

Oppervlakte-ontsmetting door oxidatie met waterstofperoxide of ozon

F. Schoorl

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen,
Boomkwekerij & Fruit
December 2014

Rapport nummer
2014-13

© 2014 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. 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 DLO.

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

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

Rapportnummer 2014-13; € 15,-

Projectnummer: 32610 913 02
PT nummer: 13405



Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bollen, bomen en fruit.

Adres : Lingewal 1, 6668 LA Randwijk
Postbus 200, 6670 AE Zetten
Tel. : +31 (0)488 473702
Fax : +31 (0)488 473717
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Algemeen.....	7
1.2 Leeswijzer.....	7
2 FASE 1 LITERATUUR ONDERZOEK	9
3 FASE 2 IN VITRO TESTEN.....	11
3.1 Werkwijze <i>in vitro</i> testen algemeen.....	11
3.1.1 Werkwijze testen waterstofperoxide	11
3.1.2 Werkwijze en resultaten testen ozon.....	12
3.2 Resultaten fase 2, <i>in vitro</i> testen.....	13
3.2.1 Kieming sporen	14
3.2.1.1 <i>Penicillium expansum</i>	14
3.2.1.2 <i>Botrytis cinerea</i>	16
3.2.2 Mycelium groei	18
3.2.2.1 <i>Penicillium expansum</i>	18
3.2.2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	19
3.2.3 Conclusies op basis van de experimenten voor sporenkieming en myceliumgroei	21
4 EXPERIMENTEN TOEPASSING WATERSTOFPEROXIDE VOOR REINIGING SCHILOPPERVLAK VAN APPEL OF PEER (FASE 3).....	23
4.1 Werkwijze.....	23
4.1.1 Behandeling van vruchten in detail.....	23
4.1.2 Uitgevoerde experimenten.....	24
4.1.3 Leeswijzer.....	25
4.2 Resultaten en conclusies dompelexperimenten.....	26
4.2.1 Startexperimenten met <i>Penicillium expansum</i> op Elstar en Conference.....	26
4.2.1.1 Resultaten exp. 1a Elstar geïnoculeerd met <i>Penicillium expansum</i>	26
4.2.1.2 Conclusie exp. 1a Elstar geïnoculeerd met <i>Penicillium expansum</i>	27
4.2.1.3 Resultaten exp. 1b Conference geïnoculeerd met <i>Penicillium expansum</i>	27
4.2.1.4 Conclusie exp. 1b Conference geïnoculeerd met <i>Penicillium expansum</i>	29
4.2.2 Startexperimenten met <i>Botrytis cinerea</i> op Elstar en Conference.....	29
4.2.2.1 Bespreking resultaten exp.2a Elstar geïnoculeerd met <i>Botrytis cinerea</i>	29
4.2.2.2 Resultaat experiment 2b Conference geïnoculeerd met <i>Botrytis Cinerea</i>	31
4.2.2.3 Conclusie 2b Conference geïnoculeerd met <i>Botrytis Cinerea</i>	32
4.2.3 Elstar inoculatie <i>Botrytis cinerea</i> : fytotoxische effecten (exp. 3a en 3b).....	32
4.2.3.1 Uitvoering en bespreking resultaten exp. 3a. Elstar <i>Botrytis cinerea</i>	33
4.2.3.2 Uitvoering en bespreking resultaten exp. 3b fytotoxische effecten H ₂ O ₂	34
4.2.4 Exp. 4 Conference inoculatie <i>Penicillium</i> en fytotoxische effecten H ₂ O ₂	39
4.2.4.1 Werkwijze exp. 4 Conference inoculatie en fytotoxische effecten H ₂ O ₂	40
4.2.4.2 Bespreking resultaten exp.4 inoculatie en fytotoxische effecten H ₂ O ₂	41
4.2.5 Exp.5 Elstar inoculatie met <i>Botrytis cinerea</i> , behandeld met middel C	43
4.2.5.1 Werkwijze exp. 5 Elstar inoculatie en behandeld met middel C.....	43
4.2.5.2 Bespreking resultaten exp.5 Elstar inoculatie en behandeld met middel C	43

5	CONCLUSIES EN ADVIES M.B.T. GO /NO GO	45
5.1	Gebruik van waterstofperoxide voor ontsmetting van oppervlak van vruchten	45
5.2	Knelpunten toepassing ozon tegen vruchtrot.....	45
5.3	Advies m.b.t. GO/NO GO fase 4.....	45
6	LITERATUUR.....	47
	BIJLAGE 1	49
	BIJLAGE 2	51
	BIJLAGE 3.....	53

Samenvatting

Het optreden van vruchtrot kan leiden tot aanzienlijke verliezen van geoogste en opgeslagen appels en peren. Fungiciden worden doorgaans gebruikt om deze verliezen te beperken. Ondanks toepassing van fungiciden komt het optreden van vruchtrot voor. Verschillende winkelketens hanteren normen met betrekking tot de aanwezigheid van residuen van gewasbeschermingsmiddelen die boven de wettelijke normen liggen. Naast wettelijke normen vormt dit een extra aanleiding om te komen tot aangepaste werkwijze ter bestrijding van vruchtrot schimmels.

Meerdere schimmels zijn verantwoordelijk voor het optreden van vruchtrot. Daaronder zijn ook schimmels die via het oppervlak van de vruchten, veelal via een wond, vruchten infecteren. Bij de oogst kunnen, afhankelijk van de zorgvuldigheid waarmee geplukt wordt, wonden optreden die een invalspoort vormen voor schimmels.

In dit project is aandacht besteed aan het voorkomen van infecties. Literatuuronderzoek, de eerste fase in dit project, leidde tot de conclusie dat oxiderende middelen als waterstofperoxide (H_2O_2) en ozon (O_3) mogelijk gebruikt kunnen worden bij de bestrijding van schimmels zonder dat deze middelen residuen achter laten. In de tweede fase van dit project is de remmende werking op de kieming van schimmelsporen en de groei van schimmel (mycelium) van middelen die H_2O_2 bevatten onderzocht. Tevens is nagegaan bij welke concentraties deze middelen een voldoende remmende, of beter afdodende werking hebben.

De ontwikkeling van schimmels, zowel sporen als mycelium, *Botrytis cinerea* als *Penicillium expansum* kon duidelijk worden geremd. Deze zogenaamde *in vitro* experimenten zijn uitgevoerd in petrischalen met een voedingsbodem waarop sporen konden kiemen of het mycelium van schimmels kon groeien. Middelen die aan de voedingsbodems werden toegevoegd remden de ontkieming van sporen en de groei van mycelium. Op basis van de resultaten uit deze tweede fase is besloten met H_2O_2 bevattende middelen de derde fase van het onderzoek in te gaan. Met enkele middelen zijn experimenten uitgevoerd met vruchten die kunstmatige waren besmet met sporen van de schimmels. Hierbij is door kunstmatige verwonding en het aanbrengen van sporen op het oppervlak van schimmels een ongunstige situatie kort na oogst nagebootst. Enkele uren na besmetting zijn de vruchten gedompeld in verschillende concentraties van H_2O_2 bevattende middelen. Bij het uitvoeren van deze experimenten bleek dat de concentraties die nodig waren voor het vermijden van het ontwikkelen van infecties in de besmette vruchten duidelijk hoger dienden te zijn dan in de *in vitro* experimenten. De werking van H_2O_2 is afhankelijk van de concentratie van het middel en de duur van de periode dat het middel aanwezig is. Variatie in concentratie en behandelingsduur (dompeltijd) maakte duidelijk dat een voldoende werkzame toepassing van H_2O_2 lastig was te vinden. Hogere concentraties en behandelduren leidde wel tot minder ontwikkelde infecties maar bleken tevens fytotoxisch te zijn.

Lenticellen, aanwezige wondjes en plaatsen op de vrucht waar na dompelen langdurig vloeistof bleef staan vertoonden schade in de vorm van bruine, soms ingezonken plekken. De combinatie dompelen met spoelen en/of drogen van de vruchten verminderde de schade door H_2O_2 wel maar niet voldoende. Uiteindelijk is geconcludeerd dat zowel de geteste waterstofperoxide bevattende middelen onvoldoende werkzaam waren en/of teveel schade op de behandelde vruchten veroorzaakten. De middelen die in de test zijn gebruikt waren standaard H_2O_2 , een middel dat naast H_2O_2 perazijnzuur bevatte. Dit laatste middel wordt doorgaans gebruikt om het oppervlak van vloeren, werktafels en dergelijke te ontsmetten. Ook een middel dat in de glastuinbouw gebruikt wordt tegen meeldauw, bleek op Elstar, besmet met sporen van *Botrytis cinerea*, onvoldoende effect te hebben.

Bij aanvang van de experimenten is uitgegaan van de gedachte dat toepassingen van H_2O_2 en O_3 gecombineerd mogelijk een afdoende werking tegen de ontwikkeling van schimmels zouden hebben. De werking van zowel H_2O_2 als O_3 is gebaseerd op oxidatie. Dit vindt plaats zolang er contact is tussen de oxiderende stof en de te oxideren schimmelsporen. Na het dompelen en drogen van de vruchten is er na enig tijd geen waterstofperoxide meer voorhanden en is er geen werking meer tegen schimmelsporen. Geredeneerd vanuit de situatie dat appels en peren na de oogst langdurig worden opgeslagen werd uitgegaan van de idee kort na oogst een dompelbehandeling uit te voeren zodat de vruchten met een schoon oppervlak de bewaarcel in kunnen.

Het aanbrengen van een lage concentratie O_3 in de bewaarcel gedurende de bewaarperiode van enkele maanden, kan wellicht de kieming en groei van schimmels remmen.

Analoog aan de experimenten met H_2O_2 was de opzet om kleinschalig op petrischalen het effect van ozon op kieming en groei van mycelium te onderzoeken. Een beeld krijgen van drempelwaarden die een werking tegen schimmels hadden was daarbij het uitgangspunt. Vervolgens was de planning om, wederom analoog aan de H_2O_2 testen, appels en/of peren geïnfecteerd met sporen van *Penicillium expansum* of *Botrytis cinerea* te begassen met O_3 .

Technische beperkingen en het vooruitzicht dat een toelating voor toepassing voor O_3 tegen het optreden van vruchtrot niet makkelijk gerealiseerd kon worden, hebben uiteindelijk geleid tot het staken het onderzoek naar de mogelijkheden om O_3 toe te passen tegen vruchtrot.

Het verkrijgen van toelating voor O_3 tegen vruchtrot is nodig omdat de toepassing gezien gaat worden als een gewasbeschermingsmiddel. Dit in tegenstelling tot bestaande toepassingen waarbij deze stoffen worden ingezet om ruimten en werkoppervlakken te ontsmetten.

Een geplande vierde fase van het onderzoek is uiteindelijk niet uitgevoerd op basis van de behaalde resultaten in de eerdere fases. In die vierde fase waren testen op (semi)praktijkschaal gepland van H_2O_2 en/of O_3 toepassingen om zo via een schoon oppervlak vruchtrot bij appel en peer tegen te gaan.

1 Inleiding

1.1 Algemeen

De tendens in de markt om tot normen voor minder (in hoeveelheid en aantal stoffen) residu van gewasbeschermingsmiddelen op groente en fruit te komen is aanleiding geweest om onderzoek te starten naar middelen of methoden om zonder residuen van gewasbeschermingsmiddelen appels en peren direct na oogst en in de bewaarfase te beschermen tegen het optreden van vruchtrot.

Verskillende winkelketens hanteren normen met betrekking tot de aanwezigheid van residuen van gewasbeschermingsmiddelen die boven de wettelijke normen liggen. Naast wettelijke normen vormt dit een extra aanleiding om te komen tot aangepaste werkwijze ter bestrijding van vruchtrot schimmels.

Meerdere schimmels zijn verantwoordelijk voor het optreden van vruchtrot. Daaronder zijn ook schimmels die via het oppervlak van de vruchten, veelal via een wond, vruchten infecteren. Bij de oogst kunnen, afhankelijk van de zorgvuldigheid waarmee geplukt wordt, wonden optreden die een invalspoort vormen voor schimmels. In dit project is uitgegaan van de gedachte dat, wanneer de hoeveelheid schimmelmateriaal (o.a. sporen) op het vruchtoppervlak van vruchten relatief laag gehouden kan worden, de kans op het optreden van een infectie via het oppervlak (bijvoorbeeld via wondjes of lenticellen) en uiteindelijk het optreden van vruchtrot kleiner wordt.

Het meerjarige project is opgebouwd uit een viertal fases:

- Fase 1: Literatuurstudie
- Fase 2: In vitro experimenten om de werking van een potentiële behandeling te testen op relevante schimmels.
- Fase 3: Experimenten om werking van de behandeling op geïnoculeerde vruchten te testen
- Fase 4: Experimenten op praktijkschaal .

Tussen de fasen werd een Go/ No go moment ingebouwd, waarbij aan de hand van de resultaten werd bepaald of experimenten in een volgende fase ingezet konden worden

1.2 Leeswijzer

De hier besproken resultaten en conclusies betreffen de nodige experimenten. Meermaals komt de opzet van een volgend experiment voort uit de resultaten van een voorgaand experiment. Voor de leesbaarheid is derhalve gekozen voor het min of meer chronologisch beschrijven van de verschillende experimenten. De lijn om eerst de werkwijze van alle experimenten weer te geven om vervolgens resultaten te vermelden en uiteindelijk conclusies is om die reden niet gevolgd.

2 Fase 1 Literatuur onderzoek

De in fase 1 uitgevoerde literatuurstudie (Bestrijding van vruchtrot en schimmels met ozon en waterstofperoxide (Balkhoven-Baart et al. 2009) leidde tot de conclusie dat behandelingen met waterstofperoxide en/of ozon perspectieven boden.

