjes in water deze uit het water worden gefiltreerd en vervolgens morfologisch of op basis van eiwitten of DNA worden geïdentificeerd. Het ufiltreren van aaltjes kan plaatsvinden door middel van een membraanproces, waarvan membraanfiltratie onderdeel uitmaakt. Membraanfiltratie is een druk gedreven proces welke op basis van de poriegrootte van het filter wordt onderverdeeld in microfiltratie, ultrafiltratie, nanofiltratie en omgekeerde osmose (Tabel 1). Afhankelijk van de poriegrootte worden componenten van een bepaalde grootte tegengehouden. Dit tegenhouden wordt uitgedrukt in de term 'retentie'. Tevens geldt dat hoe kleiner de porie, hoe hoger de benodigde werkdruk aan de voedings- of inlaatzijde.

Tabel 1. Overzicht druk gedreven membraanprocessen of membraanfiltratie.

Proces	Poriegrootte	Retentie van	Werkdruk (bar)
Microfiltratie (MF)	0.05 - 10 μm	deeltjes (schimmels, bacteriën)	tot 2 bar
Ultrafiltratie (UF)	2 - 100 nm	macromoleculen (eiwitten)	1 tot 6 bar
Nanofiltratie (NF)	0.5 - 3 nm	zouten en kleine moleculen zoals lactose	3 tot 20 bar
Omgekeerde osmose (RO)	niet relevant	alles behalve water	10 tot 60 bar

De keuze van het type proces hangt onder meer af van het soort voedingswater*, de deeltjesgrootte en de eisen die aan het eindproduct worden gesteld. De fractie van de voeding die door het membraan wordt tegengehouden, wordt het retentaat genoemd, terwijl de fractie die wordt doorgelaten wordt aangeduid met permeaat.

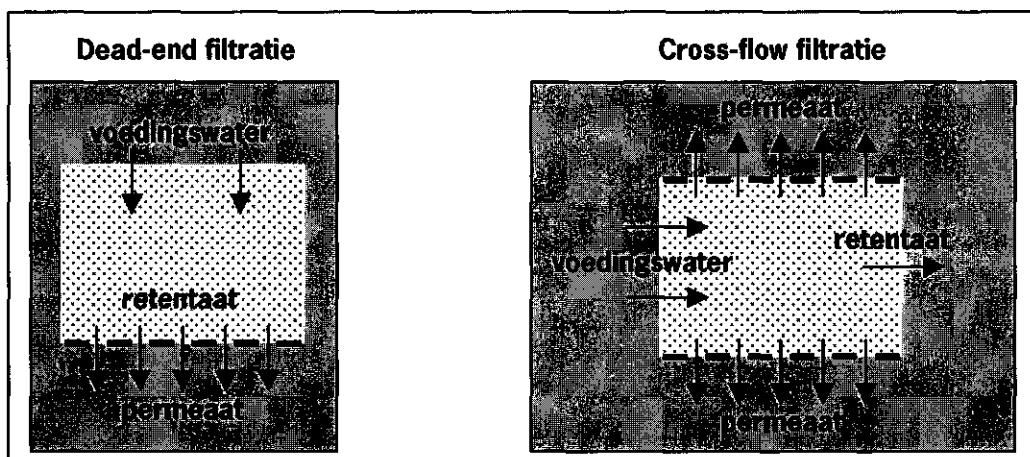
* De term 'voedingswater' is gebruikt voor water, inclusief aaltjes, dat aan het membraanfilter is toegediend.



Figuur 1 - Schematische weergave van het membraanproces voor het indikken van een suspensie met aaltjes (voedingswater).

Bijlage 1 bevat een overzicht van de termen die het membraanproces beschrijven. Het membraanproces is er op gericht om ongewenste deeltjes tegen te houden zodat een permeaat ontstaat dat vrij is van deze deeltjes. Een dergelijk proces kan ook gebruikt worden voor het ufiltreren van aaltjes met als doel vast te stellen of water besmet is met aaltjes. In dat geval gaat het om het indikken van het voedingswater waarin de aaltjes zich bevinden en moet dus het retentaat na afloop van het membraanproces worden onderzocht. Voor het ufiltreren van aaltjes door middel van membraanfiltratie komt microfiltratie (MF) in aanmerking, aangezien de kleinste diameter van een aaltje rond de 10µm ligt. Figuur 1 laat het proces van indikken van voedingswater met aaltjes zien.

Het membraanproces kent twee configuraties, namelijk de 'dead-end' en de 'cross-flow' configuratie (Figuur 2). In een dead-end configuratie wordt het voedingswater in de richting van het membraan gestuwd zonder dat er sprake is van afvoer van het retentaat. In een cross-flow configuratie wordt het voedingswater via holle vezelmembranen langs het membraanoppervlak geleid, opgevangen en gerecirculeerd. Hierdoor slibt het membraan minder snel dicht dan in een dead-end configuratie. Een ander voordeel van een cross-flow configuratie is dat daarbij gemakkelijker een groot membraanoppervlak is te realiseren waardoor het filtratieproces sneller kan verlopen.



Figuur 2 - Dead-end en cross-flow membraanfiltratie.

In september 2002 is op het ATO, Wageningen een oriënterende proef uitgevoerd met een dead-end configuratie met als doel vast te stellen hoe efficiënt membraanfiltratie is, dat wil zeggen hoeveel van de toegevoegde aaltjes in het retentaat worden teruggevonden.

3.2 Materialen en methoden

• Aaltjes

Ten behoeve van het onderzoek aan membraanfiltratie zijn bij het PPO Glastuinbouw op de dag voorafgaand aan het onderzoek tien 200 ml-potjes gevuld elk met 100 ml onbesmet drainwater. Het onbesmette drainwater was afkomstig van een rozenteelt op steenwolmatten. Aan elk potje zijn al hangend 50 goed bewegende tweede-stadium-juvenielen (J2) van het noordelijk wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla* toegevoegd. De wortelknobbelaaltjes waren afkomstig uit drainwater dat gedurende een dag was opgevangen van aangetaste rozen op steenwolmatten. De potjes met aaltjes zijn tot de volgende dag bewaard bij 10°C en daarna meegenomen naar het ATO alwaar negen potjes zijn gebruikt voor membraanfiltratie. Het tiende potje is ongebruikt mee teruggenomen en diende om de invloed van de reis Aalsmeer - Wageningen v.v. op de aaltjes na te gaan.

• *Membraanproces*

Het onderzoek aangaande membraanfiltratie is uitgevoerd met een polyethersulfon membraanfilter met een poriegrootte van 0,69 µm, de grootste die op het ATO aanwezig was. Het filter had een effectieve filtratiediameter van 59 mm. De dead-end membraancel Micon® had een inhoud van 180 ml. De eerste keer dat de cel is gevuld (Beh. 1), is de 100 ml-aaltjesuspensie in de cel gegoten en is het potje met de suspensie nagespoeld met onbesmet drainwater wat ook aan de cel is toegevoegd. Bij behandeling 1 was er totaal aldus 160 ml aaltjessuspensie in de membraancel aanwezig. Bij deze behandeling is geen overdruk toegepast. Gedurende het filtratieproces is de suspensie door middel van een magnetische roerder met 350 toeren per minuut in constante beweging gehouden om dichtslibben van het filter zoveel mogelijk te voorkomen. Druppelsgewijs kwam het permeaat door het filter. Het duurde 26 minuten voordat deze hoeveelheid was teruggebracht tot ca. 20 ml. Vanwege de lange behandelingsduur is niet opnieuw onbesmette drainwater aan de membraancel toegevoegd wat bij de andere behandelingen wel is gebeurd om de aaltjes langer aan de aangelegde overdruk bloot te stellen. In Tabel 2 is aangegeven hoeveel suspensie er bij elke behandeling is gefiltreerd en hoelang het filtratieproces bij de aangelegde overdruk (0-2,0 bar) heeft geduurd. Het filtreren werd beëindigd als de suspensie was ingedikt tot ca. 20 ml (retentaat). Het retentaat werd in het omgespoelde 200 ml-potje gegoten waarna de cel drie keer met kraanwater is nagespoeld wat aan het retentaat is toegevoegd. Ook het permeaat is opgevangen en voor onderzoek mee teruggenomen naar Aalsmeer. Dat was ook het geval met het membraanfilter dat in water is meegenomen om na te gaan of er aaltjes op het filter zijn achtergebleven. Het retentaat en permeaat zijn een nacht bewaard bij 10°C waarna de suspensies zijn afgeheveld tot 20 ml. Om na te gaan of er bij het afhevelen geen aaltjes verloren zijn gegaan, is het afgehevelde water verzameld van zowel het retentaat als het permeaat en een dag later afgeheveld tot 20 ml. Alle 20-ml-monsters zijn in telbakjes met behulp van een stereomicroscop met onderbelichting onderzocht op aantallen aaltjes. Ook de toestand van de aaltjes is daarbij in ogenschouw genomen, dat wil zeggen spontaan bewegend of dood (= niet bewegend, ook niet na aanraking).

