

Proefstation voor de Bloemisterij
Linnaeuslaan 2a
1431 JV Aalsmeer



Proefverslag 4403-3
Verspreiding van Fusarium-sporen
in een eb/vloedsysteem

Ir. F.C.T. Stelder
Oktober 1991

2200767

VERSPREIDING VAN FUSARIUM- SPOREN IN EEN EB/VLOEDSYSTEEM

Inleiding

In dit verslag is een proef beschreven die in 1990 is uitgevoerd en betrekking heeft op de verspreiding van *Fusarium oxysporum f. sp. cyclaminis* bij Cyclamen (*Cyclamen persicum*) in een eb/vloedsysteem. De proef werd uitgevoerd in het kader van onderzoek naar de verspreiding van schimmelziekten in het eb/vloedsysteem. In deze proef werd onderzocht hoe microconidiën (microsporen) van *Fusarium oxysporum f. sp. cyclaminis* (Foc) in het eb/vloedsysteem door voedingsoplossing worden verspreid en hoe het verloop is van de hoeveelheid die in de loop van de tijd in de voedingsoplossing kan worden teruggevonden. In onderzoek van Rattink (1990) werd gevonden dat Foc zich vrijwel niet verspreidde in een eb/vloedsysteem. Als mogelijke oorzaak hiervan werd de bezinking van colony forming units (CFU, die deeltjes van de schimmel die op een voedingsbodem uitgroeien tot kolonies) op de bodem van de tank genoemd. Er werden daar namelijk hoge aantallen CFU van de schimmel aangetroffen.

Doel van de hier beschreven proef was om vast te stellen hoe de verspreiding en overleving van sporen van Foc in het gebruikte eb/vloedsysteem is bij afwezigheid van plantmateriaal.

Materiaal en methoden

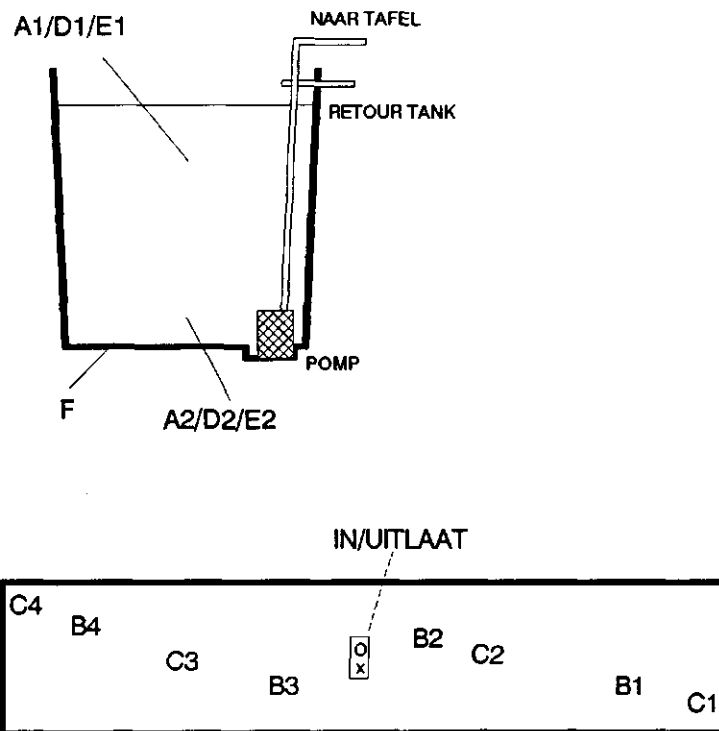
De proef werd uitgevoerd op twee eb/vloedeenheden (nr 5 en nr 6) van 1,5 bij 7 meter met profielbodem (Deense bodem), elk met een eigen tank voor voedingsoplossing. In figuur 1 is dit systeem getekend. De tanks waren gevuld met 500 liter voedingsoplossing voor Cyclamen (zie bijlage 1). Er stonden geen planten op de tafels tijdens de proef. Ter besmetting van de voedingsoplossing werd een sporensuspensie gemaakt van microconidiën van Foc in water. Hiervoor werden cultures op PDA (Potato Dextrose Agar) gebruikt die in het donker bij 26°C elf dagen geïncubeerd waren. Het gebruikte isolaat, nr. 90-4, was in maart 1990 aan het Proefstation geïsoleerd uit een Cyclamen van het type 'Pastel'.