Op grond van die conclusie is de lijn gekozen om zowel de mogelijkheden van waterstofperoxide als die voor ozon nader te bekijken. Enerzijds om na te gaan of de behandelingen op zich voldoende potentie hadden om zonder residu voldoende bescherming tegen bewaarrot te bieden. Anderzijds was de gedachte dat behandelingen met waterstofperoxide en behandelingen met ozon elkaar aan zouden vullen. De volgende gedachte lag daaraan ten grondslag. Een behandeling met waterstofperoxide (douche of dompelen) van geoogste appels kort na de pluk dood veel van de schimmels die op dat moment op het oppervlak van de vruchten en op het oppervlak van aanwezige, verse, plukschade aanwezig zijn. De geoogste vruchten kunnen zo schoner in de bewaarcel worden gezet. De werking van waterstofperoxide is gebaseerd op oxidatie. Contact tussen middel en organisme is noodzakelijk voor de werking. De werking is kortstondig. Door ozon, eveneens een stof met een oxiderende werking, toe te passen in de bewaarcel kan een permanente behandeling van de ruimte met het daarin aanwezig fruit plaats vinden.

3 Fase 2 in vitro testen

3.1 Werkwijze *in vitro* testen algemeen

De werking van ozon of middelen met waterstofperoxide als werkzaam bestanddeel wordt getest op petrischalen met daarop sporen of mycelium van schimmels. *Botrytis cinerea* en *Penicillium expansum* zijn schimmels die via wonden, dus via het schiloppervlak, de vruchten infecteren. Met deze schimmels zijn de testen uitgevoerd. De algemene lijn voor deze testen was dat sporen, aangebracht op een voedingsbodem (met daarin waterstofperoxide) werden blootgesteld aan verschillende concentraties waterstofperoxide. Door de kieming van de aangebrachte sporen te volgen kon worden vastgesteld of de geteste concentraties effect op de kieming van sporen hadden. Op vergelijkbare wijze werd de groei van op de voedingsbodem aangebracht mycelium vastgesteld. Ook hier was het waterstofperoxide in de voedingsbodem aangebracht. In plaats van gekiemde sporen werd nu de groei van het mycelium gemeten door na enkele dagen de diameter te meten van het op de voedingsbodem ontwikkelde mycelium.

Het testen van de effectiviteit van ozon tegen de kieming van sporen en de groei van mycelium zou plaats vinden door petrischalen met sporen of mycelium gedurende langere tijd te plaatsen in een ruimte waar in een constante concentratie gerealiseerd kon worden. De insteek was dat binnen een experiment meerdere concentraties naast elkaar getest konden worden. In literatuur (Sharpe et al., 2009) werd beschreven dat ozon concentraties van 450 en 600 ppb op de groei van mycelium van *Botrytis cinerea* een dusdanig effect hadden dat de myceliumgroei (in de hoogte) werd geremd en er geen sporenvorming plaats vond. Op grond van die resultaten werd gekozen voor een opzet waarbij de ozonconcentraties 0, 250, 500, 750 en 1000 ppb getest zouden worden.

3.1.1 Werkwijze testen waterstofperoxide

De werking van waterstofperoxide en de waterstofperoxide-bevattende middelen A en B berust op oxidatie. De werking is relatief kort. De middelen A en B bevatten naast waterstofperoxide andere stoffen. Deze toevoegingen maken het middel stabiel. In middel B is perazijnzuur aanwezig. In de uitgevoerde experimenten zijn de concentraties aanwezig waterstofperoxide van de gebruikte oplossingen vermeld (als % waterstofperoxide). Bij de experimenten met kieming van sporen en groei van mycelium zijn drie middelen getest:

- Waterstofperoxide
- Middel A
- Middel B

Meer informatie m.b.t. dosering staan vermeld in bijlage 1.

Voor de testen met kieming van sporen is gebruik gemaakt van wateragar (1,5 gram per 100 ml). De verschillende doseringen van de middelen werden in de voedingsbodem aangebracht door kort voor het gieten van de platen in de petrischaal de gewenste hoeveelheid middel te pipeteren. Na stollen en drogen van de platen werd op iedere plaat 200 microliter sporensuspensie aangebracht (ca. $1,5 \times 10^5$ sporen per ml). Binnen dergelijke testen werd iedere combinatie van middel en concentratie in drievoud uitgevoerd. Op meerdere tijdstippen na het inzetten werd per plaat van 100 of 200 sporen vastgesteld of kieming had plaats gevonden.

Voor de test van het effect op myceliumgroei werden platen aardappeldextrose agar (3,9 gram per 100 ml) met daarin de verschillende concentraties middelen gebruikt. De verschillende doseringen van de middelen werden in de voedingsbodem aangebracht door kort voor het gieten van de platen in de petrischaal de gewenste hoeveelheid middel te pipeteren. Binnen die testen werd iedere combinatie van middel en concentratie in drievoud uitgevoerd.

Op meerdere tijdstippen na het inzetten werd per plaat de diameter (gemiddelde van 2 metingen) van het uit het ponsje ontwikkelde mycelium vastgesteld met behulp van een schuifmaat. De testen zijn uitgevoerd met sporen en ponsjes jong (niet sporulerend) mycelium van *Botrytis cinerea* en *Penicillium expansum*.

Gaande weg de uitvoering zijn de geteste concentraties waterstofperoxide nog iets bijgesteld. De gehanteerde concentraties waterstofperoxide zijn per experiment als % waterstofperoxide vermeld bij de resultaten. Uiteindelijk zijn drie testen voor effecten op kieming van sporen van *Penicillium expansum* uitgevoerd en twee voor effecten op kieming van *Botrytis cinerea* sporen. Voor het vaststellen van effecten van de combinaties middel/ concentratie op myceliumgroei zijn voor zowel *Botrytis cinerea* als *Penicillium expansum* twee series testen uitgevoerd.

3.1.2 Werkwijze en resultaten testen ozon

In literatuur (Sharpe et al, 2009) werd beschreven dat ozon concentraties van 450 en 600 ppb op de groei van mycelium van *Botrytis cinerea* een dusdanig effect hadden dat de myceliumgroei (in de hoogte) werd geremd en er geen sporenvorming plaats vond. Op grond van die resultaten werd gekozen voor een opzet waarbij de ozonconcentraties 0, 250, 500, 750 en 1000 ppb getest zouden worden.

Evenals bij de experimenten met waterstofperoxide werd gekozen voor het aanbrengen van sporensuspensie op een petrischaal met wateragar. Na enkele dagen begassing met ozon zou op basis van het aantal gekiemde sporen de effectiviteit van de ozon concentraties vastgesteld kunnen worden.

In de uitvoering, waarbij nauw werd samen gewerkt met leveranciers van ozon apparatuur, traden problemen op die onvoorzien en hardnekkiger waren dan vooraf inschat. Uiteindelijk heeft dat ertoe geleid dat lang gezocht is naar oplossingen om te komen tot een goede testopstelling voor het uitvoeren van experimenten. Dit heeft uiteindelijk niet tot een geschikte opstelling geleid. De knelpunten bij het komen tot een bruikbare opstelling waren:

- Het realiseren van een stabiele ozonconcentraties in een kleine testruimte (tot ca. 20 liter). Voor kleine ruimtes zijn geen geautomatiseerde systemen beschikbaar die in een ruimte een constante concentratie ozon kunnen realiseren.
- Ozon generatoren hebben droge lucht nodig om ozon te generen. Deze droge lucht kan niet rechtstreeks in de ruimte waar petrischalen staan worden toegepast omdat door uitdroging de voedingsbodem uitdroogt en dan niet alleen het ozongas effect heeft maar ook de droge lucht de kieming van sporen en de ontwikkeling van mycelium remt.

Na meerdere pogingen om in samenwerking met een leverancier een testopstelling te maken is geconcludeerd dat de beoogde aanpak niet binnen de beschikbare budgettaire ruimte gerealiseerd kon worden. Overwogen is om experimenten op een andere (nader te bepalen wijze) op te zetten.

In de laatste fase is besloten het experiment niet op andere wijze uit te voeren. In die fase was een belangrijke bijkomende reden dat op basis van ingewonnen informatie het zeer twijfelachtig werd of voor de toepassing van ozon in praktijksituaties een toelating gerealiseerd kan worden. Voor de toepassing als biocide is de verwachting dat leveranciers van ozon apparatuur bereid zijn een toelating aan te vragen. Wanneer het een toelating als gewasbeschermingsmiddel betreft zal dit naar verwachting niet plaats vinden. Met betrekking tot dit onderwerp is afstemming gezocht met Agrozone bv (leverancier van ozonapparatuur) en het CTGB.

Uit contact met Agrozone BV een leverancier van ozonapparatuur kwam naar voren:

De toepassing van ozon als biocide voor schimmelbestrijding wordt al toegepast in bewaar ruimten. Deze toepassing (<120 ppb) is dan bestemd voor het schimmel vrijhouden van ruimte en het tegengaan van sporulatie van schimmel en groei van schimmels.

De daarbij te gebruiken ozon concentraties (continue begassing) zijn zeer laag, vergelijkbaar met concentraties zoals deze buiten in de natuur voorkomen, aldus Agrozone BV.

Een ozontoepassing met hogere concentraties dan bij schimmelvrijhouden waarbij het doel is ziekte en virussen aan de oppervlakte af te doden op appels of peren (productdecontaminatie) zal gezien worden als gewasbescherming met de daaraan verbonden de eis van toelating.

De toepassing productdecontaminatie ligt gevoelig bij diverse instanties zoals de NVWA, omdat het gevaar bestaat dat ozon gebruikt gaat worden om slechte kwaliteit producten mogelijk weer op te waarderen. Denk hierbij een vlees en vis producten.

De verwachting is dan ook dat bedrijven die ozonapparatuur leveren niet investeren in een toelating voor de toepassing van ozon als gewasbeschermingsmiddel of decontaminatie middel.

Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld USA en Australië waar ozon juist wel toegepast mag worden voor product behandeling.

Bovenstaande maakt het voorlopig niet realistisch om te verwachten dat er een toepassing met hoge ozonconcentratie beschikbaar komt, maar wel voor de lage concentraties voor de toepassing tegen schimmels.

Afstemming met CTGB leidde tot het volgende beeld:

- Ozon ter bestrijding of voorkoming van bewaarrot is een gewasbeschermingstoepassing.
- Ozon ter algemene ontsmetting van lege opslagruimten betreft een biocide toepassing.
- De te gebruiken concentratie ozon is niet van belang voor de kwalificatie van de toepassing (biocide of gewasbeschermingsmiddel).

Het doel van de behandeling bepaalt dus of het product een gewasbeschermingsmiddel dan wel biocide is. Zodra de bedoeling is een plantpathogeen te bestrijden betreft het een gewasbeschermingstoepassing.

Algemene desinfectie zonder verwijzing naar plantenziekten of bestrijding van plantpathogeen is een biocide toepassing.

Deze situatie overziend maakte het niet aannemelijk dat in de toekomst een toelating als gewasbeschermingsmiddel voor toepassing van ozon ter bestrijding van pathogene schimmels (bewaarrot) wordt aangevraagd.

Agrozone BV heeft besloten een aanvraag voor toelating als biocide te doen. In dat traject zal verder duidelijk worden wat binnen die toelating wordt toegestaan. Daarbij zal het bedrijf zich richten op lage concentraties (<120 ppb). Afgaand op de opstelling van het CTGB lijkt een biocide toepassing in ruimte met opgeslagen product niet vanzelfsprekend goed gekeurd te worden. Agrozone bv geeft aan dat in de huidige praktijk over de zienswijze van ruimtebehandelingen met ozon verschillende meningen bestaan. Tot nu toe zijn bij vragen van CTGB, NVWA en BRC-audits, na nadere toelichting alle betreffende systemen toegelaten. Agrozone geeft aan te verwachten dat middels het aanvragen van een toelating voor ozon als biocide deze onduidelijkheden worden opgelost.

In de afweging wat te doen binnen dit onderzoek heeft de informatie van het CTGB in deze het zwaarst gewogen en in combinatie met de proeftechnische knelpunten geleid tot het stilzetten van het traject waarin gezocht werd naar een ozonbehandeling tegen schimmels (*Botrytis cinerea* en *Penicillium expansum*) die via het oppervlak van vruchten binnen dringen en bewaarrot veroorzaken.

3.2 Resultaten fase 2, *in vitro* testen

De resultaten van de experimenten met waterstofperoxide bevattende middelen worden hier behandeld. Onder 3.2 komen de experimenten aan de orde waarbij mycelium of sporen op een voedingsbodem in een petrischaal zijn blootgesteld aan verschillende concentraties waterstofperoxide bevattende middelen. Omwille van de leesbaarheid van het verslag zijn in 3.2.3 de belangrijkste conclusies van deze experimenten weergegeven. Die conclusies vormden tevens de basis voor de invulling van experimenten van fase 3 (hoofdstuk 4).

De resultaten van de *in vitro* testen bestaan uit:

Resultaten kiemingsexperimenten sporen *Penicillium expansum* (3.2.1.1).

Resultaten kiemingsexperimenten sporen *Botrytis cinerea* (3.2.1.2).

Resultaten experimenten myceliumgroei *Penicillium expansum* (3.2.2.1)

Resultaten experimenten myceliumgroei *Botrytis cinerea* (3.2.2.2)

3.2.1 Kieming sporen

3.2.1.1 *Penicillium expansum*

Het effect van waterstofperoxide en de middelen A en B op de kieming van sporen van *Penicillium expansum* is in drie verschillende experimenten getest. De resultaten van deze experimenten worden hieronder behandeld.

Uit het eerste experiment (tabel 1) blijkt dat zeer lage doseringen waterstofperoxide (H_2O_2) al bijdragen tot het voorkomen van kieming. Tot en met 8 dagen na inzetten vond geen of nauwelijks kieming plaats, met uitzondering van de voedingsbodem waaraan geen waterstofperoxide was toegevoegd.

Tabel 1: Gemiddeld (n=3) percentage kieming van *Penicillium expansum* sporen op wateragar met concentraties waterstofperoxide (% H_2O_2) door toegevoegd waterstofperoxide, middel A of B, na 48 tot 192 uur. Experiment P1.

middel	% H_2O_2	beoordeling (uur na inzetten)			
		48	72	96	192
H_2O_2	0	14.9	21.0	*	*
	0.0125	0.5	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0	16.4	27.7	*	*
	0.0125	0.2	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
B ¹	0	15.9	24.2	*	*
	0.042	0.2	0.0	0.0	0.0
	0.083	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.167	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.25	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.333	0.0	0.0	0.0	0.0

* = door groei na kieming niet meer te tellen

¹ formulering bevat ook perazijn zuur

Het tweede experiment werd ingezet met over de gehele linie lagere concentraties.