Tabel 2 - Dead-end membraanfiltratie met J2 van *Meloidogyne hapla*

Nr.	Suspensie (ml)	Overdruk (bar)	Permeaat	Behandelingstijd (min.) ²⁾	Flux (liter/m ² .uur)	Aantal J2 in		
						retentaat	efficiëntie	permeaat
1	160	0	Langzaam druppelend	26	118	48 (2†) ³⁾	48 (96%) ⁴⁾	0
2	500	0,25	Flinke straal	6	1756	43 (2†)	40 (80%)	0
3	500	0,25	Flinke straal - snel druppelend	12	878	37 (1†)		0
4	500	0,5	Flinke straal - snel druppelend	11	958	30 (1†)	35 (70%)	0
5	400	0,5	Snel - minder snel druppelend	13	642	40 (2†)		0
6	400	1,0	Snel druppelend	12	695	32 (1†)	39 (78%)	0
7	300	1,0	Snel - minder snel druppelend	11	559	46 (2†)		0
8	400	2,0	Snel druppelend	10	834	41	43 (86%)	0
9	350	2,0	Snel - minder snel druppelend	13	557	45 (2†)		0
10	100	Controle ¹⁾	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	49	49 (98%)	n.v.t.

¹⁾ Controle: heeft geen membraanfiltratie ondergaan.

²⁾ Suspensie ingedikt tot ca. 20 ml

³⁾ Totaal: 48 J2 in retentaat, waarvan 46 spontaan bewegend en 2 dood.

⁴⁾ Per overdruk: gemiddeld aantal in het retentaat (efficiëntie). Efficiëntie=(J2 retentaat/J2 voedingswater)x100%.

3.3 Resultaten en discussie

Uit Tabel 2 (kolom 'Permeaat') blijkt dat het membraanproces bij een bepaalde overdruk steeds langzamer verliep naarmate er meer suspensie of voedingswater door het membraanfilter was gegaan. Werd de druk verhoogd, dan verliep het indikproces aanvankelijk weer wat sneller. Dat de snelheid van het proces, weergegeven door de flux (liter/m² membraanoppervlak per uur), gaandeweg afnam komt doordat het filter steeds meer ging dichtslibben. Het dichtslibben kan deels worden voorkomen door gebruik te maken van de cross-flow configuratie, waarbij de voeding turbulent langs het membraanoppervlak wordt gepompt.

In het controle-monster waarop geen membraanfiltratie is uitgevoerd, werden bij terugkomst in Aalsmeer 49 van de 50 aangebrachte aaltjes teruggevonden: een efficiëntie van 98% (Tabel 2). Wat betreft het effect van het membraanproces op de aantallen J2 die in het retentaat zijn aangetroffen, blijkt uit Tabel 2 dat het aanleggen van een overdruk een negatieve invloed had op het aantal teruggevonden aaltjes. Zonder overdruk (Beh. 1) werden er in het retentaat 48 J2 teruggevonden. Dit is twee minder dan er in de voedingssuspensie zijn aangebracht, wat neerkomt op een efficiëntie van 96%. Bij overdrukken van 0,25 tot 2,0 bar (Beh. 2-9) was de efficiëntie aanmerkelijk lager. De afname was onafhankelijk van de hoogte van de overdruk. In welk deel van het membraanproces er aaltjes verloren zijn gegaan, is niet bekend. In het permeaat werden geen aaltjes gevonden (Tabel 2) en ook niet in het afgehevelde deel van het retentaat en permeaat. De suspensie waarin het membraanfilter na beëindiging van het membraanproces is bewaard, bevatte slechts één J2. Het filter zelf is niet microscopisch onderzocht. Of daarin aaltjes zijn achtergebleven is derhalve niet vastgesteld. Een andere mogelijkheid voor het minder terugvinden van aaltjes in het retentaat zou kunnen zijn dat er door het aanleggen van een overdruk enige voedingswater uit de membraancel is weggelekt. Hieraan zijn geen waarnemingen gedaan.

Op enkele dode aaltjes na, waren alle overige aaltjes in het retentaat van alle behandelingen met en zonder overdruk spontaan bewegend. Dat betekent dat zelfs een overdruk van 2 bar gedurende 10 tot 13 minuten (Beh. 8 en 9) geen nadelig effect heeft gehad op het bewegend vermogen van de aaltjes.

3.4 Conclusies

Hoewel membraanfiltratie in principe een prima methode is om alle aaltjes uit water te filtreren, leverde het oriënterende proefje met een dead-end configuratie, waarbij een overdruk is aangelegd van 0,25 - 2,0 bar, niet datgene op wat er van werd verwacht. Veertien tot 30% van de aangebrachte aaltjes is namelijk niet teruggevonden. Nader onderzoek zou moeten uitwijzen langs welke wegen er aaltjes verloren zijn gegaan. Dit is niet gebeurd, omdat de toepasbaarheid van membraanfiltratie ten behoeve van het bemonsteren van grote hoeveelheden drainwater tot 100 liter gering wordt ingeschat. Enerzijds hangt dit samen met de praktische onuitvoerbaarheid en anderzijds met de hoge kosten (apparaat- en proceskosten) die daarmee gemoeid zijn. Het verwerken van 100 liter drainwater op het te bemonsteren bedrijf neemt in het gunstigste geval enkele uren in beslag, indien gebruik wordt gemaakt van een cross-flow apparaat welke geschikt is voor het verwerken van 100 liter vloeistof. Alleen dit feit al maakt de kosten per bemonstering zodanig hoog dat deze methode vermoedelijk geen ingang zal vinden. Ook het reinigen van de configuratie tussen twee bemonsteringen vraagt de nodige tijd wat kostenverhogend werkt.

4 Zeefiltratie

4.1 Inleiding

Aangezien detectie van aaltjes op basis van exudaten geen haalbare kaart is gebleken, moeten voor het aantonen van aaltjes in water deze uit het water worden gefiltreerd en vervolgens morfologisch of op basis van eiwitten of DNA worden geïdentificeerd. Het ufiltreren van aaltjes kan plaatsvinden door middel van o.a. membraan- en zeefiltratie. Omdat uit een oriënterende proef de efficiëntie van membraanfiltratie in de vorm van microfiltratie te wensen overliet (Hfdst. 3) en de praktische uitvoerbaarheid onvoldoende is, is verder onderzoek aan membraanfiltratie gestopt en is het onderzoek gericht op het bepalen van de efficiëntie van zeefiltratie. Het filtreren van aaltjes uit water door middel van zeven is een van oudsher veel gebruikte methode. Het onderzoek aan zeefiltratie is erop gericht na te gaan op welke wijze het ufiltreren van aaltjes het meest efficiënt kan geschieden om zo laag mogelijke besmettingen op te kunnen sporen.

Zeefiltratie is een vorm van macrofiltratie waarbij deeltjes groter dan 5 μm uit een suspensie moeten worden verwijderd. Aangezien de kleinste diameter van aaltjes rond de 10 μm ligt, is een zeef met een maaswijdte van ca. 10 μm nodig om alle aaltjes uit een suspensie te verwijderen. Dit is het geval indien gebruik gemaakt wordt van een enkelvoudige zeef. Zeven van 10 μm en kleiner zijn echter erg duur en slijben snel dicht indien de suspensie is vervuild, wat bij drainwater vaak het geval is. Dichtslibben kan worden voorkomen door zeven met een grotere maaswijdte te gebruiken. Maar omdat dergelijke zeven een lagere efficiëntie hebben, kan niet worden volstaan met één zeef, maar zal een set gestapelde zeven moeten worden gebruikt. Het voordeel van zeven met een grotere maaswijdte is bovendien dat de meeste nematologische laboratoria de beschikking hebben over een set zeven van 45 μm die gebruikt worden voor het extraheren van aaltjes uit grondsuspensies.

In het onderzoek naar de efficiëntie van zeefiltratie zijn de volgende aspecten onderzocht.

- Enkelvoudige en gestapelde zeven
- Maaswijdte
- Afspoelhoeveelheid
- Hoeveelheid voedingswater*
- Gietsnelheid

* De term 'voedingswater' is gebruikt voor water, inclusief aaltjes, dat over de zeven is gegoten.

4.2 Materialen en methoden

4.2.1 Algemeen

Het onderzoek aan zeefiltratie valt in drie deelaspecten uiteen die op alle proeven betrekking hebben, namelijk 1) begintellingen voor het bepalen van de beginpopulatie (P_i) met aaltjes waarmee de proeven zijn uitgevoerd, 2) het uitvoeren van de zeefiltratie zelf en 3) eindtellingen voor het bepalen van het aantal aaltjes dat uit het water is gefiltreerd (retentaat). Diverse keren is ook bepaald hoeveel aaltjes er door de zeven zijn verdwenen en daarmee dus in het permeaat aanwezig waren.

• *Be gintellingen aaltjes*

De aaltjes die in dit onderzoek zijn gebruikt, waren tweede-stadium-juvenielen J2 van het noordelijk wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla*. Deze waren afkomstig van een substraatteelt met rozen die door dit wor-

telknobbelaaltjes waren aangetast. Om de beschikking te krijgen over J2 van *M. hapla* is het drainwater uit de besmette rozenteelt gedurende enige tijd opgevangen, waarna de aaltjes met behulp van nematodenfilters uit het drainwater zijn geëxtraheerd. De zeefproeven zijn uitgevoerd met aantallen J2 die van tevoren exact bekend waren. Daarvoor zijn begintellingen uitgevoerd wat is gebeurd door in een telbakje een aantal druppels aaltjessuspensie ter grootte van 60 µl te deponeren en de daarin aanwezige spontaan bewegende J2 te tellen. Alle niet spontaan bewegende J2 zijn verwijderd. Na het tellen zijn de druppels in een 100 ml glazen potje gespoeld, klaar voor gebruik in een zeefproef.