Aan beide tanks werd vervolgens een hoeveelheid van de sporensuspensie toegevoegd, zodat de eindconcentratie in de voedingsoplossing 1500 sporen per ml bedroeg. Vervolgens werden de tafels bevoeid. De bevoeiing werd ingesteld op eenmaal vloed per dag, gedurende tien minuten. Er werd dan circa 2 minuten een constante vloedhoogte van twee à 2,5 cm bereikt.

Monsternamen

Vóór besmetting werd in het centrum van de tanks een monster genomen van de voedingsoplossing ter bepaling van een eventueel aanwezige besmetting met *Fusarium oxysporum*. Ook direct ná het besmetten van de voedingsoplossing werd er een monster genomen centraal in de tank. Er werden vervolgens op verschillende tijden op diverse plaatsen in het

systeem monsters genomen van de voedingsoplossing ter bepaling van de hoeveelheid CFU van *F.oxysporum*. Een overzicht van de monsternamen is weergegeven in tabel 1.



Figuur 1 Tekening van de tafel en tank van het gebruikte eb/vloedsysteem met de verschillende bemonsteringsplaatsen. (voor verklaring zie tabel 1)

De monsters in de tank werden genomen door een PVC-pijp (\varnothing 9 mm) met afgesloten bovenkant in de voedingsoplossing te steken tot op de hoogte waar het monster genomen werd. Door voorzichtig lucht boven uit de pijp te laten ontsnappen kon er voedingsoplossing de pijp in. De pijp werd weer afgesloten en uit de tank gehaald en het monster werd in een potje gedaan.

In de tank werd zowel een half uur vóór als een half uur ná vloed op twee plaatsen in de tank een monster genomen. Ook werden op een aantal dagen, zes uur na bevoeding monsters in de tank genomen.

Op drie dagen werd een monster genomen van de voedingsoplossing op de bodem van de tanks.

Op de tafels werd tijdens vloed op vier plaatsen een monster genomen van de voedingsoplossing. Deze monsters werden genomen door vóór vloed een petrischaaldeksel (\varnothing 9 cm) op tafel vast te plakken. Nadat de tafels weer drooggefallen waren, werd de voedingsoplossing die in de schalen was blijven staan verzameld.

Ongeveer één uur na vloed werd bovendien op vier plaatsen op de tafels een monster genomen van de voedingsoplossing die in de gootjes bleef staan. Deze monsters werden genomen door met een pasteurpipet voedingsoplossing uit de gootjes op te zuigen.

De voedingsoplossing werd uitgestreken op een voedingsbodem die selectief is voor *Fusarium oxysporum* (Komada, 1975). Per petrischaal (Ø 9 cm) werd 0,5 ml voedingsoplossing op het medium uitgestreken. Voor elk monster werd dit in zesvoud gedaan. Indien nodig werd ook een 10x en eventueel een 100x verdunning, eveneens in zesvoud, van het monster uitgestreken op het medium. Na een incubatieperiode van zes dagen bij 26°C in het donker kon het aantal CFU van Foc worden geteld en de hoeveelheid in het monster worden berekend. Voor deze berekening werd telkens het aantal CFU gebruikt dat geteld was op de schalen, waarop de laagste verdunning (meestal onverdund) van de monsters was uitgestreken. Alleen indien op deze schalen het aantal kolonies te hoog was om goed te kunnen tellen werd de waarde van de platen met de 10x of 100x verdunning genomen.