Uit deze resultaten (tabel 2) bleek dat een dosering van 0.0125% waterstofperoxide, bereikt met formulering B, de kieming van sporen tegen ging. Daar waar alleen waterstofperoxide en middel A waren toegevoegd was zelfs bij de helft van die dosering een duidelijk effect waarneembaar. Ook in dit experiment bleek na een langere periode (168 uur) nog geen kieming plaats te vinden van sporen van *Penicillium expansum*.

Tabel 2: Gemiddeld (n=3) percentage kieming van *Penicillium expansum* sporen op wateragar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide, middel A of B, na 48 tot 168 uur. Experiment P2.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)		
		48	72	168
H ₂ O ₂	0	10.8	37.6	*
	0.0061	0.0	0.3	0.0
	0.0125	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0
A	0	33.1	36.0	*
	0.0061	0.0	0.0	0.0
	0.0125	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0
B ¹	0	18.1	18.8	*
	0.0061	0.2	3.5	*
	0.0125	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0

* = door groei na kieming niet meer te tellen

¹ formulering bevat ook perazijn zuur

In de eerste twee experimenten was het percentage kieming van sporen op platen zonder toevoeging van waterstofperoxide houdende middelen na 48 uur nog vrij laag. Het zou kunnen zijn dat hier sprake was van minder vitaal materiaal of een besmetting met bijvoorbeeld gisten. Het lage kiemingspercentage was de reden om een derde experiment uit te voeren.

Het beeld uit de eerste twee experimenten werd in een derde experiment bevestigd (tabel 3). In dit derde experiment was de kiemkracht van de gebruikte sporensuspensie duidelijk beter dan in de twee eerdere experimenten. Echter ook bij deze mogelijk vitalere sporen was de werking vergelijkbaar met de resultaten uit de eerste twee experimenten. Waterstofperoxide en de middelen A en B hadden bij relatief lage concentraties al een remmende werking op de kieming van sporen van *Penicillium expansum*. In tabel 10 staan per experiment de laagste geteste concentraties vermeld waarbij geen kieming werd waargenomen.

Tabel 3: Gemiddeld (n=3) percentage kieming van *Penicillium expansum* sporen op wateragar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide, middel A of B, na 48 tot 120 uur. Experiment P3.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)		
		24	48	120
H ₂ O ₂	0	86.0	*	*
	0.0125	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0
A	0	79.0	*	*
	0.0125	0.0	0.0	1.0
	0.025	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0
B ¹	0	79.3	*	*
	0.0125	0.0	0.0	0.0
	0.025	0.0	0.0	0.3
	0.05	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0

* = door groei na kieming niet meer te tellen

¹ formulering bevat ook perazijn zuur

3.2.1.2 *Botrytis cinerea*.

Het effect van waterstofperoxide en de middelen A en B op de kieming van sporen van *Botrytis cinerea* is in twee verschillende experimenten getest. In deze beide experimenten werden na 24 uur hoge percentages kiemende sporen waargenomen op de platen zonder toevoeging van waterstofperoxide of de middelen A of B. Uit het eerste experiment (tabel 4) bleek dat de laagste geteste concentraties al een duidelijk effect op de kieming hadden. In het tweede experiment (tabel 5) werden om die reden de geteste concentraties verlaagd.

Tabel 4: Gemiddeld (n=3)percentage kieming van *Botrytis cinerea* sporen op wateragar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide, middel A of B, na 24 tot 144 uur. Experiment B1.

middel	% H ₂ O ₂	Beoordeling (uur na inzetten)		
		24	48	144
H ₂ O ₂	0	98.7	98.7	*
	0.0125	0.0	5.0	18.3
	0.025	0.0	0.0	3.6
	0.05	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0
A	0	97.3	99.3	*
	0.0125	0.0	22.3	2.3
	0.025	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0
	0.075	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0
B ¹	0	97.7	98.0	*
	0.0417	0.0	0.0	0.0
	0.0833	0.0	0.0	0.0
	0.1667	0.0	0.0	0.0
	0.25	0.0	0.0	0.0
	0.3333	0.0	0.0	0.0

* = door groei na kieming niet meer te tellen

¹ formulering bevat ook perazijn zuur

Tabel 5: Gemiddeld (n=3)percentage kieming van *Botrytis cinerea* sporen op wateragar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide, middel A of B, na 24 tot 168 uur. Experiment B2.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)			
		24	48	72	168
H ₂ O ₂	0	99.5	99.0	99.0	*
	0.0061	0.0	1.0	0.7	45.7
	0.0125	0.0	0.0	0.0	15.7
	0.025	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0	93.0	94.5	95.5	*
	0.0061	0.0	0.0	0.0	16.3
	0.0125	0.0	0.0	0.0	76.7
	0.025	0.0	0.0	0.0	11.0
	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
B ¹	0	99.3	99.3	99.7	*
	0.0061	0.3	99.3	100.0	*
	0.0125	0.0	1.3	37.1	47.0
	0.025	0.0	0.0	1.0	1.7
	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0

* = door groei na kieming niet meer te tellen

¹ formulering bevat ook perazijn zuur

Uit de resultaten per experiment zijn per formulering de laagste concentraties gezocht waarbij de sporen van *Botrytis cinerea* niet kiemden. Deze concentraties zijn weergegeven in tabel 10.

Voor het remmen van de kieming van sporen van *Botrytis cinerea* waren iets hogere concentraties nodig dan bij *Penicillium expansum* sporen.

3.2.2 Mycelium groei

3.2.2.1 *Penicillium expansum*

De groei van het mycelium vanuit het op de voedingsbodem aangebrachte myceliumponsje in experiment MP1 (tabel 6) blijkt bij oplopende concentraties van waterstofperoxide beter geremd te worden. Bij concentraties van ca. 2% waterstofperoxide vond geen groei meer plaats van mycelium. Bij middel B lag de grens bij 0.25%. In het tweede experiment, MP2 (tabel 7) lagen die concentraties op 2% voor H₂O₂, voor middel A op 1% en voor middel B op 0.1%.

Tabel 6: Gemiddeld (n=3) myceliumgroei (diameter in mm) van *Penicillium expansum* op PDA agar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide na 24 tot 168 uur, experiment MP1.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)	
		72	168
H ₂ O ₂	0	22.4	52.8
	0.025	22.2	53.4
	0.05	20.5	51.7
	0.1	16.5	47.9
	0.25	9.4	37.8
	0.5	7.8	15.1
	1	2.0	5.8
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
A	0	23.3	48.3
	0.025	14.7	46.3
	0.05	19.2	49.5
	0.1	18.8	49.8
	0.25	10.4	41.0
	0.5	6.8	18.4
	1	1.0	2.9
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
B	0	22.4	54.5
	0.025	83.9	51.3
	0.05	17.9	48.1
	0.1	8.1	27.0
	0.25	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0

Tabel 7: Gemiddeld (n=3) myceliumgroei (diameter in mm) van *Penicillium expansum* op PDA agar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide na 24 tot 168 uur, experiment MP2.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)	
		72	168
H ₂ O ₂	0	25.0	49.8
	0.025	24.4	55.1
	0.05	22.3	53.1
	0.1	18.9	50.2
	0.25	12.1	41.0
	0.5	8.2	16.3
	1	5.1	11.5
	2	1.0	0.0
	3	0.0	0.0
A	0	25.4	49.4
	0.025	24.9	54.2
	0.05	24.0	53.7
	0.1	22.3	52.7
	0.25	11.8	40.7
	0.5	2.0	14.4
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
B	0	25.9	52.7
	0.025	21.3	52.4
	0.05	20.5	49.9
	0.1	0.0	0.0
	0.25	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0

3.2.2.2 *Botrytis cinerea*

Op de voedingsbodems waaraan waterstofperoxide concentraties waren toegevoegd nam de groei van het mycelium eveneens af bij hogere concentraties. In experiment MB1 (tabel 8) groeide bij concentraties van ca. 1% waterstofperoxide en middel A het mycelium van het op de voedingsbodem aangebrachte ponsje niet. Bij middel B lag deze grens bij de concentratie waarbij ca. 0.1% waterstofperoxide in de voedingsbodem aanwezig was.

In het tweede experiment, MB2 (tabel 9), remde van alle drie de formuleringen dezelfde concentraties als in experiment MB1 de ontwikkeling van mycelium volledig.

Tabel 8: Gemiddeld (n=3) myceliumgroei (diameter in mm) van *Botrytis cinerea* op PDA agar met concentraties waterstofperoxide (% H₂O₂) door toegevoegd waterstofperoxide na 72 en 168 uur, experiment MB1.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)	
		72	168
H2O2	0	48.9	87.0
	0.025	28.7	87.0
	0.05	13.8	87.0
	0.1	8.2	67.4
	0.25	2.8	6.1
	0.5	0.7	0.0
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
A	0	46.6	87.0
	0.025	31.1	87.0
	0.05	20.7	87.0
	0.1	9.6	62.0
	0.25	5.0	7.4
	0.5	2.0	0.0
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
B	0	50.0	87.0
	0.025	38.5	87.0
	0.05	22.0	87.0
	0.1	0.0	0.0
	0.25	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0

Tabel 9: Gemiddeld (n=3) myceliumgroei (diameter in mm) van *Botrytis cinerea* op PDA agar met toegevoegde concentraties H₂O₂, middel A of B, na 72 en 168 uur, experiment MB2.

middel	% H ₂ O ₂	beoordeling (uur na inzetten)	
		72	168
H ₂ O ₂	0	67.1	87.4
	0.025	32.6	87.4
	0.05	15.5	87.4
	0.1	9.5	68.8
	0.25	5.7	17.0
	0.5	0.0	1.2
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
A	0	67.8	87.4
	0.025	34.5	87.4
	0.05	19.7	87.4
	0.1	8.7	67.4
	0.25	2.8	7.6
	0.5	0.7	1.1
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0
B	0	67.0	87.4
	0.025	41.4	87.4
	0.05	20.1	80.3
	0.1	0.0	0.0
	0.25	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0
	1	0.0	0.0
	2	0.0	0.0
	3	0.0	0.0

3.2.3 Conclusies op basis van de experimenten voor sporenkieming en myceliumgroei

Uit de verschillende experimenten werd duidelijk dat waterstofperoxide, middel A en middel B, toegevoegd aan een voedingsbodem leidde tot:

- Voorkomen van kieming van sporen van zowel *Penicillium expansum* als *Botrytis cinerea*. De laagste concentratie waarbij geen sporen meer kiemen was voor *Penicillium expansum* ca. 0.012% en voor *Botrytis cinerea*: 0.05%
- Het remmen van de ontwikkeling van mycelium. Zowel bij *Penicillium expansum* als bij *Botrytis cinerea* kon myceliumgroei voorkomen worden door toevoeging van waterstofperoxide of middelen die waterstofperoxide bevatten. Bij concentraties van 1 tot 2 % waterstofperoxide in de voedingsbodem bleek mycelium van *Penicillium expansum* zich niet meer te ontwikkelen. Met formulering B bleken concentraties van 0.1 tot 0.25% de groei van mycelium tegen te gaan. Voor *Botrytis cinerea* lag deze grens voor waterstofperoxide en voor middel A bij 1%. Middel B ging ook hier bij een lager percentage waterstofperoxide (0,1%) de ontwikkeling van mycelium tegen.

Op grond van deze experimenten kon geconcludeerd worden dat toepassing van waterstofperoxide tegen de schimmels *Penicillium expansum* en *Botrytis cinerea* perspectief bood om, op het oppervlak van geoogste appels of peren aanwezige, sporen en mycelium van deze schimmels uit te schakelen.

De resultaten waren aanleiding om toepasbaarheid van waterstofperoxide of waterstofperoxide bevattende middelen op geoogste appels te testen. Als richtlijn voor de te hanteren concentraties in deze vervolg experimenten werd gebruik gemaakt van de resultaten uit bovenstaande experimenten. In tabel 10 zijn de concentraties vermeld waarbij voor sporen de kieming en voor mycelium de ontwikkeling op de voedingsbodem werd tegengegaan.

Tabel 10: grensconcentraties H₂O₂ (%) per formulering waarbij sporenkieming of myceliumgroei (in vitro) van *Botrytis cinerea* en *Penicillium expansum* werd voorkomen.

schimmel	type test	experiment	% waterstofperoxide per formulering		
			H ₂ O ₂	A	B ¹
<i>Botrytis cinerea</i>	sporen	B1	0.05	0.025	0.042 ²
<i>Botrytis cinerea</i>	sporen	B2	0.025	0.05	0.05
<i>Penicillium expansum</i>	sporen	P1	0.0125 ²	0.0125 ²	0.042 ²
<i>Penicillium expansum</i>	sporen	P2	0.0061 ²	0.0061 ²	0.0125
<i>Penicillium expansum</i>	sporen	P3	0.0125	0.025	0.0125
<i>Botrytis cinerea</i>	mycelium	MB1	1.0	1.0	0.1
<i>Botrytis cinerea</i>	mycelium	MB2	1.0	1.0	0.1
<i>Penicillium expansum</i>	mycelium	MP1	2.0	2.0	0.25
<i>Penicillium expansum</i>	mycelium	MP2	2.0	1.0	0.1

¹ formulering bevat ook perazijn zuur

² lagere concentratie is niet getest

4 Experimenten toepassing waterstofperoxide voor reiniging schiloppervlak van appel of peer (fase 3)

In deze fase stond de vraag centraal of de, in vitro aangetoonde, werking van waterstofperoxide of waterstofperoxide bevattende middelen gebruikt kon worden om infecties op kunstmatig besmette (geïnoculeerd)vruchten voldoende effectief tegen te gaan. Deze experimenten zijn min of meer een simulatie van de situatie die tijdens de oogst van appels of peren op kan treden.

Sporen van *Botrytis cinerea* en *Penicillium expansum* zijn voor inoculatie gebruikt. De geïnoculeerde appels en/of peren werden gedompeld in oplossingen van waterstofperoxide en het waterstofperoxide bevattende middel B. Middel B bevatte naast waterstofperoxide ook perazijnzuur. Een oplossing van perazijnzuur en waterstofperoxide is stabiel en alleen waterstofperoxide.

4.1 Werkwijze

Voor alle experimenten werden vruchten gebruikt die gedurende de laatste maanden van de teelt geen behandeling met middelen tegen bewaarrot ondergingen. Zo werd vermeden dat eventueel aanwezig residu van middelen tegen bewaarrot onbedoeld effect op de proefresultaten zouden hebben.