De nauwkeurigheid van deze wijze van werken is bepaald door de aaltjes in vier 100 ml-potjes te laten bezinken, waarna ze tot op 10 ml zijn afgeheveld. De aantallen J2 in de 10 ml-suspensies zijn vervolgens geteld. Kwamen de begintellingen uit op 164, 133, 199 en 145 J2, na het bezinken en afhevelen werden aantallen J2 genoteerd van respectievelijk 165, 131, 199 en 145. Gemiddeld komt dit neer op een nauwkeurigheid van 99,8%.

• *Uitvoeren zeeffiltratie*

Voor het uitzeven of filtreren van aaltjes uit water zijn de volgende soorten zeven gebruikt die deels van verschillende makelij waren.

5 en 10 µm zeven

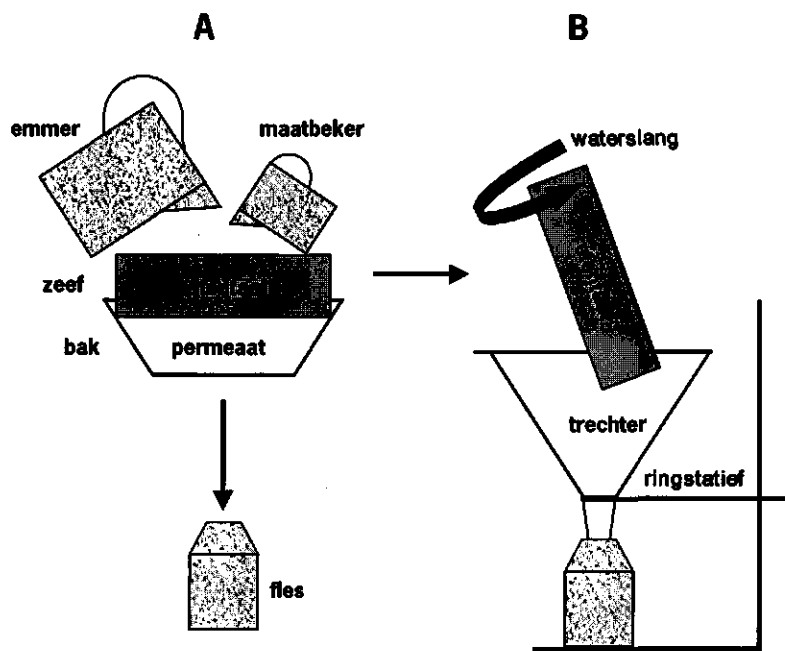
- maaswijdte : 5 of 10 µm (nominaal)
- zeefgaas : polyester extra sterk
- leverancier : Stokvis & Smits B.V., IJmuiden
- diameter : 20 cm
- hoogte : 6 cm

25, 45 en 75 µm zeven

- maaswijdte : 25, 45 of 75 µm (nominaal)
- zeefgaas : roestvrij staal 316
- leverancier : Interlab B.V., Etten-Leur
- diameter : 30 cm
- hoogte : 6,5 cm

Interlab B.V. heeft bij de geleverde roestvrij stalen zeven van 25, 45 en 75 µm certificaten afgegeven. Deze zijn opgenomen in Bijlage 2. Het blijkt dat deze zeven zeer nauwkeurig voldoen aan de opgegeven nominale maaswijdten. Omdat Stokvis & Smits geen certificaten afgeeft bij het door hun geleverde polyester zeefgaas van 5 en 10 µm, is dit zeefgaas microscopisch onderzocht. Hieruit blijkt dat dit type zeefgaas tevens mazen bevat die groter zijn dan de nominaal opgegeven waarden van 5 en 10 µm. Uit de proeven zal blijken dat dit nadelige consequenties heeft voor de efficiëntie waarmee aaltjes uit het water worden gezeefd.

De wijze waarop de aaltjes uit het water zijn gezeefd, is schematisch weergegeven in Figuur 3. Daarbij stonden de zeven zodanig opgesteld dat het voedingswater (water + aaltjes) onbelemmerd kon weglopen. Het zeeffiltratieproces is gestart door de aaltjessuspensie van een 100 ml-potje over te gieten in een maatbeker van 1 liter. Het potje is nagespoeld en aangevuld tot er zich ca. 800 ml aaltjessuspensie in de maatbeker bevond. De inhoud van de maatbeker is vervolgens in het midden over een enkelvoudige zeef of een set gestapelde zeven leeggegoten en met ca. 200 ml water nagespoeld. Bij alle proeven is op deze wijze ca. 1 liter voedingswater met aaltjes gebruikt. Afhankelijk van de soort proef is vervolgens al dan niet extra voedingswater over de zeven uitgegoten. Is dit gebeurd dan bevatte de eerste emmer 9 liter water en de volgende emmers steeds 10 liter water. Het voedingswater is in het midden over de zeef uitgegoten. In de hieronder beschreven proeven is steeds de totale hoeveelheid voedingswater genoemd. De aaltjes zijn niet in al het voedingswater gesuspendeerd en als zodanig over de zeven uitgegoten, maar alleen in de eerste liter, inclusief het naspoelen van de maatbeker. Dit is om drie redenen zo gedaan. Ten eerste omdat een homogene verdeling van de aaltjes over al het voedingswater moeilijk realiseerbaar is zonder aaltjes te verliezen. Ten tweede omdat dan telkens de emmers goed moeten worden nagespoeld om geen aaltje te missen en ten derde omdat zodoende exact kan worden bepaald tot welke verliezen het extra toedienen



Figuur 3 - Configuratie voor het uitzeven van wortelaaltjes uit water.

van het voedingswater leidt. Onder praktijkomstandigheden zullen niet alle aaltjes direct aan het begin op de zeven terecht komen, waardoor de efficiëntie dan over het algemeen hoger zal kunnen zijn dan in deze proeven is verkregen. Direct nadat al het voedingswater over de zeven was uitgegoten, zijn de aaltjes die als retentaat op de zeven zijn achtergebleven ervan afgespoeld. Dat is gebeurd door de bovenkant van de zeef schuin naar voren te houden en de aaltjes er met behulp van een langzame waterstraal af te spoelen terwijl de zeef werd rondgedraaid. Behalve in de proef 'Afspoelhoeveelheid' is daarvoor steeds ca. 400 ml water gebruikt. Dit werd via een trechter in een 1 liter-fles opgevangen. Ook het water waarmee de trechter is nagespoeld, is aan het retentaat in de fles toegevoegd. In geval van gestapelde zeven is het retentaat van elke zeef apart verzameld.

Het voedingswater, inclusief de aaltjes die door de zeef of zeven zijn gegaan, is als permeaat in een bak opgevangen en bemonsterd om vast te stellen hoeveel aaltjes er verloren zijn gegaan. Is geen extra voedingswater gebruikt dan is al het permeaat (ca. 1 liter), plus ongeveer 200 ml water om de bak na te spoelen, verzameld in een 2 liter-fles. In geval er wel extra voedingswater is gebruikt, dan is met behulp van een 1 liter maatbeker een monster van 5 liter uit het grondig geroerde permeaat genomen (5 liter-jerrycan). Al het voedingswater dat voor de zeeffiltraties is gebruikt, betrof kraanwater.

• Eindtellingen aaltjes

De aantallen J2 in de aldus verkregen flessen en jerrycans met retentaat en permeaat zijn vastgesteld door alle daarin aanwezige J2 te tellen. Om dat mogelijk te maken hebben de flessen en jerrycans gedurende 24 uur onaangeroerd gestaan opdat de aaltjes de gelegenheid kregen naar de bodem te zinken. Als de oppervlaktetension van het water te hoog is, blijven aaltjes drijven. Dit is voorkomen door 0,1% Tween (uitvloeier) in de flessen en jerrycans met retentaat en permeaat te druppelen alvorens ze voor een duur van 24 uur onaangeroerd werden weggezet. Na deze tijd zijn de 1 en 2 liter flessen afgeheveld tot op ca. 80 ml. Dit is in twee etappes gebeurd. Eerst tot op ca. 200 ml, waarvoor een slang is gebruikt die met de mond is aangezogen (mondhevel) en vervolgens tot op ca. 80 ml met behulp van een vacuümpomp.

Het niet-afgeheveld deel van 80 ml is, inclusief het water dat is gebruikt om de fles na te spoelen, overgegoten in een 100 ml-potje. Ook hieraan is 0,1% Tween toegevoegd, 24 uur weggezet om te bezinken en vervolgens met de vacuümpomp tot ca. 10 ml afgeheveld. Deze hoeveelheid is overgegoten in een telbakje, het potje nagespoeld en vervolgens zijn de J2 met behulp van een binoculair met onderbelichting geïdentificeerd en geteld.

De jerrycans met 5 liter aaltjessuspensie zijn na het bezinken van de aaltjes met behulp van een mondhevel tot op ca. 800 ml afgeheveld. Het niet-afgehevelde deel is inclusief het water dat is gebruikt om de jerrycan na te spoelen overgegoten in een 1 liter-fles waarin vervolgens 0,1% Tween is gedruppeld. De aldus verkregen flessen zijn 24 uur weggezet om de aaltjes te laten bezinken. Het vervolgetraject komt overeen met de hierboven beschreven procedure voor het afhevelen van de 1 en 2 liter-flessen.