Tabel 1 Overzicht bemonsteringen (zie voor bemonsteringsplaatsen figuur 1)

MONSTER EN PLAATS	BEMONSTERD OP DAG												
	1	2	4	7	9	14	15	18	23	25	29	30	37
AA centrum tank vóór besmetting	X												
A1 tank half uur vóór vloed 20 cm onder vloeistofspiegel		X	X	X		X		X	X		X		X
A2 tank half uur vóór vloed 10 cm boven bodem		X	X	X		X		X	X		X		X
B1 t/m B4 tafel tijdens vloed	X	X	X	X		X		X	X		X		X
C1 t/m C4 gootjes na vloed	X	X	X	X		X		X	X		X		X
D1 als A1, half uur ná vloed		X			X					X	X	X	X
D2 als A2, half uur ná vloed		X			X					X	X	X	X
E1 als A1, zes uur na vloed		X	X	X					X				X
E2 als A2, zes uur na vloed		X	X	X					X				X
F bodem tank, na vloed				X				X		X			

Statistische verwerking

Statistische analyse van mogelijke verschillen tussen de bemonsteringsplaatsen op de tafels is zeer moeilijk omdat op elke plaats slechts één monster genomen is. Ook de waarden van de bemonsteringen in de tank berusten telkens op de gegevens uit slechts één monster. Bovendien zijn er tussen het begin en het einde van de proef zeer grote verschillen tussen de waarden van monsters die op één plaats genomen zijn. Om toch enig inzicht te krijgen in eventueel aanwezige verschillen tussen bemonsteringsplaatsen werden de waarden vergeleken met behulp van de tekentoets. Er werd getoetst bij een eenzijdige onbetrouwbaarheid van 0,05%. Bij de statistische analyse werden in één toetsing de waarden van beide tafels/tanks meegenomen.

De herhalingen werden dus niet apart getoetst. Met behulp van regressieanalyse werd het verloop van de concentratie in de tijd van de bemonsteringen op tafel 5 en 6 met elkaar vergeleken.

Resultaten

In bijlage 2 is het berekende aantal CFU van Foc per monster, per bemonsteringsdag weergegeven. Hierbij is tevens vermeld welke verdunning gebruikt is voor deze berekening.

Vóór besmetting werd geen Foc in de voedingsoplossing aangetoond. Na besmetting was het aantal CFU dat in tank 5 en 6 werd aangetoond respectievelijk 927 en 1003 CFU/ml.

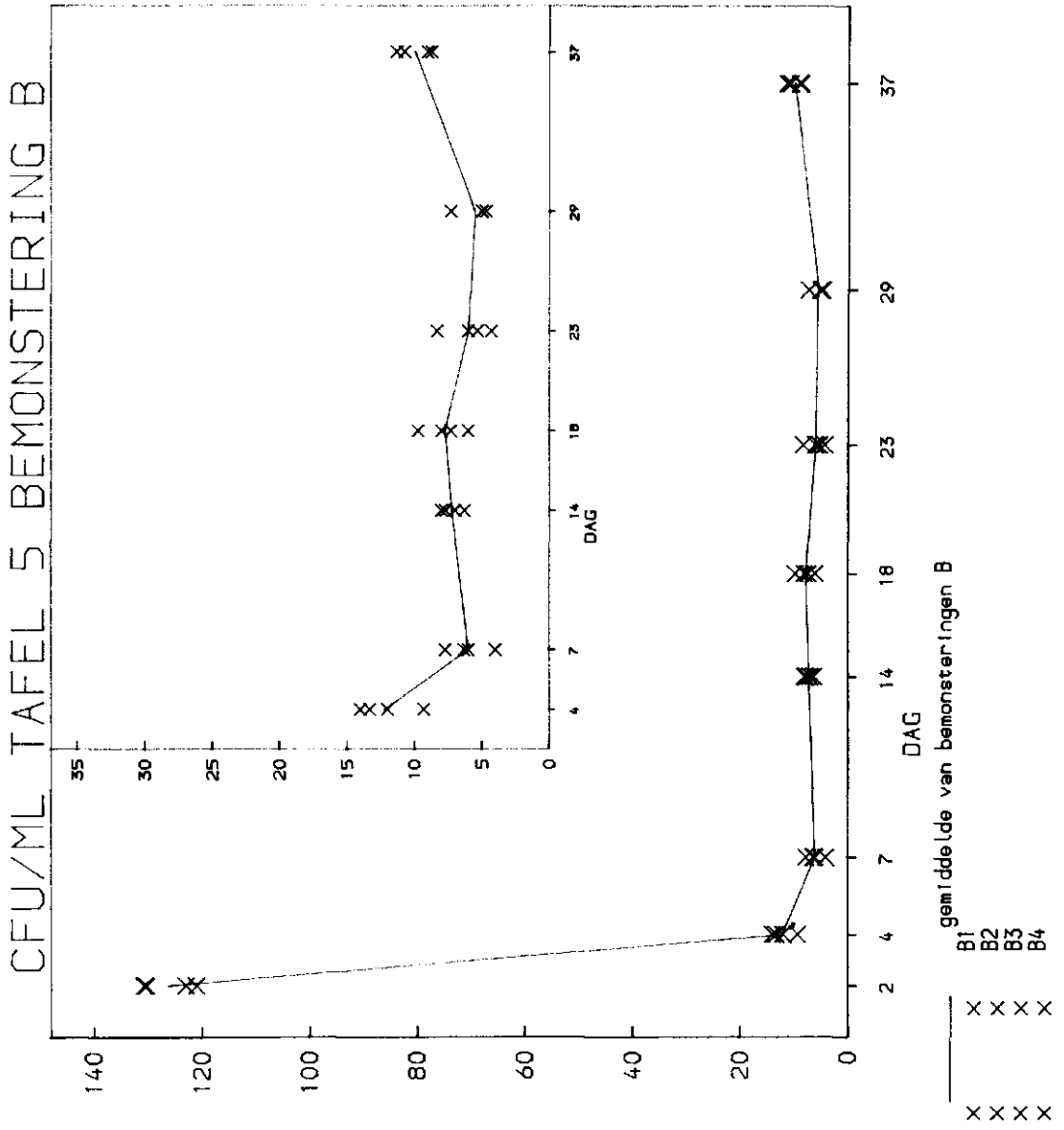
Bemonstering van voedingsoplossing op de tafels