De algemene werkwijze van experimenten die in deze fase werden uitgevoerd bestond uit het verwonden van vruchten, het inoculeren door een sporensuspensie op de vruchten te spuiten, korte incubatie bij kamertemperatuur, uitvoeren van een dompelbehandeling, in plastic zakken verpakt ca. 1 week bij 18°C bewaren en nadien beoordelen op het aanwezig zijn van aangeslagen inoculaties.

Tijdens ieder experiment werd een reeks van behandelingen ingezet. De behandelingen varieerde in duur (dompeltijden van 1 tot en met 8 minuten), middel en concentratie van het middel. Als controles zijn zowel geïnoculeerde als niet geïnoculeerde vruchten gedompeld in water en zijn geïnoculeerde vruchten in een oplossing van Switch (0,8 gram per liter) gedompeld. In latere fase was het al dan niet naspoelen met water of het drogen van gedompelde vruchten een handelingen die soms werd toegevoegd.

4.1.1 Behandeling van vruchten in detail

De vruchten die voor een experiment verwond werden, werden ieder keer op dezelfde wijze behandeld.

- Met behulp van een spijker in een klosje werd ieder keer een wond met dezelfde afmeting (doorsnede ca. 3 mm) en diepte geprikt. Iedere appel werd rondom op vier plaatsen aangeprikt. M.b.v. alcohol (90%) werd het klosje met spijker gedesinfecteerd om besmetting met andere micro-organismen te vermijden. Per vrucht zijn 4 wondjes aangebracht.
- Indien inoculatie plaats vond, werd op de wondjes een suspensie gespoten met sporen van *Penicillium expansum* of *Botrytis cinerea*. Daarbij werd gebruik gemaakt van een sporen oplossing van $1,5 \cdot 10^5$ sporen per ml. Inoculatie vond ca. 30 minuten na aanprikken plaats. De sporensuspensie werd m.b.v. een verstuiver (plantenspuit) op aangeprikte vruchten aangebracht.
- De kiemkracht van de gebruikte sporenoplossingen werd bij ieder experiment gecontroleerd. Bij alle hier beschreven experimenten was de achteraf vastgestelde kiemkracht goed.
- Na het aanbrengen van de sporen werd ca. 3-3,5 uur gewacht voordat de binnen het experiment geplande dompelbehandelingen werden uitgevoerd. Gedurende die tijd bleven de geïnoculeerde vruchten in de werkruimte (15° tot 20°C) staan.
- Voor de dompelbehandelingen werden de vruchten in een schone gaaszak gedaan en vervolgens werd het monster in een bak met te testen oplossing ondergedompeld. Om te zorgen dat de oplossing over het gehele vrucht oppervlak in contact kwam met de oplossing werden de gaaszakken met vruchten voorzichtig bewogen.
- Iedere behandeling waarbij inoculatie met sporen plaats vond werd in viervoud uitgevoerd. In een herhaling werden 10 vruchten op 4 plaatsen aangeprikt en indien van toepassing geïnoculeerd.

- In enkele experimenten werd de fytotoxische schade van behandelingen getest. Dergelijke behandelingen werden in tweevoud uitgevoerd. Per herhaling bestond een monster uit 10 vruchten, waarvan ieder vrucht rondom op 4 plaatsen was aangeprikt.
- Per experiment wordt in de navolgende rapportage vermeld of een monster werd geïnoculeerd of alleen aangeprikt.
- Na behandeling werden de vruchten uit de gaaszak gehaald en op pakbladen in kunststof fust gelegd. Dit geheel werd verpakt in een plastic zak om een voldoende hoge RV te realiseren voor ontwikkeling van de geïnoculeerde schimmel. De monsters met vruchten werden gedurende ca. een week bij 18°C bewaard.
- Nadien werden de vruchten beoordeeld op het ontstaan van infecties op de vier aangebrachte wonden op de vruchten. Per wond wordt vastgesteld of er een infectie tot stand was gekomen en werd de diameter (in mm) van het aan de buitenkant zichtbare rot rond de wond opgemeten met een schuifmaat. Per wond werden 2 diameters gemeten.
- Als controles zijn ,mede afhankelijk van het doel van het betreffende experiment controles ingebouwd, zoals dompelen in water en dompelen in een oplossing van Switch.

4.1.2 Uitgevoerde experimenten

In totaal zijn acht series met experimenten uitgevoerd. In tabel 11 zijn de verschillende experimenten benoemd. Daarbij is vermeld of appel (Elstar) of peer (Conference) in het experiment werd gebruikt, of de vruchten werden geïnoculeerd en welke schimmel werd gebruikt. Tevens is vermeld wat het doel van het experiment was.

Tabel 11: Uitgevoerde experimenten met gebruikte vruchten, gebruikte schimmel en doel van het experiment.

experiment	Vrucht	Schimmel	doel van test
1a	Elstar	<i>Penicillium expansum</i>	Effectiviteit middelen en concentraties
1b	Conference	<i>Penicillium expansum</i>	Effectiviteit middelen en concentraties
2a	Elstar	<i>Botrytis cinerea</i>	Effectiviteit middelen en concentraties
2b	Conference	<i>Botrytis cinerea</i>	Effectiviteit middelen en concentraties
3a	Elstar	<i>Botrytis cinerea</i>	Effectiviteit middel B, concentraties, behandelduur en verwijderen dompeloplossing
3b	Elstar	Geen	Schade door waterstofperoxide in middel B en vermijden schade door spoelen/drogen
4	Conference	<i>Penicillium expansum</i>	Effectiviteit van B, concentraties en ontstaan van schade door middel B
5	Elstar	<i>Botrytis cinerea</i>	Effectiviteit middel C

4.1.3 Leeswijzer

Vanwege de leesbaarheid zijn per experiment, voorafgaand aan de resultaten, tabellen opgenomen met details over de behandelingen binnen een experiment. De bespreking van de resultaten eindigt in veel gevallen met een conclusie over het uitgevoerde experiment. In sommige gevallen is tussentijds een resumé gemaakt. Dit als verduidelijking van de aanpak in een volgend experiment.

4.2 Resultaten en conclusies dompelexperimenten

4.2.1 Startexperimenten met *Penicillium expansum* op Elstar en Conference

4.2.1.1 Resultaten exp. 1a Elstar geïnoculeerd met *Penicillium expansum*

Tabel 12 geeft de uitgevoerde behandelingen weer.

Tabel 12: uitgevoerde behandelingen in experiment 1a

Behandeling	beschadiging	inoculatie	Middel en concentratie	Dompeltijd
Contr. -inoculatie	+	-	0% (water)	1 min.
Contr. +inoculatie	+	+	0% (water)	1 min.
Switch	+	+	Switch ¹	1 min.
H ₂ O ₂ (0.05%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.05%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.2%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.2%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.5%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.5%)	1 min.
H ₂ O ₂ (1%)	+	+	H ₂ O ₂ (1%)	1 min.
B (0,05%)	+	+	B (0.05% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0,2%)	+	+	B (0.2% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0.5%)	+	+	B (0.5 % H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (1%)	+	+	B (1% H ₂ O ₂) ²	1 min.

¹ 8 gr per 10 l

² dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1 voor exacte dosering.

De verschillen tussen de positieve en de negatieve controle zijn duidelijk (fig.1.). Op bijna alle plaatsen van inoculatie (99,4%) trad infectie op bij de positieve controle. Op de controle waarbij geen inoculatie plaats vond ontwikkelde zich op 2,5% van de beschadigingen een infectie. Ook de resultaten van de na inoculatie uitgevoerde behandelingen tonen zeer hoge percentages geslaagde infecties (van 92 tot 100%). De enige behandeling die een relevant effect op inoculaties had was de behandeling met Switch (0,6%).

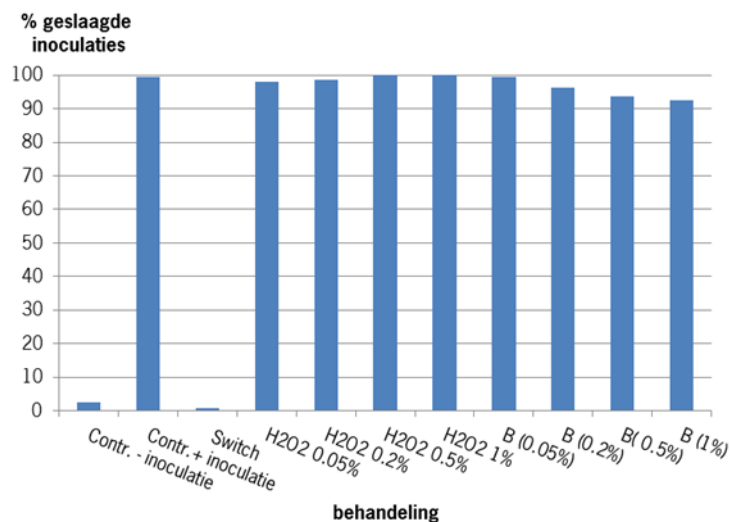


Fig.1. Percentage aangeslagen inoculaties met *Penicillium expansum* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B ,controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 12.

De gemiddelde diameter van de infecties (fig.2.), een week na inoculatie, vertoont een vergelijkbaar beeld met het percentage aantasting. Wel lijkt de ontwikkeling bij gebruik van middel B wat vertraagd te worden.

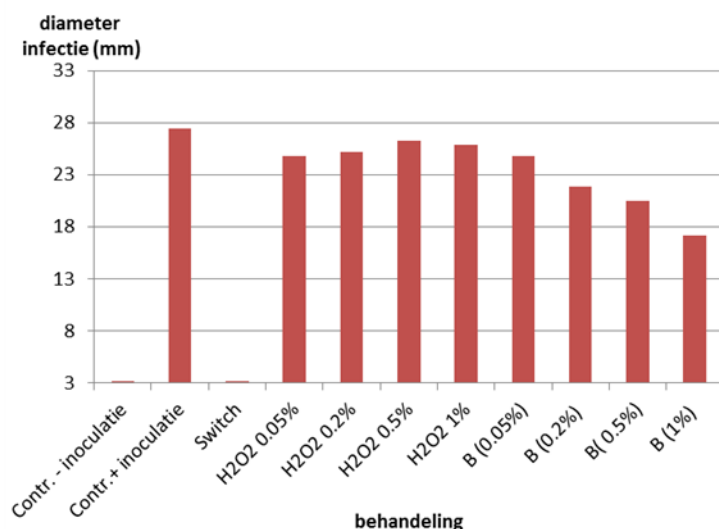


Fig.2. Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Penicillium expansum* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde =3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

4.2.1.2 Conclusie exp. 1a Elstar geïnoculeerd met *Penicillium expansum*

De gebruikte middelen en concentraties hadden bij een behandelduur van 1 minuut onvoldoende effect tegen de ontwikkeling van de in Elstar geïnoculeerde sporen van *Penicillium expansum*.

4.2.1.3 Resultaten exp. 1b Conference geïnoculeerd met *Penicillium expansum*

Tabel 13 geeft de uitgevoerde behandelingen weer.

Tabel 13 uitgevoerde behandelingen binnen experiment 1b

Behandeling	beschadiging	inoculatie	Middel en concentratie	Dompeltijd
Contr. -inoculatie	+	-	0% (water)	1 min.
Contr. +inoculatie	+	+	0% (water)	1 min.
Switch	+	+	Switch ¹	1 min.
H ₂ O ₂ (0.05%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.05%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.2%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.2%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.5%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.5%)	1 min.
H ₂ O ₂ (1%)	+	+	H ₂ O ₂ (1%)	1 min.
B (0,05%)	+	+	B (0.05% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0,2%)	+	+	B (0.2% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0.5%)	+	+	B (0.5 % H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (1%)	+	+	B (1% H ₂ O ₂) ²	1 min.

¹ 8 gr per 10 l

² dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1 voor exacte dosering.

Vergelijkbaar met de resultaten van de inoculaties op Elstar waren de resultaten van de behandelingen op met *Penicillium expansum* behandelde peren (fig.3). In de niet geïnoculeerde behandeling en de geïnoculeerde peren die met Switch werden behandeld ontwikkelde zich geen infecties (0%). In de na inoculatie niet met een middel behandelde peren was het percentage geslaagde inoculaties bijna 99%. Bij de verschillende andere behandelingen varieerde dit van bijna 91% tot 100%.

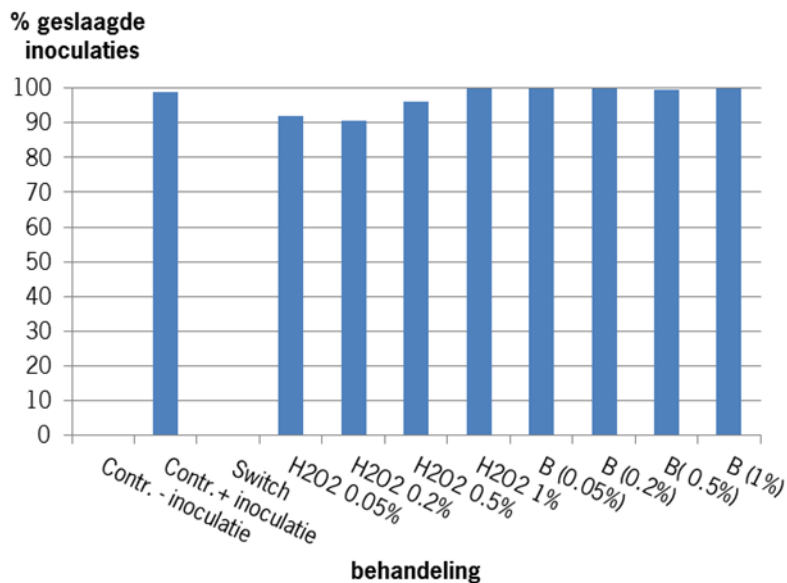


Fig.3 Percentage aangeslagen inoculaties met *Penicillium expansum* op Conference vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 13.

Uit de ontwikkeling van de infecties (diameter van de vlek) kwam min of meer hetzelfde beeld naar voren. Op de niet geïnoculeerde peren en de peren die na inoculatie met Switch werden behandeld was slechts de prikmond (ca. 3 mm) de diameter van de vlek. In de na inoculatie niet behandelde peren en de peren behandeld met de verschillende concentraties waterstofperoxide en middel B leidden de inoculaties tot vlekken met een diameter van 25 tot 29 mm (fig.4.)