In tegenstelling tot de mondhevel biedt de vacuümpomp de mogelijkheid om tot hele geringe hoeveelheden af te zuigen zonder dat er aaltjes worden meegenomen. Met de vacuümpomp kan het water namelijk van bovenaf worden weggezogen. Het aanzuigslangetje bevindt zich daarbij niet in het water maar net boven het oppervlak. Bij een mondhevel daarentegen moet de aanzuigslang zich permanent in het water bevinden, omdat de hevelwerking stopt zodra er lucht wordt aangezogen. Dit betekent dat afhevelen met een mondhevel tot hele geringe hoeveelheden niet mogelijk is zonder het risico te lopen dat er aaltjes worden weggezogen. Om vast te stellen of de vacuümpomp geen aaltjes heeft meegezogen, is 21 keer het afgehevelde deel verzameld en zijn alle daarin aanwezige J2 geteld. Slechts drie keer zijn enkele aaltjes gevonden. Daarbij ging het maximaal om drie aaltjes. Dat is 0,2% van het totaal aantal aaltjes dat maximaal in het afgehevelde deel aanwezig had kunnen zijn indien alle aaltjes waren opgezogen. Het afhevelen met behulp van de vacuümpomp is derhalve een zeer goede methode gebleken.

- *Statistische verwerking*

De resultaten met betrekking tot de aantallen J2 van *M. hapla* in het retentaat en permeaat zijn statistisch verwerkt door middel van de variantie-analyse (ANOVA) en met de student t-toets op significantie beoordeeld ($P \leq 0,05$).

De hieronder beschreven proeven zijn niet allemaal in een keer of in de aangegeven volgorde uitgevoerd, maar datgene wat bij het betreffende onderdeel hoort, is er bij opgenomen. Zo is een deel van de proeven met de 10 μm -zeef pas uitgevoerd nadat de efficiëntie van de 25 μm -zeef te wensen overliet. Dat geldt ook voor het onderzoek met de 5 en 75 μm -zeef.

4.2.2 Afspoelhoeveelheid

In de eerste drie proeven die zijn uitgevoerd is bepaald hoeveel water er nodig is om zoveel mogelijk aaltjes van de zeven te spoelen, met andere woorden: Bij welke afspoelhoeveelheid komen de meeste aaltjes in het retentaat terecht? Er zijn enkelvoudige zeven gebruikt met een maaswijdte van 10, 25 en 45 μm . Hierover zijn de exact bekende aantallen aaltjes (P_i), die varieerden van 118 tot 202 J2 van *M. hapla* in 1 liter voedingswater (inclusief naspoelen maatbeker) uitgegoten. De aaltjes die op de zeven zijn blijven liggen, zijn bij de 10 μm -zeef met 100, 200, 400 en 800 ml water van de zeef gespoeld en bij de 25 en 45 μm -zeef met 200, 400, 800 en 1200 ml. Dat niet dezelfde reeks afspoelhoeveelheden zijn gebruikt, had te maken met het feit dat de diameter van de 10 μm -zeef 10 cm kleiner was dan van beide andere zeven. Ook al het permeaat is opgevangen ter bepaling van het aantal J2 dat door de zeven is gegaan.

Overzicht van de meest belangrijke proeffactoren

- **Aantal zeven/proef** : 1
- **Maaswijdte** : 10, 25 of 45 μm
- **Voedingswater** : 1 liter
- **Aantal aaltjes (P_i)** : 118 - 202 J2 *M. hapla*
- **Afspoelhoeveelheid** : 100, 200, 400 of 800 ml (10 μm -zeef)
200, 400, 800 of 1200 ml (25 en 45 μm -zeef)
- **Aantal herhalingen** : 3

4.2.3 Enkelvoudige zeven

Het onderzoek aan zeeffiltratie met enkelvoudige zeven, dat wil zeggen met één zeef per proef, is uitgevoerd met zeven met een maaswijdte van 5, 10, 25, 45 en 75 μm . De efficiëntie van deze zeven is met elkaar vergeleken bij een hoeveelheid voedingswater van 20 liter met 257 tot 317 J2 van *M. hapla*. De aaltjes zijn met behulp van 400 ml water van de zeven gespoeld. Behalve het retentaat, is ook het permeaat onderzocht op het aantal J2. Daarvoor is uit het permeaat na menging een monster van 5 liter genomen.

Overzicht van de meest belangrijke proeffactoren

- **Aantal zeven/proef** : 1
- **Maaswijdte** : 5, 10, 25, 45 of 75 μm
- **Voedingswater** : 20 liter
- **Aantal aaltjes (Pi)** : 257 - 317 J2 *M. hapla*
- **Afspoelhoeveelheid** : 400 ml
- **Aantal herhalingen** : 3

4.2.4 Hoeveelheid voedingswater

Om in de praktijk hele lage aaltjesbesmettingen van bijvoorbeeld enkele aaltjes per 100 liter water aan te kunnen tonen, moet een grote hoeveelheid water worden uitgezeefd. De vraag doet zich dan voor, kan dit in een keer gebeuren of moeten de zeven tussendoor enkele keren worden afgespoeld. Met andere woorden wat is de invloed van de hoeveelheid voedingswater, die in een keer over de zeven wordt uitgegoten, op de efficiëntie van het zeeffiltratieproces? Wordt deze nadelig beïnvloed naarmate er meer water over de zeven wordt uitgegoten voordat de aaltjes er vanaf worden gespoeld?

4.2.4.1 Gestapelde zeven: 25 en 45 μm

Om de efficiëntie van het filtreren te verhogen zijn in dit onderzoek gestapelde zeven gebruikt. Daarbij ging het steeds om een set van vier zeven met dezelfde maaswijdte. Dit onderzoek is uitgevoerd met zeven met een maaswijdte van 25 en 45 μm . Er zijn hoeveelheden voedingswater gebruikt van 10, 20 en 40 liter. In het onderzoek met gestapelde zeven bevatte het voedingswater meer aaltjes dan in de hiervoor beschreven proeven met enkelvoudige zeven (351 - 598 J2 van *M. hapla*) om ook de kans op het aantonen van aaltjes op de onderste zeven en in het permeaat te verhogen. Alle zeven zijn afgespoeld met 400 ml water per zeef. Ook het permeaat dat door de onderste zeef is gegaan, is onderzocht op aanwezigheid van aaltjes. De proeven zijn een keer herhaald. Omdat naar verwachting de gietsnelheid van invloed is op de efficiëntie van het filtratieproces is in de tweede serie proeven een gietsnelheid aangehouden van ongeveer 40 liter per minuut. In de eerste serie proeven is de gietsnelheid niet opgemeten, maar deze heeft vermoedelijk in dezelfde orde van grootte gelegen als in de tweede serie proeven.

Vijf keer is gecontroleerd hoeveel aaltjes er verloren gaan indien het voedingswater in de 1 liter-maatbeker niet over de zeven wordt uitgegoten, maar rechtstreeks via de trechter in een 1 liter-fles wordt opgevangen wat na het bezinken en afhevelen is onderzocht op aantallen J2.

Overzicht van de meest belangrijke proeffactoren

- **Aantal zeven/proef** : 4
- **Maaswijdte** : 25 of 45 μm
- **Voedingswater** : 10, 20 of 40 liter
- **Aantal aaltjes (Pi)** : 434 - 598 J2 *M. hapla* (proef 1)
351 - 519 J2 *M. hapla* (proef 2)
- **Afspoelhoeveelheid** : 400 ml
- **Aantal herhalingen** : 3

4.2.4.2 Enkelvoudige zeef: 10 µm

Voordat het onderzoek aan zeeffiltratie van start is gegaan, is een aaltjeslaboratorium geadviseerd gebruik te maken van een enkelvoudige zeef, vervaardigd van polyester zeefgaas met een maaswijdte van 10 µm, om aaltjes uit water te filtreren. Met behulp van dergelijk zeefgaas zouden tweede-stadium-juvenielen J2 van *M. hapla*, die een diameter hebben van ca 14 µm, goed uitgezeefd moeten kunnen worden. Daarbij worden hoeveelheden water tot 100 liter water over de enkelvoudige 10 µm-zeef uitgegoten. Afhankelijk van de snelheid waarmee de zeef dichtslibt, worden grotere of kleinere hoeveelheden water uitgegoten alvorens de zeef wordt afgespoeld. De proeven met de 10 µm-zeef dienden om na te gaan in welke mate de efficiëntie van deze zeef wordt beïnvloed door de hoeveelheid voedingswater. Dit is onderzocht voor 10, 20 en 40 liter voedingswater waarin zich 237 - 388 J2 van *M. hapla* bevonden. Steeds zijn de aaltjes met behulp van 400 ml water van de zeef gespoeld. Ook het permeaat is onderzocht op aanwezigheid van J2.