In figuur 2 is het aantal CFU in de monsters die op de tafels genomen werden uitgezet tegen de tijd. In deze figuur is te zien dat de hoeveelheid CFU binnen enkele dagen zakt tot minder dan 10 per ml voedingsoplossing op dag 7. Het aantal CFU dat tot beëindiging van de proef (dag 37) in de voedingsoplossing op de tafels werd aangetroffen blijft gedurende de proef laag, 10 tot 25 CFU/ml. Met name op tafel 6 lijkt er een toename te zijn vanaf dag 7.

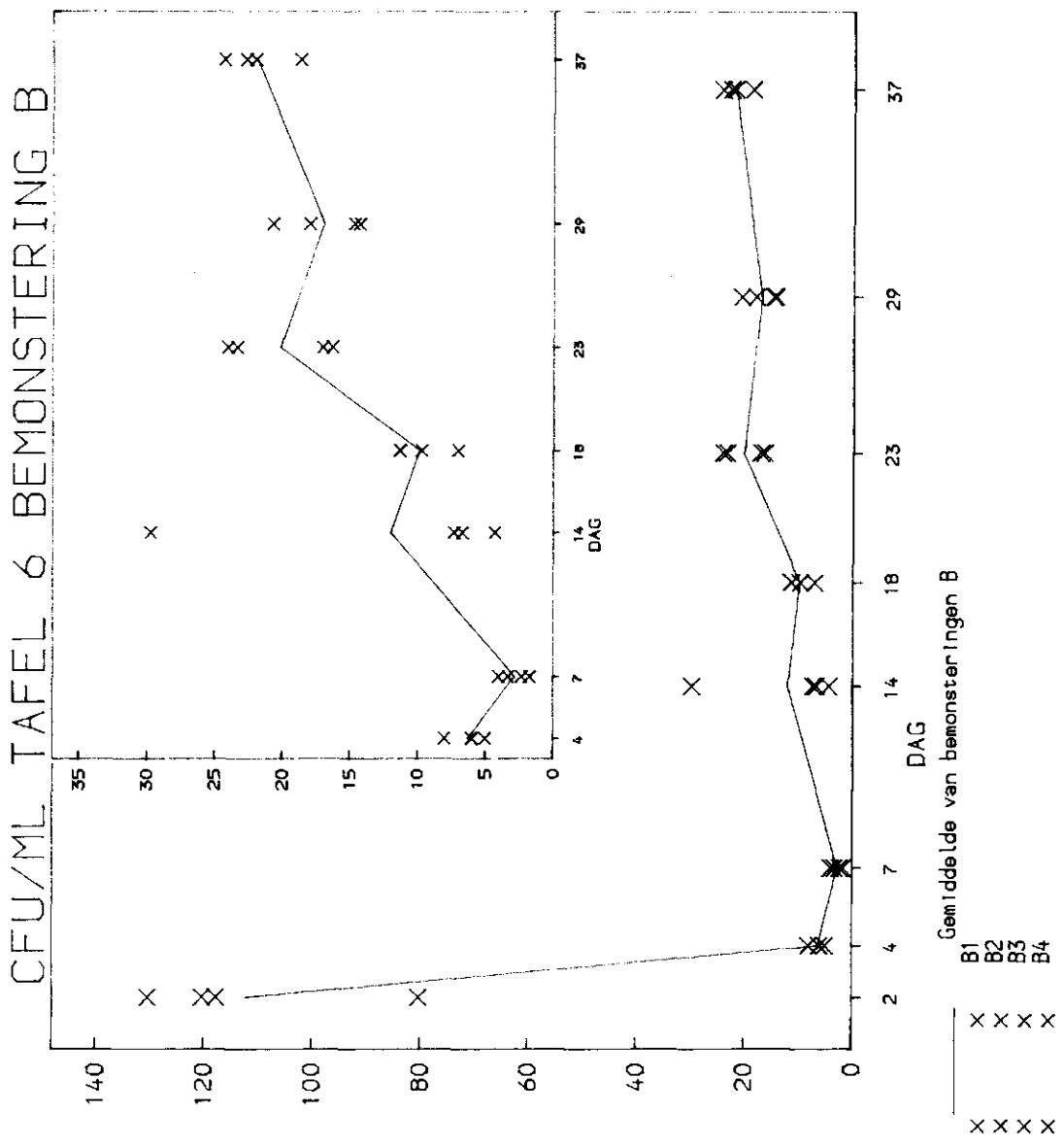
Uit statistische analyse (tweezijdige toetsing) blijkt er geen verschil aantoonbaar tussen de gemiddelde waarde van de bemonsteringen B1 en B2, aan de ene zijde van de aan/afvoeropening, vergeleken met die van B3 en B4, aan de andere zijde. Ook tussen de gemiddelde waarde van B1 en B4 (grote afstand tot aan/afvoer) vergeleken met die van B2 en B3 (kleine afstand tot aan/afvoer) is geen verschil aantoonbaar. Hieruit mag geconcludeerd worden dat er geen plaatsverschillen tussen de bemonsteringsplaatsen op de tafel aanwezig zijn.