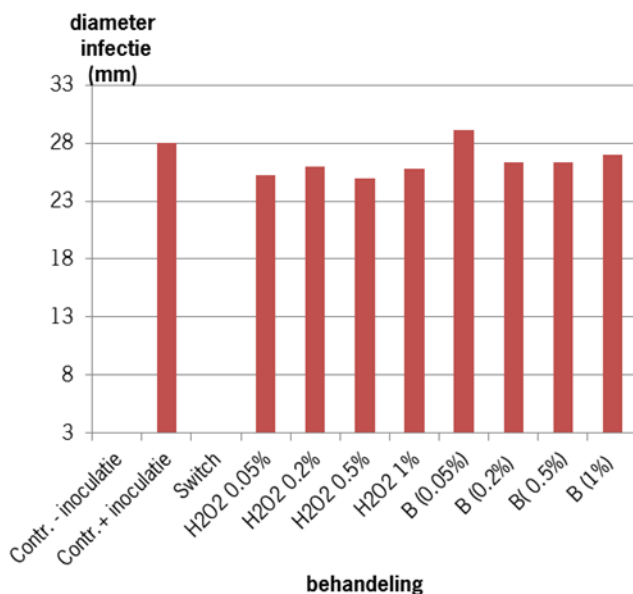


Fig.4. Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Penicillium expansum* op Conference vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde = 3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

4.2.1.4 Conclusie exp. 1b Conference geïnoculeerd met *Penicillium expansum*

De gebruikte middelen en concentraties hadden bij een behandelduur van 1 minuut onvoldoende effect tegen de ontwikkeling van de in Conference geïnoculeerde sporen van *Penicillium expansum*.

4.2.2 Startexperimenten met *Botrytis cinerea* op Elstar en Conference

4.2.2.1 Bespreking resultaten exp.2a Elstar geïnoculeerd met *Botrytis cinerea*

Tabel 14 geeft de uitgevoerde behandelingen weer.

Tabel 14 behandelingen in experiment 2a

Behandeling	beschadiging	inoculatie	Middel en concentratie	Dompeltijd
Contr. -inoculatie	+	-	0% (water)	1 min.
Contr.+inoculatie	+	+	0% (water)	1 min.
Switch	+	+	Switch ¹	1 min.
H ₂ O ₂ (0.05%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.05%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.2%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.2%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.5%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.5%)	1 min.
H ₂ O ₂ (1%)	+	+	H ₂ O ₂ (1%)	1 min.
B (0,05%)	+	+	B (0.05% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0,2%)	+	+	B (0.2% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0.5%)	+	+	B (0.5 % H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (1%)	+	+	B (1% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (1%), 5 min.	+	+	B (1% H ₂ O ₂) ²	5 min.

¹ 8 gr per 10 l

² dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1 voor exacte dosering.

Op de vruchten in het monsters van Elstar die niet met *Botrytis cinerea* sporen werden geïnoculeerd en in de Elstar uit het monster dat na inoculatie met Switch werd behandeld ontwikkelden zich geen of nauwelijks infecties (fig.5). In de andere behandelingen sloegen inoculaties in hoge percentages aan. Op basis van fig.5 varieert dat percentage tussen 60 en 100%. Wat daarbij opviel was het feit dat een langere behandeling met middel B, 5 minuten i.p.v. 1 minuut, vreemd genoeg leidde tot een hoger percentage gescoorde, aangeslagen, infecties. Overigens was ook bij de behandeling met middel B waarbij 1 minuut werd gedompeld het gescoorde percentage hoger dan in de behandelingen met lagere concentraties. (fig.5)

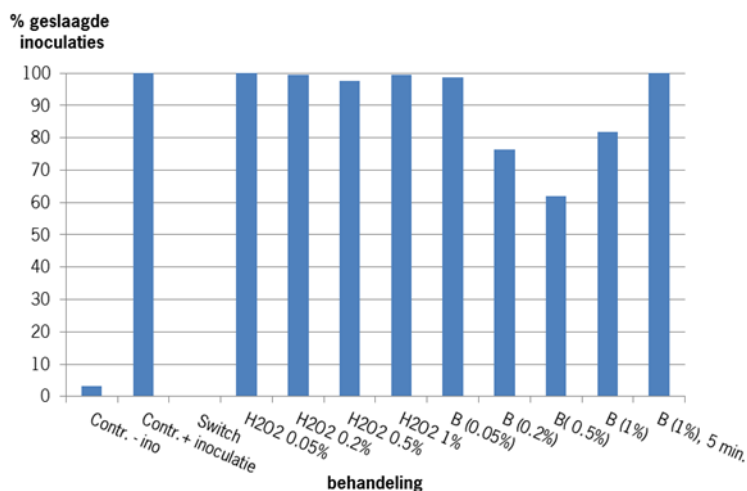


Fig.5: Percentage aangeslagen inoculaties met *Botrytis cinerea* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B, controles¹ en behandeling met Switch¹, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 14.

Uit de gegevens over de gemeten gemiddelde diameter van de vlek door de infectie, ontstond de indruk dat de gemiddelde diameter vlek op de appels die 5 minuten behandeld waren kleiner was. (fig.6)

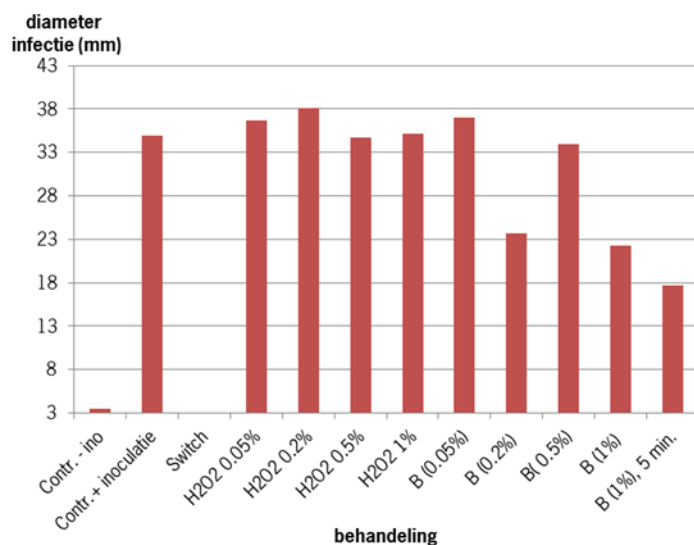


Fig.6: Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Botrytis cinerea* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde = 3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 14.

Bij visuele waarnemingen in tweede instantie ontstond het beeld dat sommige, bruinverkleuringen van relatief kleine vlekken er anders uitzagen dan de andere, veelal grotere vlekken.

Deze constatering heeft geleid tot het vermoeden dat bij het scoren van aangeslagen inoculaties en het opmeten van de diameter, vlekken t.g.v. schade door inwerking van waterstofperoxide zijn gescoord als een geslaagde inoculatie. Dit zou verklaren waarom het percentage aantasting van de behandeling met middel B gedurende 5 minuten hoger was dan die van de behandeling met dezelfde concentratie gedurende 1 minuut.

Dit vermoeden was reden om dezelfde, reeds beoordeelde appels na nog een week uitstallen bij 18°C nogmaals te bekijken. Uit een visuele waarneming bleek dat op veel plaatsen de reeds aanwezige bruinverkleuring zich niet of nauwelijks ontwikkelde gedurende die week. Deze waarneming ondersteunde de veronderstelling dat hier sprake was van schade door inwerking van waterstofperoxide i.p.v. de ontwikkeling van rot bij een aangeslagen inoculatie.

4.2.2.2 Resultaat experiment 2b Conference geïnoculeerd met *Botrytis Cinerea*

Tabel 15 geeft de uitgevoerde behandelingen weer.

Tabel 15: Behandelingen in experiment 2b

Behandeling	beschadiging	inoculatie	Middel en concentratie	Dompeltijd
Contr. -inoculatie	+	-	0% (water)	1 min.
Contr. +inoculatie	+	+	0% (water)	1 min.
Switch	+	+	Switch ¹	1 min.
H ₂ O ₂ (0.05%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.05%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.2%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.2%)	1 min.
H ₂ O ₂ (0.5%)	+	+	H ₂ O ₂ (0.5%)	1 min.
H ₂ O ₂ (1%)	+	+	H ₂ O ₂ (1%)	1 min.
B (0,05%)	+	+	B (0.05% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0,2%)	+	+	B (0.2% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (0.5%)	+	+	B (0.5 % H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (1%)	+	+	B (1% H ₂ O ₂) ²	1 min.
B (2%)	+	+	B (2% H ₂ O ₂) ²	2 min.

¹ 8 gr per 10 l

² dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1 voor exacte dosering.

Op de vruchten uit de monsters Conference die niet met *Botrytis cinerea* sporen werden geïnoculeerd en in de Conference uit de monsters die na inoculatie met Switch werden behandeld ontwikkelden zich geen of nauwelijks infecties (fig.7). In de andere behandelingen sloegen inoculaties in grote percentages aan. Op basis van figuur 7 varieert dat percentage tussen 90 en 100%. Wat daarbij opviel was dat een hogere concentratie middel B, toegepast gedurende 2 minuten i.p.v. 1 minuut een iets betere werking liet zien dan de behandeling met een concentratie die de helft was en waarbij de behandelduur werd teruggebracht van 2 naar 1 minuut, 90% aantasting i.p.v. bijna 99%.

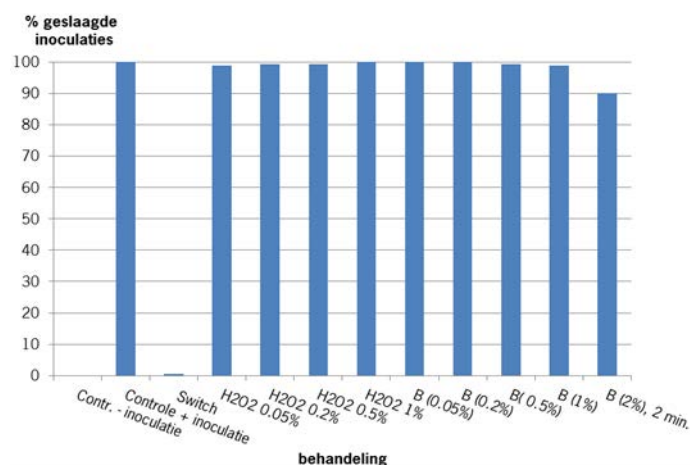


Fig.7: Percentage aangeslagen inoculaties met *Botrytis cinerea* op Conference vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H₂O₂) of middel B, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 15.

De iets kleinere gemiddelde diameter van vlekken op vruchten Conference behandeld met middel B (2xconcentratie en 2 i.p.v. 1 minuut behandelduur) is een gevolg van het lagere % aangeslagen inoculaties. De kleine diameter van de inoculatiewond is als vlek grootte in het gemiddelde meegenomen.

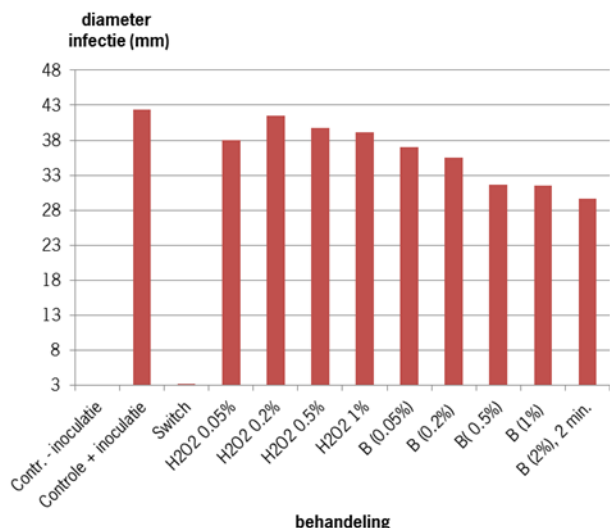


Fig.8: Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Botrytis cinerea* op Conference vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met waterstofperoxide (H_2O_2) of middel B, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde = 3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 15.

4.2.2.3 Conclusie 2b Conference geïnoculeerd met *Botrytis Cinerea*

Zowel op basis van diameter van de vlekken als op basis van percentage aantasting bleek het effect van de gebruikte concentraties waterstofperoxide of middel B en gehanteerde behandelduren onvoldoende om deze toepassingen als een relevante verbetering te kunnen beschouwen. Wel werd hier een aanwijzing gevonden voor de veronderstelling dat hogere concentraties en langere behandelduren tot sterkere effecten kunnen leiden.

4.2.3 Elstar inoculatie *Botrytis cinerea*: fytotoxische effecten (exp. 3a en 3b)

De resultaten uit de experimenten 1a tot en met 2b wijzen op:

- Gehanteerde concentraties / behandelduren lijken onvoldoende om infecties op basis van sporen te vermijden.
- Middel B lijkt het middel dat, hoewel tot nu toe beperkt, enig effect kan hebben.
- Bij iets langere behandelduren en concentraties ontstond de indruk dat op Elstar (oxidatie)schade optrad.

Het toepassen van hogere concentraties en/of behandelduren leidt waarschijnlijk tot meer schade.

Een vraag die rees was: Kan schade door de toegepaste middelen voorkomen worden door na behandeling de vruchten te spoelen in water en/of de vruchten na behandeling te drogen? In deze experimenten werd nagegaan of:

- Hogere concentraties en/of langere behandelduren een relevant effect op het aanslaan van inoculaties op Elstar heeft (schimmel)
- Hogere concentraties en/of langere behandelduren zoals vermoed tot duidelijke schade (bruine ringen) leiden.
- Het mogelijk is om schade bij hogere concentraties en langere behandelduren te vermijden voor appels na behandeling te spoelen en/of te drogen.

4.2.3.1 Uitvoering en bespreking resultaten exp. 3a. Elstar *Botrytis cinerea*

Tabel 16 vermeldt de uitgevoerde behandelingen.