Overzicht van de meest belangrijke proeffactoren

- Aantal zeven/proef : 1
- Maaswijdte : 10 µm
- Voedingswater : 10, 20 of 40 liter
- Aantal aaltjes (Pi) : 237 - 388 J2 *M. hapla*
- Afspoelhoeveelheid : 400 ml
- Aantal herhalingen : 3

4.2.5 Gietsnelheid

Afhankelijk van de maaswijdte blijft er bij bepaalde gietsnelheden gedurende enige tijd meer of minder water op de zeef liggen. Dit geldt voor de zeven tot 25 µm. Bij de 45 en 75 µm-zeven liep het schone voedingswater, waarvoor kraanwater is gebruikt, zo snel door dat er daarbij geen water op de zeven bleef liggen. Blijft het water enige tijd op de zeven liggen, dan zou dit wel eens van invloed kunnen zijn op de efficiëntie van het uitgeven. In dat geval krijgen aaltjes namelijk langer de kans om met hun kop of staart in een maas terecht te komen en alsnog door de zeef te verdwijnen. De invloed van de gietsnelheid is nagegaan bij enkelvoudige zeven met een maaswijdte van 25 en 45 µm. Steeds is 20 liter voedingswater gebruikt waarbij de emmers met een snelheid van 15, 30 en 60 liter water per minuut zijn leeggewogen. De zeven zijn afgespoeld met 400 ml water. Het permeaat is niet onderzocht op aaltjes. De proeven zijn een keer herhaald.

Overzicht van de meest belangrijke proeffactoren

- Aantal zeven/proef : 1
- Maaswijdte : 25 of 45 µm
- Voedingswater : 20 liter
- Gietsnelheid : 15, 30 of 60 liter water/minuut
- Aantal aaltjes (Pi) : 236 - 380 J2 *M. hapla*
- Afspoelhoeveelheid : 400 ml
- Aantal herhalingen : 2

4.3 Resultaten en discussie

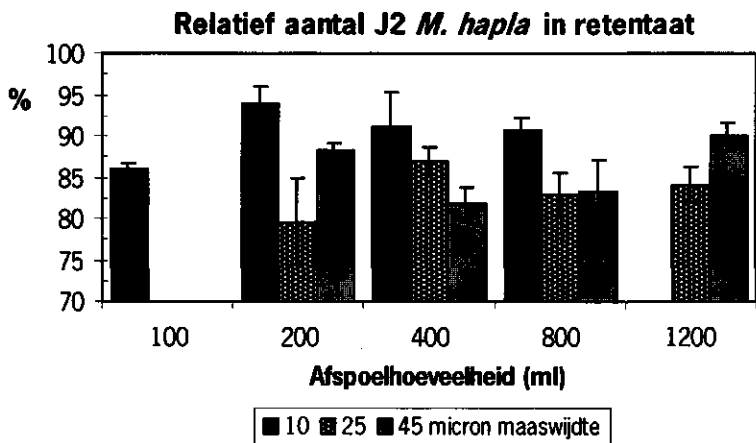
4.3.1 Afspoelhoeveelheid

De resultaten met betrekking tot de invloed van de afspoelhoeveelheid op de efficiëntie waarmee J2 van *M. hapla* van de zeven zijn gespoeld en daarmee dus in het retentaat zijn terecht gekomen, zijn opgenomen in Tabel 3 (grijze kolommen). Ook de resultaten betreffende het permeaat zijn in deze tabel te vinden. Figuur 4 is een grafische weergave van het retentaat inclusief de standaardafwijkingen. De resultaten zijn uitgedrukt in percentages aaltjes ten opzichte van het aantal J2 dat in het voedingswater aanwezig was.

Tabel 3 - **Afspoelhoeveelheid.** Effect afspoelhoeveelheid op het relatief aantal J2 van *Meloidogyne hapla* in het retentaat en permeaat ten opzichte van het aantal J2 in 1 liter-voedingswater in relatie tot verschillende maaswijdten (n=3).

Afspoelhoeveelheid (ml)		% J2 van <i>M. hapla</i> in permeaat		
		10 µm	25 µm	45 µm
100	90,6 a	2,1 a	n.v.t.	n.v.t.
200	90,6 a	2,2 a	2,7 a	3,7 a
400	90,6 a	2,8 a	2,4 a	5,0 a
800	90,6 a	3,2 a	4,3 a	3,1 a
1200	90,6 a	n.v.t.	4,4 a	2,6 a

¹⁾ Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend (P≤0,05).



Figuur 4 - **Afspoelhoeveelheid.** Effect van de afspoelhoeveelheid (gemiddelden en standaardafwijkingen) op het aantal J2 van *M. hapla* in het retentaat (n=3).

Uit Tabel 3 en Figuur 4 blijkt dat de afspoelhoeveelheden bij geen van de maaswijdten hebben geresulteerd in significant verschillende percentages J2 van *M. hapla* in het retentaat. Dit betekent dat de efficiëntie onafhankelijk is van de gebruikte afspoelhoeveelheden. Ook bij het permeaat is dat het geval, wat ook te verwachten was aangezien het totstandkomen van het permeaat los staat van het afspoelen van de zeven.

Op basis van de resultaten van dit onderzoek is besloten om in alle volgende proeven een afspoelhoeveelheid van 400 ml te gebruiken.

4.3.2 Enkelvoudige zeven

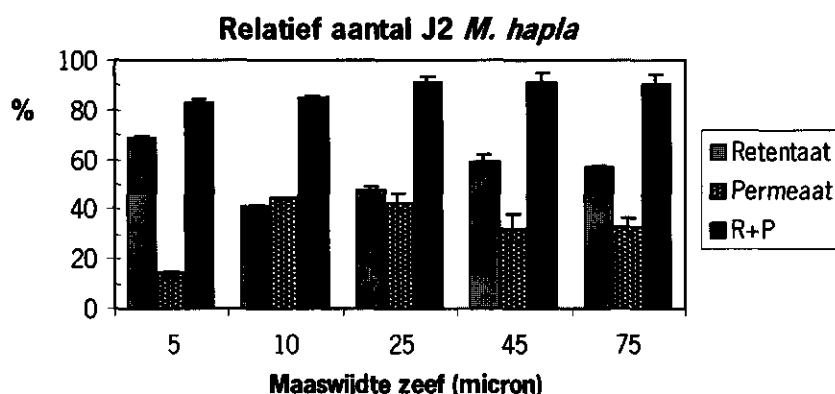
In Tabel 4 staan de resultaten van de enkelvoudig gebruikte zeven met verschillende maaswijdten betreffende het relatief aantal J2 van *M. hapla* dat in het retentaat en permeaat is terechtgekomen. Dit is uitgedrukt in percentages ten opzichte van het aantal J2 dat in het voedingswater aanwezig was. Figuur 5 is een grafische weergave van deze resultaten inclusief de standaardafwijkingen.

Uit Tabel 4 en Figuur 5 blijkt dat er bij de 5 µm-zeef de meeste aaltjes in het retentaat zijn terechtgekomen. Daarmee is deze zeef het meest efficiënt. Dit wordt gevolgd door de 45 en 75 µm-zeef, die beiden even efficiënt zijn. Vervolgens is de efficiëntie van de 25 µm-zeef weer significant lager, terwijl die van de 10 µm-zeef het laagst is. Op het eerste gezicht lijkt deze volgorde van efficiëntie niet logisch. Een afnemende efficiëntie overeenkomend met een toenemende maaswijdte zou meer voor de hand hebben gelegen. Waarom dan toch deze afwijking en waarom hebben de 5 en 10 µm-zeef niet alle J2 van *M. hapla* uit het voedings-

Tabel 4 - **Enkelvoudige zeven.** Effect maaswijdte op het relatief aantal J2 van *M. hapla* in het retentaat en permeaat ten opzichte van het aantal J2 in 20 liter-voedingswater (n=3).

Maaswijdte (μm)	% J2 van <i>M. hapla</i>	
	Permeaat	Retentaat + Permeaat
5	13,9 a	82,9 a
10	44,4 c	85,1 a
25	42,8 bc	90,8 a
45	32,3 b	90,9 a
75	33,0 b	90,0 a

²⁾ Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).



Figuur 5 - **Enkelvoudige zeven.** Effect maaswijdte (gemiddelden en standaardafwijkingen) op het aantal J2 van *M. hapla* in retentaat (R), permeaat (P) en R+P (n=3).

water verwijderd daar de diameter van deze J2 ongeveer 14 μm bedraagt? Hiervoor zijn twee redenen. Op de eerste plaats de aanwezigheid van afwijkende maaswijdten in de 5 en 10 μm -zeven. Uit een microscopische meting is gebleken dat het polyester 5 en 10 μm -zeefgaas ook mazen bevat van maximaal ca. 20 μm . In tegenstelling hiermee waren de afwijkingen bij de overige zeven, die gefabriceerd zijn van roestvrij staal zeefgaas, minimaal (Bijlage 2). De tweede reden houdt verband met het feit dat er tijdens het opgieten van het voedingswater enige tijd water op de zeven met een maaswijdte van 5 tot 25 μm is blijven liggen. Bij de 5 en 10 μm -zeven lag er veel water op de zeven en duurde het vrij lang voordat het water er door heen was. Bij de 25 μm -zeef bevond er zich tijdens het gieten slechts een heel klein laagje water op de zeef, wat zeer snel was verdwenen nadat de toevoer van voedingswater was gestopt. In tegenstelling hiermee bleef er op de 45 en 75 μm -zeven in het geheel geen water liggen, daar dit direct door de zeven wegstroomde. Hoe meer water er op de zeef blijft liggen en hoe langer het dus duurt voordat het water is weggestroomd, hoe langer de aaltjes de kans krijgen om met hun kop of staart in een maas terecht te komen om dan alsnog door het zeefgaas in het permeaat te verdwijnen. Vandaar dat de 25 μm -zeef minder efficiënt is dan de 45 μm -zeef en de 10 μm -zeef weer minder efficiënt dan de 25 μm -zeef. In vergelijking met de 10 μm -zeef duurde het bij de 5 μm -zeef weliswaar nog langer voordat het water verdwenen was, maar dit resulteerde niet in een lagere efficiëntie voor de 5 μm -zeef. Dit komt omdat het 5 μm -zeefgaas minder mazen van maximaal ca. 20 μm bevatte dan het 10 μm -zeefgaas.

• Verliezen

Wat betreft het permeaat blijkt uit Tabel 4 en Figuur 5 dat er significant meer aaltjes in het permeaat aanwezig waren naarmate het aandeel in het retentaat lager was, wat een logisch gevolg daarvan is. Worden de percentage aaltjes in het retentaat en permeaat bij elkaar opgeteld, dan zou in het ideale geval de 100% moeten worden benaderd. Dit was echter nooit het geval. Tien tot 17% van het aantal toegediende J2 van *M. hapla* is niet teruggevonden. Hoewel alles zo voorzichtig en nauwkeurig mogelijk is uitgevoerd, kunnen om de volgende redenen toch meerdere aaltjes verloren zijn gegaan: 1) wegspatten van water tijdens het

opgieten van het voedingswater, 2) wegspreiden van water tijdens het afspoelen van de zeven, 3) verloren gaan van enkele druppels water bij het verplaatsen van de zeven naar de trechter om te worden afgespoeld, 4) bij het verrichten van de eindtellingen kan er een aaltje over het hoofd zijn gezien en 5) ook mag niet worden uitgesloten dat er aaltjes in de mazen blijven steken of aan de zeven vasthaken.

4.3.3 Hoeveelheid voedingswater

4.3.3.1 Gestapelde zeven: 25 en 45µm

Uit onderzoek met enkelvoudige zeven is gebleken dat een behoorlijk deel van de in het voedingswater aanwezige aaltjes in het permeaat verdwijnt. Bij de 25 en 45 µm-zeven ging na toediening van 20 liter voedingswater 41-52% van de aaltjes verloren (Tabel 4). Dit was reden om het onderzoek te vervolgen met gestapelde zeven bestaande uit een set van vier zeven met dezelfde maaswijdte en daarbij tevens de invloed vast te stellen van de hoeveelheid voedingswater op de efficiëntie van het uitzeven van aaltjes.

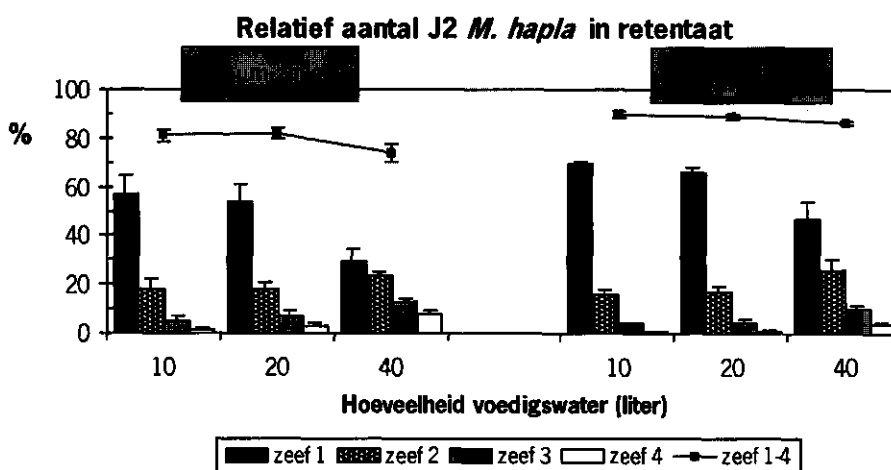
Tabel 5 bevat de gemiddelde resultaten van de twee proeven die met de gestapelde zeven van 25 en 45 µm en hoeveelheden van 10, 20 en 40 liter voedingswater zijn uitgevoerd. De percentages J2 van *M. hapla* in het retentaat zijn zowel per zeef (R 1 - R 4) als gesommeerd over de vier zeven (R set) in deze tabel opgenomen. Ook het relatief aantal J2 dat in het permeaat van de vier zeven aanwezig was, is in de tabel vermeld (P set). Figuur 6 is een grafische weergave van de gemiddelde resultaten betreffende het relatief aantal J2 in het retentaat inclusief de standaardafwijkingen. Bijlage 3 bevat de resultaten per proef.

Bleek uit vergelijking van de eerste twee proeven, waarbij enkelvoudige zeven zijn gebruikt met respectievelijk 1 liter (Tabel 3) en 20 liter voedingswater (Tabel 4), dat de hoeveelheid voedingswater van grote invloed is op de efficiëntie van het uitzeven van J2 van *M. hapla*, ook in deze proef nam de efficiëntie van de bovenste zeef (R1) af naarmate er meer voedingswater is gebruikt (Tabel 5 en Figuur 6). Tussen 10 en 20 liter voedingswater waren de verschillen in efficiëntie niet significant, wel tussen 10 en 40 liter. Dit geldt voor beide maaswijdten. De aaltjes die door de mazen van de bovenste zeef gingen, konden weer door de daaronder liggende zeven worden opgevangen. Zo leverde elke zeef een bijdrage aan de totale efficiëntie (R set) van de set met vier gestapelde zeven. Bij beide sets zeven nam deze efficiëntie af bij toenemende hoeveelheden voedingswater. Maar door de bijdrage van de onderliggende zeven, werd de efficiëntie van de hele set minder sterk beïnvloed door de hoeveelheid voedingswater dan de efficiëntie van alleen de bovenste zeef. Bij de set met 45 µm-zeven was de afname in efficiëntie daardoor niet eens significant (R set), wat bij de 25 µm-zeven wel het geval was. Wordt de efficiëntie van beide sets met elkaar vergeleken, dan blijkt dat de efficiëntie van de set met 45 µm-zeven significant hoger is dan die van de set met 25 µm-zeven. Met de 45 µm-set werd een maximale efficiëntie behaald van 90%, wat een goed resultaat mag worden genoemd.

Tabel 5 - **Hoeveelheid voedingswater & gestapelde zeven.** Effect vier gestapelde zeven (25 en 45 µm) en hoeveelheid voedingswater (10, 20 en 40 liter) op het relatief aantal J2 van *M. hapla* in het retentaat (R) en permeaat (P) ten opzichte van het aantal J2 in het voedingswater (n=6).

Voedingswater (liter)	% J2 van <i>M. hapla</i>				P set	R+P set
	R 1	R 2	R 3	R 4		
	25 µm-zeven					
10	57,0 bc ¹⁾	18,0 bc	4,9 c	1,4 bcd	0,5 b	81,8 b
20	53,9 c	17,8 bc	7,2 bc	2,9 bc	2,2 b	84,0 b
40	29,7 d	23,4 ab	13,2 a	7,6 a	10,9 a	84,7 b
	45 µm-zeven					
10	69,7 a	15,7 c	4,0 c	0,6 d	0,2 b	90,2 a
20	66,1 ab	17,5 bc	4,3 c	1,1 cd	0,7 b	89,6 a
40	47,0 c	26,1 a	9,9 ab	3,5 b	2,3 b	88,7 a

¹⁾ Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend (P≤0,05).



Figuur 6 - **Hoeveelheid voedingswater & gestapelde zeven.** Effect van vier gestapelde zeven en hoeveelheid voedingswater (gemiddelden en standaardafwijkingen) op het aantal J2 van *M. hapla* in het retentaat (n=6).

Dat de set met 25 μm -zeven relatief minder J2 bevatte dan de set met 45 μm -zeven, moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan het feit dat er tijdens het opgieten van het voedingswater gedurende enige tijd wat water op de 25 μm -zeven is blijven liggen wat bij de 45 μm -zeven nauwelijks of niet het geval was. In de twee proeven, die met de set 45 μm -zeven zijn uitgevoerd, is nagenoeg dezelfde efficiëntie (R set) behaald, wat bij de 25 μm -zeven niet het geval was (Bijlage 3).

Wat het permeaat betreft, blijkt uit Tabel 5 dat ook de onderste zeef nog aaltjes doorliet (P set). Dit aandeel nam toe naarmate er meer voedingswater is gebruikt. Verder laat Tabel 5 zien dat het totaal aantal gevonden aaltjes in het retentaat plus permeaat (R+P set) niet significant is beïnvloed door de hoeveelheid voedingswater. Wel was dit aantal bij de 25 μm -zeven significant lager dan bij de 45 μm -zeven, maar ook bij de 45 μm -zeven werd geen enkele keer de 100% benaderd. Langs diverse wegen gaat er een deel van de aangebrachte aaltjes verloren. Een aantal mogelijkheden daarvoor is al genoemd in paragraaf 4.3.2. onder het kopje 'verliezen'. In dit onderzoek is vijf keer gecontroleerd hoeveel aaltjes er verloren gaan indien het voedingswater met aaltjes in de 1 liter-maatbeker niet over de zeef wordt uitgegoten, maar direct via de trechter wordt opgevangen wat na het bezinken en afhevelen is onderzocht op aantallen J2. Het blijkt dat dan gemiddeld 4,6% van de aaltjes niet wordt teruggevonden met een minimum van 2,7% en een maximum van 7,1%.