Tabel 16: Behandelingen in experiment 3a

Behandelingen	Concentratie (%H ₂ O ₂) ¹	Behandel-duur (min)	spoelen	Inoculatie
Contr. -inoculatie	0% (water)	1	Nee	Nee
Contr. +inoculatie	0% (water)	1	Nee	Ja
B 1%	1%	5	Nee	Ja
B 1% spoelen	1 %	5	Ja	Ja
B 2%	2%	1	Nee	Ja
B 5%	5%	8	Nee	Ja
B 5% spoelen	5%	8	Ja	Ja

¹ dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1 voor exacte dosering.

Bij de beoordeling zijn alleen de werkelijke infecties beoordeeld. Wondjes met schade door inwerken van waterstofperoxide zijn niet als aangeslagen inoculatie gescoord.

Hoge concentraties van middel B 5% (peroxiden) waren in staat het aanslaan van inoculatie met *Botrytis cinerea* geheel of vrijwel geheel te voorkomen (fig.9). Ook de behandeling waar na dompelen in middel B werd gespoeld met schoon water bleek duidelijk effect te hebben tegen de ontwikkeling van infecties.

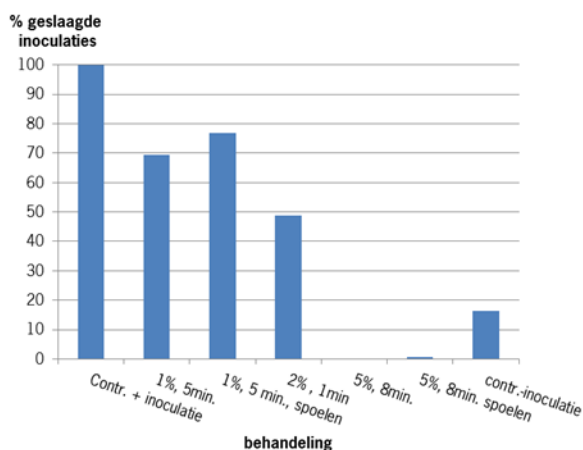


Fig.9: Percentage aangeslagen inoculaties met *Botrytis cinerea* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met middel B en controles¹, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 16.

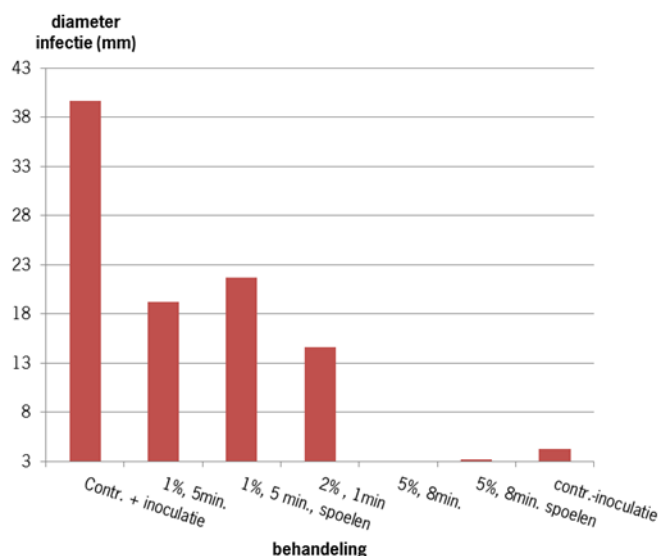


Fig. 10 Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Botrytis cinerea* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met middel B en controles¹, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde = 3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 16.

Fig.10 geeft hetzelfde beeld, maar dan op basis van de gemeten diameter van de infectie. Bij lagere concentraties en kortere behandelduur (2%, gedurende 1 minuut en 1% gedurende 5 minuten) bleek het effect tegen het inoculum onvoldoende te zijn (fig.9 en fig.10).

4.2.3.2 Uitvoering en bespreking resultaten exp. 3b fytotoxische effecten H₂O₂

In dit experiment zijn vruchten vooraf wel aangeprikt (4 plaatsen per vrucht) maar niet geïnoculeerd met sporen van een schimmel. Tabel 17 vermeldt de (in duplo) uitgevoerde behandelingen

Tabel 17: behandelingen van wel aangeprikte, maar niet geïnoculeerde Elstar (experiment 3b)

Behandeling	Concentratie (%H ₂ O ₂) ¹	behandelduur	spoelen	drogen
B 1%, 1min	1	1 min.	nee	nee
B 2%, 1min	2	1 min.	nee	nee
B 5%, 1min	5	1 min.	nee	nee
B 1%, 5 min	1	5 min.	nee	nee
B 2%, 5 min	2	5 min.	nee	nee
B 5%, 5 min	5	5 min.	nee	nee
B 1%, 8 min	1	8 min.	nee	nee
B 2%, 8min	2	8 min.	nee	nee
B 5%, 8min	5	8 min.	nee	nee
B 1%, 8min, sp.	1	8 min.	ja	nee
B 2%, 8min, sp.	2	8 min.	ja	nee
B 5%, 8min, sp.	5	8 min.	ja	nee
B water	0 (leidingwater)	1 min.	nee	Nee
B 5%, 8min, dr.	5	8 min.	nee	ja

¹ dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1 voor exacte dosering.

In dit experiment is de schade vastgesteld die behandelingen met het waterstofperoxide bevattende middel B veroorzaakten. Schade ten gevolge van de behandeling met middel B werd per vrucht vastgesteld door te beoordelen op:

- 1- Schade direct rond de wond ontstaan door het aanprikken
- 2- Schade aan de kroonzijde (neus) van de vrucht omdat na het dompelen in de ruimte tussen de bodem van het pakblad en de holte van de kroonzijde dompeloplossing aanwezig was

Bij de beoordeling en bij de weergave van resultaten is als volgt gehandeld :

Ad 1 Rond de geprikte gaten:

-de incidentele plaatsen op vruchten waar zich een infectie ontwikkelde zijn apart gescoord en werden voor het vaststellen van schade buiten beschouwing gelaten.
 -aanwezige schade direct rond de plaatsen waar de vrucht is aangeprikt werd vastgesteld door de diameter van de bruinverkleuring inclusief de die van het geprikte gat te meten in millimeter. Per gat zijn 2 metingen (horizontaal en verticaal) uitgevoerd en is het gemiddelde berekend. Vervolgens is 3 mm (doorsnee van het geprikte gat) van de waarde afgetrokken.

Ad 2 Schade aan de kroonzijde

Per vrucht is gescoord of er schade aan de kroonzijde aanwezig was en de mate van schade werd gescoord conform de schaal vermeld in tabel 18

Tabel 18: Beoordeling van schade aan vruchtneus (wegleggen vruchten)

Score	Geschatte oppervlak schade (%) in holte kroonzijde
0	0
1	0-10
2	11-40
3	41-70
4	71-100

Tijdens de beoordeling van de schade rond de aangebrachte gaatjes en aan de kelkzijde van de vrucht viel op dat er ook schade aan lenticellen ontstond. Middels foto's en een beschrijving van wat werd gezien vond beoordeling van deze schade plaats.

Met uitzondering van de controlebehandeling (water) kwam bij alle combinaties van behandelduur en concentraties B schade voor aan het weefsel direct rond de aangeprikte plaatsten (fig.11).

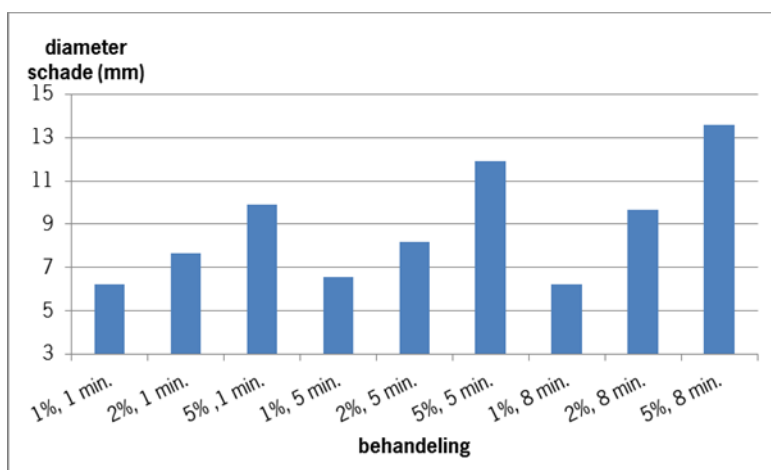


Fig.11 Gemiddelde diameter (in mm) van fytoxische schade op verwonde, maar niet met sporensuspensie geïnoculeerde Elstar vruchten, per behandeling (concentratie en behandelduur) met middel B¹, controles¹ en behandeling met Switch¹, ca. een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde = 3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor beschrijving van behandelingen zie tabel 17

De as van fig.11 toont de diameter van de gemeten schade vanaf 3 mm omdat de diameter van het geprikte gat ca. 3 mm was. Bij hogere concentraties was de doorsnede van de schade rond de wond groter. Bij de concentraties 2 en 5% leek een tendens aanwezig die duidde op meer schade bij een langere behandelduur. Bij de laagste concentratie middel B was deze tendens niet zichtbaar.



Fig. 12 Fytotoxische schade in de kelkholte (Elstar)

Uit de waargenomen schade in de kelkholte (fig. 12) van de vruchten bleek dat deze schade bij alle combinaties van concentratie en behandelduur van middel B aanwezig was (fig. 13). Een hogere concentratie leidde ook hier tot meer schade. Een langere behandelduur leidde niet of nauwelijks tot meer schade. Dit was als volgt te verklaren: Na dompelen was vloeistof aanwezig in de kelkholte, zowel na kort als na lang dompelen. Doordat de vruchten op de zijde van de kelkholte in het pakblad zijn teruggelegd was de blootstelling aan vloeistof of damp in de kelkholte ongeacht de feitelijke duur van de behandeling vrijwel even lang.

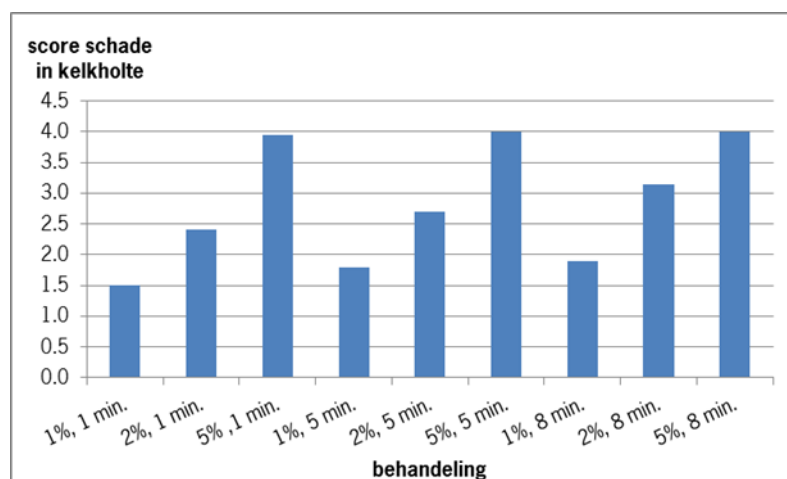


Fig.13: Gemiddelde score (schaal 0-4) van fytotoxische schade in de kelkholte van Elstar vruchten, per behandeling (concentratie en behandelduur) met middel B¹ ca. een week (18°C) na behandelen.

¹ voor beschrijving van behandelingen zie tabel 17.

Het spoelen van de vruchten in schoonwater na de behandelingen met middel B leidde wel tot een vermindering van de schade maar kon de schade rond de geprikte gaatjes niet volledig voorkomen (fig.14). Het drogen van de vruchten na de dompelbehandeling in de oplossing met ca. 2% waterstofperoxide gedurende 8 minuten kon eveneens niet volledig voorkomen dat er schade ontstond rond de aangebrachte gaatjes (fig.14).

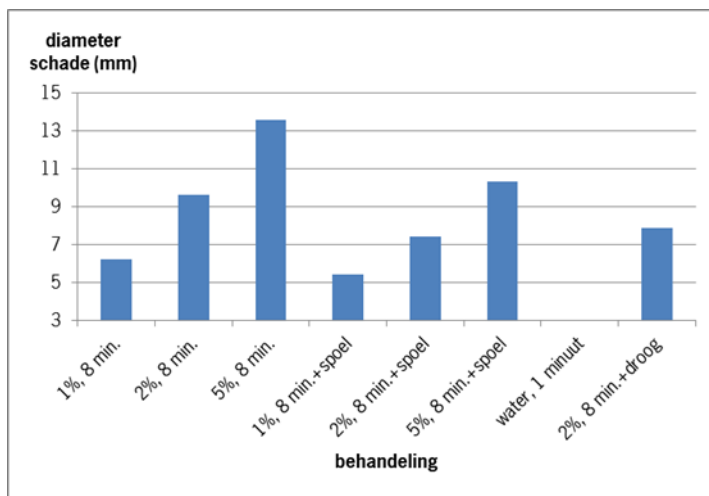


Fig. 14 Effect van spoelen en drogen op het ontstaan van fytotoxische schade rond kunstmatige wonden (niet geïnoculeerd met sporen) op Elstar vruchten, na behandeling met middel B¹. Schade is weergegeven als diameter (mm) van de schade rond de verwonding. Laagste waarde =3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor beschrijving van behandelingen zie tabel 17.

Spoelen met water of drogen na behandeling reduceerde de schade in de kelkholte van de vruchten wel maar voorkwam deze niet volledig (fig.15)

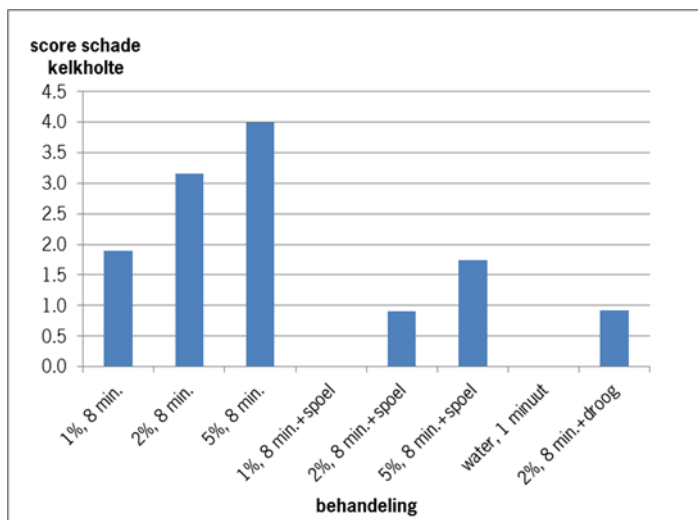


Fig. 15 Effect van spoelen en drogen op het ontstaan van fytotoxische schade in de kelkholte van Elstar vruchten, na behandeling met middel B¹. Schade is weergegeven als gemiddelde score (schaal 0-4).