4.3.3.2 Enkelvoudige zeef: 10 μm

Bij de enkelvoudig gebruikte 10 μm -zeef is de efficiëntie, uitgedrukt als percentage J2 van *M. hapla* in het retentaat, alleen negatief beïnvloed door de hoeveelheid voedingswater van 40 liter (Tabel 6). Wat betreft het permeaat resulteerde dit bij de 40 liter voedingswater daardoor in meer aaltjes, terwijl de som van het retentaat en permeaat onafhankelijk was van de hoeveelheid voedingswater.

Tabel 6 - **Hoeveelheid voedingswater & enkelvoudige zeef.** Effect van enkelvoudige zeef (10 μm) en hoeveelheid voedingswater (10, 20 en 40 liter) op het relatief aantal J2 van *M. hapla* in het retentaat en permeaat ten opzichte van het aantal J2 in het voedingswater (n=3).

Voedingswater (liter)	% J2 van <i>M. hapla</i>		
	Retentaat	Permeaat	Retentaat + Permeaat
10		37,9 b	77,3 a
20		41,9 b	86,0 a
40		58,9 a	87,1 a

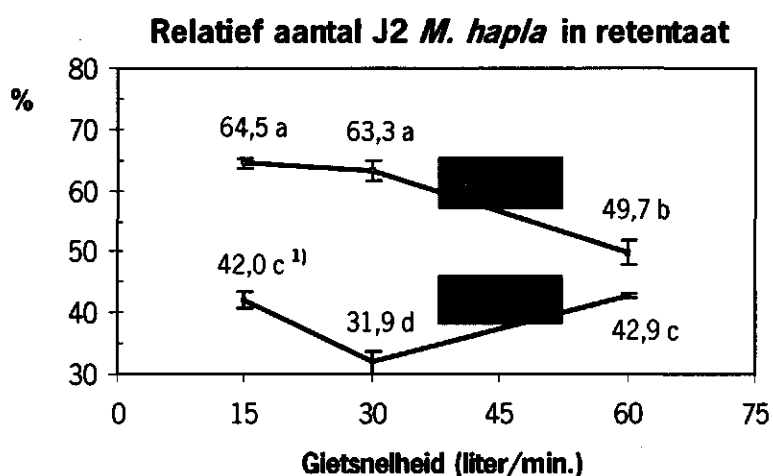
¹⁾ Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

De resultaten van deze proef komen overeen met die van de proef met de enkelvoudige zeven (par. 4.3.2), waarin ook een 10 µm-zeef is gebruikt, maar dan alleen met 20 liter voedingswater (Tabel 4). Worden de percentages aaltjes in het retentaat van deze proef vergeleken met die van de bovenste zeef van beide sets met gestapelde zeven (par. 4.3.3.1) dan blijkt dat de efficiëntie van 25 en 45 µm-zeef, met uitzondering van de combinatie 25 µm en 40 liter, steeds hoger is (Tabel 5). Hiermee is wederom aangetoond dat het polyester zeefgaas van 10 µm minder goed in staat is J2 van *M. hapla* uit het water te filtreren. Derhalve wordt het gebruik van dit soort zeefgaas ontraden indien het doel van het filtratieproces is om zoveel mogelijk aaltjes te verzamelen, wat van belang is als de besmettingen erg laag zijn.

4.3.4 Gietsnelheid

Bij de eerder uitgevoerde proeven is geconstateerd dat er tijdens het toedienen van het voedingswater meer of minder water op de zeven aanwezig is. Dit zou effect kunnen hebben op het aantal aaltjes dat door de zeef in het permeaat terecht komt en daarmee dus verloren gaat. Bij de twee soorten die het meest voor het filtreren van aaltjes in aanmerking komen, namelijk de 25 en 45 µm-zeven, is dit effect onderzocht. In dit geval niet bij gestapelde zeven, maar bij enkelvoudige zeven, omdat er vanuit wordt gegaan dat de resultaten die hiermee worden verkregen ook van toepassing zijn voor gestapelde zeven. De gemiddelde resultaten van de twee proeven zijn grafisch weergegeven in Figuur 7, terwijl Bijlage 3 de resultaten per proef bevat.

Figuur 7 geeft aan in welke mate de snelheid waarmee 20 liter voedingswater over de 25 en 45 µm-zeven is uitgegoten de efficiëntie heeft beïnvloed waarmee J2 van *M. hapla* uit het voedingswater is gezeefd en daarmee dus in het retentaat is terecht gekomen. Hieruit blijkt dat bij beide zeven de gietsnelheid van invloed is op de efficiëntie. Neemt bij de 45 µm-zeef de efficiëntie af naarmate de gietsnelheid toeneemt, bij de 25 µm-zeef laat de efficiëntie een significante terugval zien bij de gietsnelheid van 30 liter/min. om vervolgens weer toe te nemen. In geval van de 45 µm-zeef is het verloop in efficiëntie verklaarbaar doordat er alleen bij de hoogste gietsnelheid (60 liter/min.) een beetje water op de zeef lag. Maar bij de 25 µm-zeef lag er bij alle gietsnelheden water op de zeef, het meest bij de hoogste gietsnelheid en het minst bij de laagste gietsnelheid. Op grond hiervan werd ook bij de 25 µm-zeef op een afnemende efficiëntie gerekend bij een toenemende gietsnelheid. Maar de middelste gietsnelheid (30 liter/min.) liet de laagste efficiëntie zien. Hiervoor is geen verklaring gevonden. Blijven er misschien aaltjes in de mazen steken?



Figuur 7 - **Gietsnelheid.** Effect van de gietsnelheid (15, 30 en 60 liter/min.) waarmee 20 liter voedingswater is toegediend aan een 25 en 45 µm-zeef (gemiddelden en standaardafwijkingen) op het relatief aantal J2 van *M. hapla* in het retentaat ten opzichte het aantal J2 in het voedingswater (n=4).

¹⁾ Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

Evenals dat uit de eerdere proeven is gebleken, heeft ook deze proef laten zien dat met de 45 µm-zeef de meeste aaltjes uit het water worden gehaald. Bij deze zeef waren de twee laagste gietsnelheden, waarbij er geen water op de zeef bleef liggen, het meest efficiënt. Voor de praktijk betekent dit dat de zeven, in geval van dichtslibben, regelmatig moeten worden afgespoeld. De kans op dichtslibben kan worden verkleind door bij een set van vier gestapelde zeven voor de bovenste zeef een 75 µm-zeef te gebruiken met daaronder drie 45 µm-zeven. In een ander project zal de invloed van het dichtslibben op de efficiëntie nader moeten worden nagegaan.

4.4 Conclusies

In het onderzoek naar de invloed van de afspoelhoeveelheid, maaswijdte, enkelvoudige en vier gestapelde zeven en de gietsnelheid op de efficiëntie waarmee tweede-stadium-juvenielen J2 van *M. hapla* uit het niet vervuilde voedingswater worden gezeefd en dus in het retentaat terechtkomen, kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

- 1. De gebruikte afspoelhoeveelheden zijn niet van invloed op de efficiëntie**
 - 10 µm-zeef: gelijke efficiëntie bij 100 - 800 ml.
 - 25 en 45 µm-zeef: gelijke efficiëntie bij 200 - 1200 ml.
- 2. De efficiëntie van enkelvoudige zeven is afhankelijk van de maaswijdte en het soort zeefgaas**
 - efficiëntie van 5 µm (hoogst) > 45 µm = 75 µm > 25 µm > 10µm (laagst).
 - (5 en 10 µm polyester zeefgaas; 25, 45 en 75 µm roest vrij staal zeefgaas)
- 3. De efficiëntie van een set van vier gestapelde zeven is afhankelijk van de maaswijdte**
 - efficiëntie van 45 µm-zeven is hoger dan van 25 µm-zeven.
- 4. De hoeveelheid te filtreren voedingswater is van invloed op de efficiëntie**
 - Gestapelde zeven
 - 25 µm-zeven: gelijke efficiëntie bij 10 en 20 liter, maar lager bij 40 liter.
 - 45 µm-zeven: gelijke efficiëntie bij 10, 20 en 40 liter.
 - Enkelvoudige zeef
 - 10 µm-zeef: gelijke efficiëntie bij 10 en 20 liter, maar lager bij 40 liter.
- 5. De gietsnelheid is van invloed op de efficiëntie: langzaam gieten is beter dan snel gieten**
 - 25 µm-zeef: gelijke efficiëntie bij 15 en 60 liter/min., maar lager bij 30 liter/min.
 - 45 µm-zeef: gelijke efficiëntie bij 15 en 30 liter/min., maar lager bij 60 liter/min.

4.5 Adviezen zeeffiltratie-procedure

Op basis van het onderzoek aan zeeffiltratie met 10, 25 en 45 µm-zeven kunnen de volgende adviezen voor de praktijk worden opgesteld. Dat wil zeggen adviezen bestemd voor aaltjeslaboratoria die worden ingeschakeld voor het detecteren van wortelaaltjes in drain- en bassinwater, waarbij het gaat om met behulp van zeven zoveel mogelijk aaltjes uit water te filtreren.

ZEEFFILTRATIE-PROCEDURE

- Gebruik zeefgaas waarvan de maaswijdte voldoet aan de opgegeven nominale maaswijdte. Over het algemeen zullen dit zeven zijn, vervaardigd van roestvrij staal zeefgaas. Vraag naar de 'Controlezeef Certificaat'. In geval van polyester zeefgaas is de kans groot dat de zeef veel maaswijdten bevat groter dan de opgegeven nominale maaswijdte. Onderstaande adviezen zijn gebaseerd op zeven die vervaardigd zijn van roestvrij staal zeefgaas met een diameter van 30 cm vervaardigd door Interlab B.V., Etten-Leur.