¹ voor beschrijving van behandelingen zie tabel 17.



Fig.16 Lichte en zware fytoxische schade aan lenticellen plus aantasting geprikte gaten (Elstar)

Naast schade rond de geprikte gaatjes en in de kelkholte bleek ook dat schade ontstond rond lenticellen (fig. 16). Deze schade is niet kwantitatief bepaald, maar was duidelijk zichtbaar. Op vruchten die in hogere concentraties middel B werden gedompeld was de schade duidelijker dan bij lagere concentraties (fig.17).

Bij een concentratie van 2% gedurende 5 minuten was een week na behandeling visueel lichte tot matige schade rond de lenticellen aanwezig. Op vruchten die gedurende 8 minuten in een oplossing met dezelfde concentratie werden gedompeld was de schade duidelijker zichtbaar (meer aangetaste lenticellen en een zwaardere aantasting, soms ingezonken). Wanneer de vruchten na dompelen gedurende 8 minuten werden gespoeld in schoon water, was de schade aan de lenticellen minder, maar niet afwezig (fig.18). Ook door drogen was de schade niet te voorkomen.

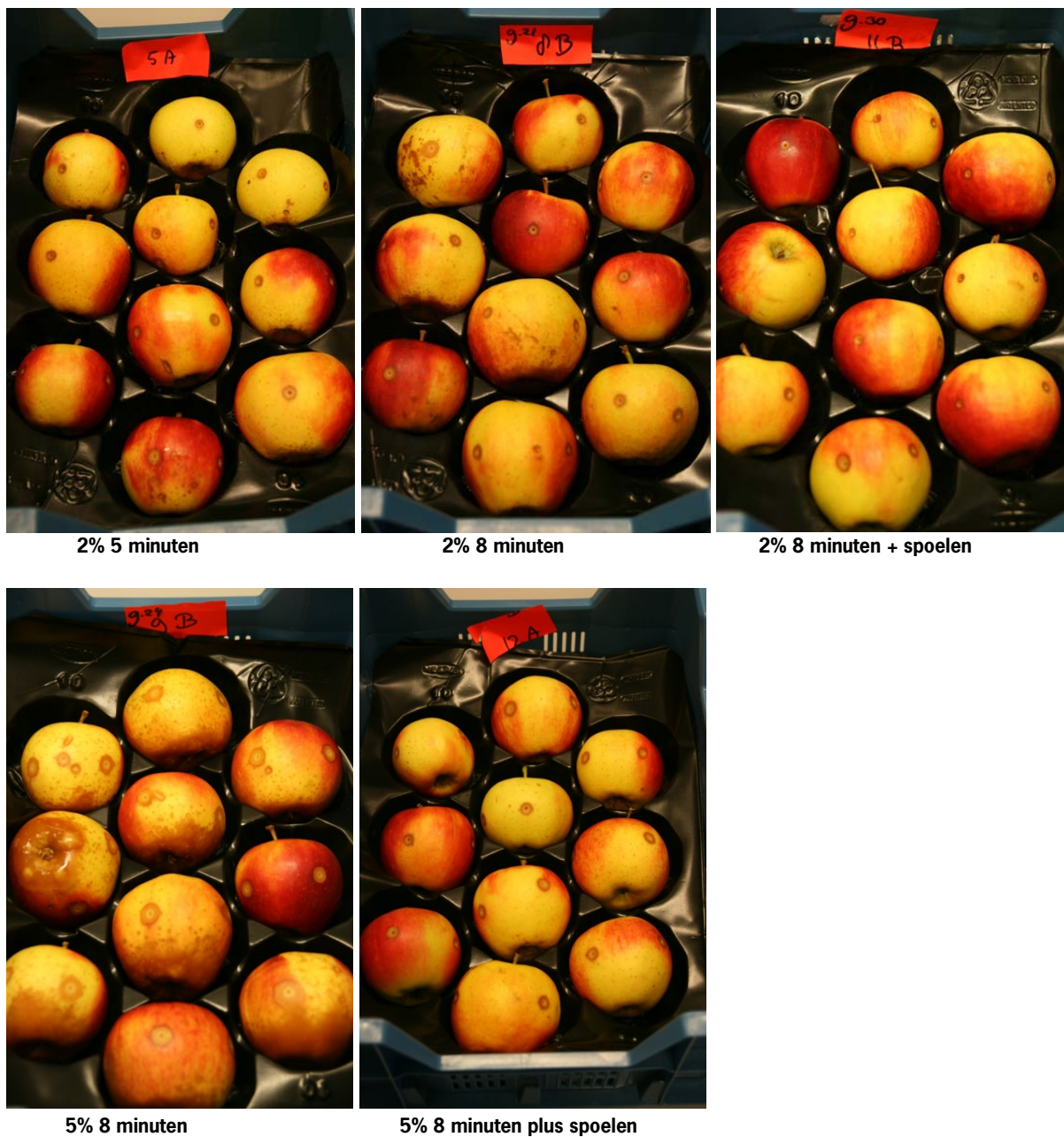


Fig. 17: Overzicht van fytoxische schade (lenticellen, rond wonden en in kelkholte) schade aan Elstar na verschillende behandelingen op monsters van niet geïnoculeerde vruchten.

4.2.4 Exp. 4 Conference inoculatie *Penicillium* en fytoxische effecten H_2O_2

De resultaten uit de eerder uitgevoerde experimenten op Elstar lieten zien dat :

- Gehanteerde concentraties / behandelduren lijken onvoldoende om infecties op basis van sporen te vermijden.
- Bij langere behandelduren en hogere concentraties ontstond schade aan vruchten (in kelkholte, aan lenticellen en op plaatsen waar de vruchten werden aangeprikt).

In dit experiment werd nagegaan of bij Conference geïnoculeerd met sporen van *Penicillium expansum* het gebruik van middel B tot vergelijkbare resultaten leidde als bij Elstar geïnoculeerd met sporen van *Botrytis cinerea*.

Evenals bij Elstar rees de vraag of schade van het toegepaste middel (H₂O₂) wellicht voorkomen kan worden door na behandeling de vruchten te spoelen in water en vervolgens af te drogen.

4.2.4.1 Werkwijze exp. 4 Conference inoculatie en fytotoxische effecten H₂O₂

Binnen dit experiment zijn twee reeksen in gezet. Een grote reeks waarbij vruchten werden geïnoculeerd met *Penicillium expansum* en een kleine reeks waarbij vruchten wel werden aangeprikt maar geen inoculatie plaats vond. Met de eerste reeks werd de werking van middel B op de inoculatie met *Penicillium expansum* sporen nagegaan. De reeks op niet geïnoculeerde Conference werd ingezet om beeld van fytotoxische schade door het gebruik van middel B te krijgen en het effect van spoelen en drogen na een behandeling met middel B. De reeks waaraan de schade ten gevolge van middel B werd waargenomen is in tweevoud uitgevoerd. De reeks waarbij vruchten werden geïnoculeerd met *Penicillium expansum* sporen is in viervoud ingezet. De op de vruchten uitgevoerde behandelingen zijn opgenomen in tabel..

Tabel 19: Experiment 4 met Conference, geïnoculeerd met *Penicillium expansum* en behandeld met middel B en niet geïnoculeerd.

Behandeling	Middel en Concentratie H ₂ O ₂ (%)	Behandel duur	Beschadiging	inoculatie	Spoelen& drogen
Contr. -inoculatie	0 (water)	1 min.	+	-	-
Contr. +inoculatie	0 (water)	1 min.	+	+	-
Switch	Switch ¹	1 min.	+	+	-
B 1%, 1 min.	B 1% ²	1 min.	+	+	-
B 3%, 5 min.	B 3% ²	5 min.	+	+	-
B 5%, 8 min.	B 5% ²	8 min.	+	+	-
B 1%, 1 min., S&D	B 1% ²	1 min.	+	+	+
B 3%, 5 min., S&D	B 3% ²	5 min.	+	+	+
B 5%, 8 min., S&D	B 5% ²	8 min.	+	+	+
B 5%, 5 min., S&D	B 5% ²	5 min.	+	-	+
B 5%, 5 min.	B 5% ²	5 min.	+	-	-

¹ 8 gr per 10 l

² dosering van middel B is zo gekozen dat het vermelde % H₂O₂ wordt benaderd, zie bijlage 1. voor exacte dosering.

4.2.4.2 Bespreking resultaten exp.4 inoculatie en fytotoxische effecten H₂O₂

Bij de verschillende combinaties van behandeluren en concentraties middel B was de werking tegen de ontwikkeling van infecties onvoldoende. De behandelingen zaten op hetzelfde hoge niveau als de vruchten die na inoculaties niet met middel B werden behandeld. Kortom er was geen sprake van een werking van middel B tegen *Penicillium expansum* op aangeprikte Conference peren.

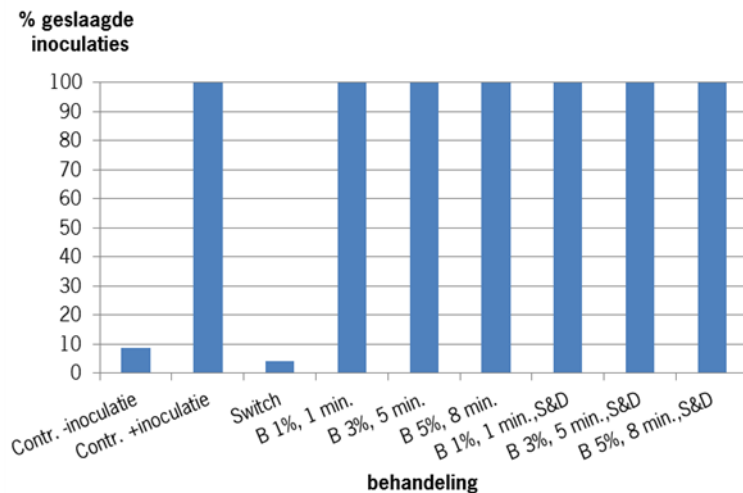


Fig.18 Percentage aangeslagen inoculaties met *Penicillium expansum* op Conference vruchten, per behandeling (concentratie en behandeluur) met middel B¹, controles¹ en behandeling¹ met Switch, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 19.

Resultaten uit fig. 19 tonen de diameter van de doorontwikkelde inoculaties van *Penicillium expansum* op peer (rode balken). Hieruit bleek dat in de controle waarbij de peren wel waren beschadigd maar niet geïnoculeerd de gemiddelde vlek diameter klein was (4 mm). Alleen op de peren die na inoculatie met Switch werden behandeld bleef de gemiddelde diameter vergelijkbaar klein.

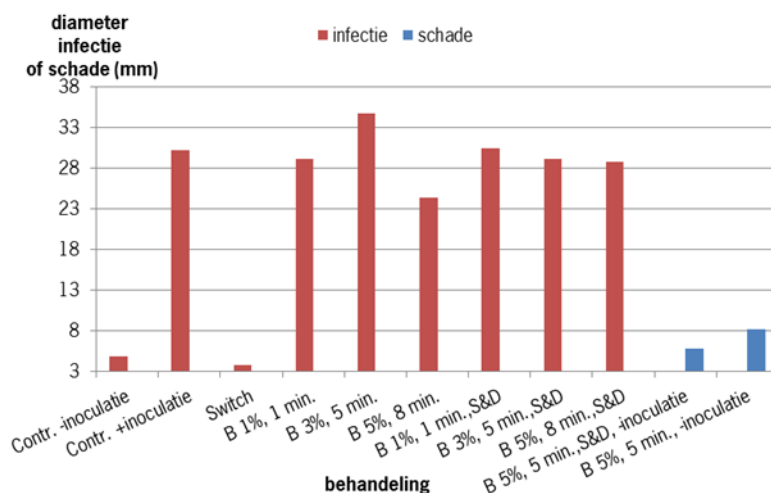


Fig.19 Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Penicillium expansum* op Conference vruchten en fytotoxische schade, per behandeling (concentratie en behandeluur) met middel B¹, controles¹ en behandeling met Switch¹, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde = 3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 19.

De blauwe balken in fig.19 geven de fytotoxische schade weer die het dompelen in oplossingen met middel B veroorzaakte. Ook hier is de diameter van de schade vastgesteld. In vergelijking met de diameter van schade of beter de diameter van het geprikte gat op vruchten uit de negatieve controle (niet met middel B behandeld en niet geïnoculeerd) waren de gemiddelde diameters van de schade groter. Dit duidde erop dat door de oxiderende werking van o.a. waterstofperoxide er schade ontstond. Deze schade was als een bruine ring rond het geprikte gat zichtbaar. (fig. 20). Spoelen met water na behandeling met middel B leek tot kleinere diameter van de schade te leiden maar voorkwam de schade niet.

Daarnaast werd aan peren, die na 5 minuten dompelen in een oplossing met middel B niet werden afgespoeld visueel meer schade waargenomen. Naast de grotere ring rond het geprikte gat trad er ook duidelijk meer schade rond lenticellen op (fig.20).



Fig.20: Conference (niet geïnoculeerd) een week na dompelen gedurende 5 minuten in een oplossing met middel B (ca. 5% H_2O_2). Links: na behandeling met middel B gespoeld en gedroogd. Rechts: niet gespoeld en gedroogd.

De geteste concentraties middel B zijn in combinatie met de gehanteerde behandelduren onvoldoende in staat om de ontwikkeling van sporen van *Penicillium expansum* tegen te gaan. Door het optreden van schade aan peren biedt het werken met nog hogere concentraties en/of langer behandelduren geen perspectief, daar dan teveel schade (lenticellen) dreigt te ontstaan.

4.2.5 Exp.5 Elstar inoculatie met *Botrytis cinerea* , behandeld met middel C

Uit experimenten waarbij de oxiderende werking van waterstofperoxide evt. in combinatie met perazijnzuur de aangebrachte schimmelsporen sporen diende te doden of remmen bleek de werking te gering te zijn bij concentraties/ behandelduren die geen schade (fytotoxiciteit) aan de vruchten veroorzaakte.