- Gebruik een set van vier gestapelde zeven met een maaswijdte van 45 μm .
Opmerking: 10 μm polyester zeefgaas en 25 μm roestvrij staal zeefgaas zijn minder efficiënt.
- Maak de zeven nat en zet de set zeven zo goed mogelijk waterpas neer, maar zorg er voor dat het water vlot aan de onderzijde kan weglopen.
- Giet het te filtreren water met een zodanige snelheid op de bovenste zeef dat er tijdens het gieten geen of zo weinig mogelijk water op deze zeef aanwezig is.
- Indien meer dan 40 liter water moet worden uitgezeefd, spoel de zeven dan na maximaal 40 liter water af. Indien de bovenste zeef eerder dichtslibt zal deze hoeveelheid minder moeten zijn om de vorming van een waterlaag op de zeef te voorkomen.
- Spoel de zeven af met 200 - 400 ml water per zeef. Houd daarbij de bovenkant van de zeef schuin naar voren en draai de zeef daarbij rond. Spoel eerst de voorkant van de zeef af en daarna de achterkant.
- Verzamel het retentaat in een fles of jerrycan.
- Verwerk het retentaat vervolgens in het laboratorium.

Bijlage 1 Termen membraanproces

Betekenis van termen die een membraanproces beschrijven.

Voeding	: startmateriaal dat aan het membraan wordt aangeboden.
Retentaat	: fractie van de voeding die door het membraan wordt tegengehouden.
Permeaat	: fractie van de voeding die door het membraan gaat.
Flux	: hoeveelheid permeaat per tijdseenheid en membraanoppervlak [$\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{uur}$].
Permeabiliteit	: hoeveelheid permeaat per tijdseenheid, membraanoppervlak en druk [$\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{uur} \cdot \text{bar}$].
Retentie	: percentage component dat door het membraan wordt tegengehouden.

Bijlage 2 Controlezeef certificaten

Verklaring certificaatgegevens

W = nominale maaswijdte
X = maximaal toelaatbare individuele maatafwijking
Y = maximaal toelaatbare gemiddelde maatafwijking
W+X = maximaal individuele maaswijdte
W+Y = maximaal gemiddelde maaswijdte
W-Y = minimaal gemiddelde maaswijdte
Wg = gemiddeld gemeten maaswijdte
s = standaardafwijking
Wi_max = grootst gemeten individuele maaswijdte
Wi_min = kleinst gemeten in individuele maaswijdte

Voorwaarden goedkeuring

$W+Y > Wg > W-Y$
 $Wi_{max} < W+X$

Controlezeef Certificaat

Klantnaam : Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

Certificaatnummer : 50316

Meting volgens NEN 2560

Status : OK

Visuele inspectie : OK

Nominale Maaswijdte: 25 μm

Zeefdiameter : 300 mm

Materiaal : RVS 316

Specificaties :		
$W + X$	0.0414	mm
$W + Y$	0.0275	mm
$W - Y$	0.0225	mm

Warp/ketting		
$W_g =$	0.0236	mm
$s =$	0.0022	mm
$W_{i_max} =$	0.0298	mm
$W_{i_min} =$	0.0197	mm
draaddikte $d =$	0.0267	mm

Weft/inslag		
$W_g =$	0.0230	mm
$s =$	0.0014	mm
$W_{i_max} =$	0.0260	mm
$W_{i_min} =$	0.0197	mm
draaddikte $d =$	0.0273	mm

Meetmethode : optisch

Meetinstrument : F245

Resolutie : 0.1 μm

Certificaatnummer : DM400V4-F245-0302

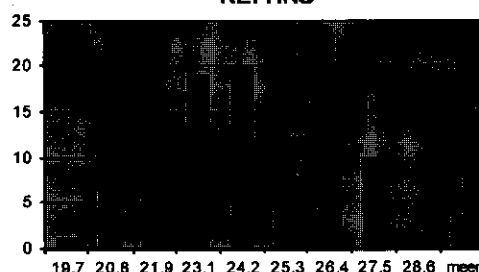
Gecalibreerd met : KOBA stappeneindmaat (420 mm)

Stappeneindmaatnummer : 9808K157 3594 (DKD-K-05201 99-04)

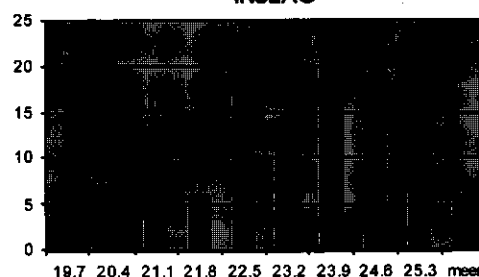
Meting uitgevoerd door : E. de Vos

Datum : 5-11-02 11:14

Frequentieverdeling (%)
KETTING



INSLAG



Controlezeef Certificaat

Klantnaam : *Praktijkonderzoek Plant & Omgeving*

Certificaatnummer : *50315*

Meting volgens NEN 2560

Status : *OK*

Visuele inspectie : *OK*

Nominale Maaswijdte: *300 mm*

Zeefdiameter : *300 mm*

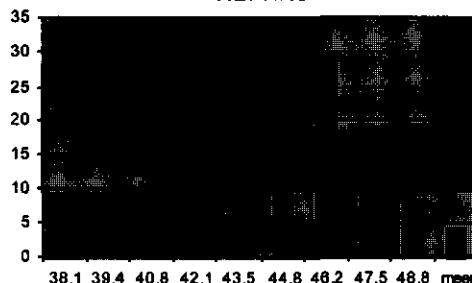
Materiaal : *RVS 316*

Specificaties :		
<i>W + X</i>	<i>0.0669</i>	<i>mm</i>
<i>W + Y</i>	<i>0.0481</i>	<i>mm</i>
<i>W - Y</i>	<i>0.0419</i>	<i>mm</i>

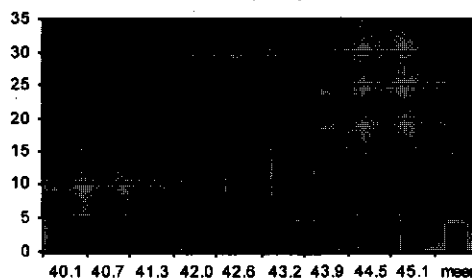
Warp/ketting		
<i>Wg =</i>	<i>0.0450</i>	<i>mm</i>
<i>s =</i>	<i>0.0023</i>	<i>mm</i>
<i>Wi_max =</i>	<i>0.0502</i>	<i>mm</i>
<i>Wi_min =</i>	<i>0.0381</i>	<i>mm</i>
<i>draaddikte d =</i>	<i>0.0307</i>	<i>mm</i>

Weft/inslag		
<i>Wg =</i>	<i>0.0431</i>	<i>mm</i>
<i>s =</i>	<i>0.0012</i>	<i>mm</i>
<i>Wi_max =</i>	<i>0.0458</i>	<i>mm</i>
<i>Wi_min =</i>	<i>0.0401</i>	<i>mm</i>
<i>draaddikte d =</i>	<i>0.0342</i>	<i>mm</i>

Frequentieverdeling (%)
KETTING



INSLAG



Meetmethode : *optisch*

Meetinstrument : *F245*

Resolutie : *0.1 µm*

Certificaatnummer : *DM400V4-F245-0302*

Gecalibreerd met : *KOBA stappeneindmaat (420 mm)*

Stappeneindmaatnummer : *9808K157 3594 (DKD-K-05201 99-04)*

Meting uitgevoerd door : *E. de Vos*

Datum : *5-11-02 11:18*

Klantnaam : Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

Certificaatnummer : 50776

Meting volgens NEN 2560

Status : OK

Visuele inspectie : OK

Nominale Maaswijdte:



Zeefdiameter : 300 mm

Materiaal : RVS 316

Specificaties :		
W + X	0.1038	mm
W + Y	0.0791	mm
W - Y	0.0709	mm

Warp/ketting		
Wg =	0.0722	mm
s =	0.0034	mm
Wi_max =	0.0799	mm
Wi_min =	0.0597	mm
draaddikte d =	0.0524	mm

Weft/inslag		
Wg =	0.0736	mm
s =	0.0027	mm
Wi_max =	0.0804	mm
Wi_min =	0.0660	mm
draaddikte d =	0.0523	mm

Meetmethode : optisch

Meetinstrument : F245

Resolutie : 0.1 µm

Certificaatnummer : DM400V4-F245-0302

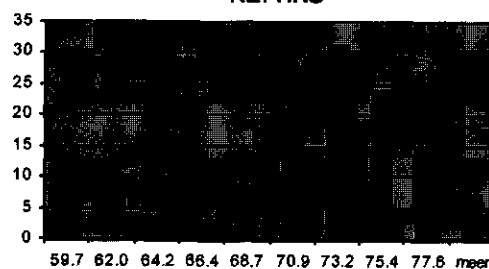
Gecalibreerd met : KOBA stappeneindmaat (420 mm)

Stappeneindmaatnummer : 9808K157 3594 (DKD-K-05201 99-04)

Meting uitgevoerd door : C. Meyer

Datum : 24-4-03 0:00

Frequentieverdeling (%)
KETTING



INSLAG