De oorspronkelijke gedachtelij was: Voer op recent geoogst fruit een behandeling uit die schimmels, aanwezig op het oppervlak van de vrucht, doodt en breng in de bewaarfase gedurende langere periode een ozon concentratie aan waarmee ontwikkeling van schimmels wordt tegengegaan.

De gelegenheid deed zich voor een middel, met een werking tegen meeldauw in verschillende teelten in de glastuinbouw, te testen op de geschiktheid voor het voorkomen van infecties met bewaarrotschimmel op appels via een verwond schiloppervlak. Vanuit de gedachte dat dat wellicht een alternatief kon zijn voor een toepassing van waterstofperoxide is dit middel getest.

4.2.5.1 Werkwijze exp. 5 Elstar inoculatie en behandeld met middel C

Binnen dit experiment is een reeks met behandelduren en concentraties in gezet. Met uitzondering van de vruchten (Elstar) in de controle werden aangeprikte vruchten geïnoculeerd met *Botrytis cinerea*. Vervolgens werden monsters vruchten behandeld als weergegeven in tabel 20.

Tabel 20: Behandelingen binnen experiment 5 op Elstar, geïnoculeerd met sporen van *Botrytis cinerea*.

Behandeling	Middel en concentratie	Behandel -duur	Inoculatie	Spoelen& drogen
Contr. +inoculatie	Water	1 min	Nee	Nee
Contr. -inoculatie	Water	1 min	Ja	Nee
Switch	Switch ¹	1 min	Ja	Nee
1n mid.C, 1 min.	Middel C 1n ²	1 min	Ja	Nee
1n mid.C, 5 min.	Middel C 1n ²	5 min	Ja	Nee
1n mid.C, 8 min.	Middel C 1n ²	8 min	Ja	Nee
2n mid.C, 1 min.	Middel C 2n ²	1 min	Ja	Nee
2n mid.C, 5 min.	Middel C 2n ²	5 min	Ja	Nee
2n mid.C, 8 min.	Middel C 2n ²	8 min	Ja	Nee
4n mid.C, 1 min.	Middel C 4n ²	1 min	Ja	Nee
4n mid.C, 5 min.	Middel C 4n ²	5 min	Ja	Nee
4n mid.C, 8 min.	Middel C 4n ²	8 min	Ja	Nee

¹ 8 gr per 10 l

² n: 10 ml deel 1 + 10 ml deel 2 op totaal volume van 10 liter. Middel C, vloeibare versie (alleen voor testen) bestaat uit 2 componenten. Zie ook bijlage 3.

4.2.5.2 Bespreking resultaten exp.5 Elstar inoculatie en behandeld met middel C

De resultaten uit het experiment waarin met *Botrytis cinerea* sporen geïnoculeerde vruchten werden behandeld met verschillende concentraties middel C (fig.21 en 22), blijkt dat er minder infecties en gemiddeld minder grote infecties uit inoculaties ontwikkelden wanneer de appels werden behandeld met Middel C. Echter het aantal infecties en de diameter van de geïnfecteerde inoculaties was nog beduidend groter dan in de niet geïnoculeerde controle en de behandeling met Switch. Zelfs viermaal de tegen meeldauw in de glastuinbouw geadviseerde dosering leidde niet tot een resultaat wat in de buurt van een gewenste werking komt.

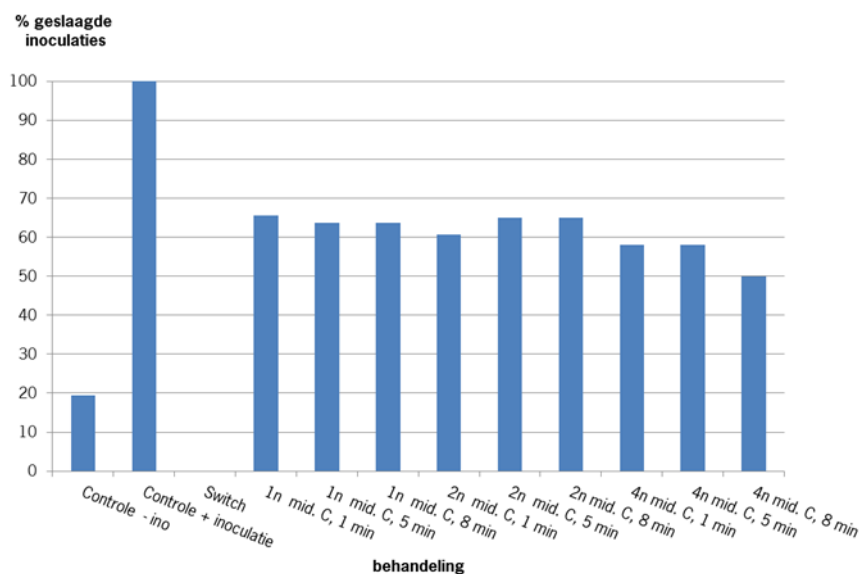


Fig.21: Percentage aangeslagen inoculaties met *Botrytis cinerea* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met middel C (n=standaard concentratie), controles¹ en behandeling met Switch¹, een week (18°C) na inoculeren en behandelen.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 20.

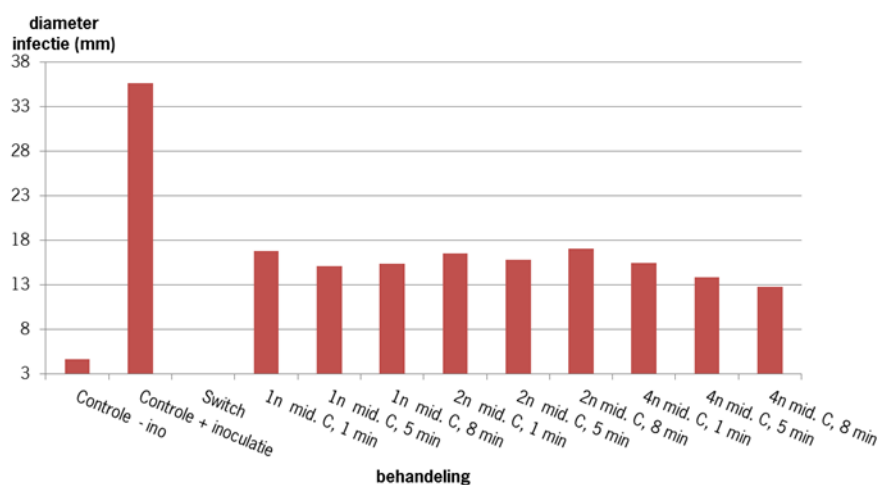


Fig.22: Gemiddelde diameter (in mm) van inoculaties met *Botrytis cinerea* op Elstar vruchten, per behandeling¹ (concentratie en behandelduur) met middel C (n=standaard concentratie), controles¹ en behandeling met Switch¹, een week (18°C) na inoculeren en behandelen. Laagste waarde =3mm, de diameter van het geprikte gat wordt buiten beschouwing gelaten.

¹ voor behandelingen en controles zie tabel 20.

5 Conclusies en advies m.b.t. GO /NO GO

5.1 Gebruik van waterstofperoxide voor ontsmetting van oppervlak van vruchten

Oppervlakte ontsmetting met behulp van waterstofperoxide of middelen die waterstofperoxide (eventueel in combinatie met perazijnzuur) bevatten biedt op basis van de hier gerapporteerde experimenten onvoldoende perspectief. De belangrijkste constatering is:

- Voor een werking op beschadigde en geïnoculeerde vruchten zijn de geteste concentraties en behandel uren in sommige gevallen onvoldoende effectief in het afdoen of remmen (bijvoorbeeld *Penicillium expansum* op Conference).
- Bij Elstar geïnoculeerd met *Botrytis cinerea* (sporen) en gedurende 8 minuten behandeld met een oplossing van middel B waarin ca. 5% waterstofperoxide aanwezig was, werd wel een duidelijk dodend/ remmend effect waargenomen, maar bleek de fytotoxiciteit van het middel dusdanig te zijn dat schade niet voorkomen kon worden.
- Fytotoxiciteit trad zowel op bij behandeling van Conference als Elstar.
- In beide situaties verminderde het in water spoelen of drogen van product onvoldoende het fytotoxische effect. Ook een test waarin werd gespoeld en gedroogd voorkwam het optreden van schade niet volledig.
- Schade trad op rond aanwezig wondjes op de schil, rond lenticellen en in de kelkholte van Elstar.
- Op Conference vruchten werd schade rond wondjes en aan lenticellen waargenomen.
- Een mogelijk alternatief middel (gebruikt in de glastuinbouw tegen meeldauw) bleek onvoldoende effect te hebben op Elstar, geïnoculeerd met *Botrytis cinerea*.

5.2 Knelpunten toepassing ozon tegen vruchtrot

Technische beperkingen en het vooruitzicht dat een toelating voor toepassing voor O₃ tegen het optreden van vruchtrot niet makkelijk gerealiseerd kon worden hebben uiteindelijk geleid tot het staken het onderzoek naar de mogelijkheden om O₃ toe te passen tegen vruchtrot.

Het verkrijgen van toelating voor O₃ tegen vruchtrot is nodig omdat de toepassing gezien gaat worden als een gewasbeschermingsmiddel. Dit in tegenstelling tot bestaande toepassingen waarbij deze stoffen worden ingezet om ruimten en werkoppervlakken te ontsmetten.

5.3 Advies m.b.t. GO/NO GO fase 4

De resultaten in de uitgevoerde experimenten in fase 3 en de gerapporteerde knelpunten bij toepassing van ozon zijn aanleiding een No Go te adviseren voor de in het oorspronkelijke in dit projectvoorstel opgenomen 4^e fase.

6 Literatuur

Balkhoven-Baart J.M.T., P.F.M.M. Roelofs en P.F. de Jong, (2009). Bestrijding van vruchtrot en schimmels met ozon en waterstofperoxide. PPO rapport nr. 2009-09, herziene versie juni 2009.

Sharpe D., L. Fan, K. McRae, B. Walker, R MacKay en C.Doucette, (2009). Effects of Ozone Treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in Relation to Horticultural Product Quality. *Journal of Food Science* 74 (6): M250–M257

Bijlage 1

Gebruikte doseringen H_2O_2 , middel B en middel A in experimenten met agarplaten en in dompelexperimenten.

In onderstaand overzicht is per nagestreefde eindconcentratie H_2O_2 (eerste kolom) de verhouding vermeld van de gebruikte hoeveelheden middel en water of agar. Uit controle van de concentraties peroxiden in de dompelexperimenten, zie bijlage 3, bleek dat de concentraties peroxiden bij gebruik van middel A uiteindelijk iets hoger kwamen te liggen. Dit t.g.v. van het aanwezige perazijn.

Gebruikte verhouding (volume %) waterstofperoxide bevattende middel en agar (experimenten op wateragar of PDA) of water (dompel experimenten)

Streef concentratie H_2O_2 (%)	H_2O_2		Middel B		Middel A	
	ml agar of water	ml H_2O_2	ml agar of water	ml middel B	ml agar of water	ml middel A
0.025	999.167	0.833	998.75	1.25	999.286	0.714
0.05	998.333	1.667	997.50	2.50	998.571	1.429
0.1	996.667	3.333	995.00	5.00	997.143	2.857
0.25	991.667	8.333	987.50	12.50	992.857	7.143
0.5	983.333	16.667	975.00	25.00	985.714	14.286
1	966.667	33.333	950.00	50.00	971.429	28.571
2	933.333	66.667	900.00	100.00	942.857	57.143
3	900.000	100.000	850.00	150.00	914.286	85.714

- H_2O_2 oplossing 30%.
- Middel B betreft een biocide dat een oxiderende werking heeft en wordt toegepast voor het reinigen van oppervlakken. Samenstelling: perazijnzuur 55 gram per liter en waterstofperoxide 220 gram per liter.
- Middel A bevatte 35% H_2O_2 en een component om de oplossing stabiel en langer werkzaam te houden.

Bijlage 2

Controle concentratie peroxiden in dompelexperimenten (fase 3).

De concentraties van de aangemaakte oplossingen zijn gecontroleerd door monsters van de oplossingen waarin gedompeld werd te analyseren.

Hieronder zijn de analyse resultaten van monsters uit verschillende experimenten weergegeven.

Bij het eerste experiment zijn monsters op 2 momenten genomen, voor en na het uitvoeren van de dompelbehandelingen. Dit om te controleren of de oxiderende werking van het middel na een dompelbehandeling van vruchten behandeling snel afnam.

Experiment 1a

Middel	Beoogd % H ₂ O ₂	% peroxiden voor dompelen	% peroxiden na dompelen
waterstofperoxide	0.05%	0.05	0.05
waterstofperoxide	0.2%	0.22	0.21
waterstofperoxide	0.5%	0.52	0.49
waterstofperoxide	1%	1.06	1.01
B	0.05%	0.07	0.07
B	0.2%	0.26	0.26
B	0.5%	0.58	0.58
B	1%	1.27	1.27

Experiment Experiment 2b

Middel	Beoogd % H ₂ O ₂	% peroxiden
B	2%	2.71
B	2%	2.84
B	2%	2.82
B	2%	2.79

Experiment Experiment 3a

Middel	Beoogd % H ₂ O ₂	% peroxiden
B	5%	6.62
B	5%	6.45
B	1%	0.96
B	2%	2.20

Bijlage 3

Dosering middel C in experiment 5.

Middel C betrof een experimentele formulering van een middel dat in bedekte teelten van aardbei, komkommer, aubergine, paprika, rozen, rozenonderstammen en rozenstruiken wordt toegepast tegen schimmels, o.a. meeldauw. Het middel heeft een bredere werking dan tegen meeldauw. Het betreft een contactwerking gebaseerd op oxidatie (Oxiderende ionen; geen waterstofperoxide).

De standaarddosering van deze experimentele formulering is 1 ml deel 1 en 1 ml deel 2 per liter.

In het uitgevoerde experiment zijn in bakken van 10 L de volgende 3 doseringen getest:

- Standaard (n): 10 ml deel 1 en 10 ml deel 2 per 10 liter water
- 2n: 20 ml deel 1 en 20 ml deel 2 per 10 liter water
- 4n: 20 ml deel 1 en 40 ml deel 2 per 10 liter water