Met behulp van regressieanalyse werd onderzocht of er een toename was van de concentratie in de voedingsoplossing op de tafels vanaf dag 7. Deze analyse staat in bijlage 3. In figuur 3 zijn per tafel de gevonden concentraties en de gefitte regressielijn weergegeven. De regressiecoëfficiënten van tafel 5 en 6 zijn respectievelijk 0,07 en 0,60. In beide gevallen is er dus een stijgende lijn. Zoals blijkt uit de analyse is de gevonden waarde alleen voor tafel 6 significant afwijkend van een regressiecoëfficiënt gelijk aan 0. Er is dus een significante toename van de concentratie CFU in de voedingsoplossing.

Ook werd de voedingsoplossing die na de vloedperiode achterbleef in de gootjes op verschillende plaatsen op de tafels onderzocht op aanwezigheid van Foc. Aanvankelijk werd op vier plaatsen (C1, C2, C3 en C4) bemonsterd, later nog op twee plaatsen (C1 en C4). In figuur 4 zijn de resultaten van deze bemonsteringen uitgezet tegen de tijd. Een probleem bij de bemonsteringen C is het feit dat het zeer moeilijk was om uniforme monsters te nemen op deze plaatsen. Veelal was er niet veel voedingsoplossing aanwezig en de ene keer werd mogelijk meer materiaal van de bodem meegenomen dan een andere keer. Uit figuur 4 blijkt dat de hoeveelheid CFU in de monsters het verloop volgt wat

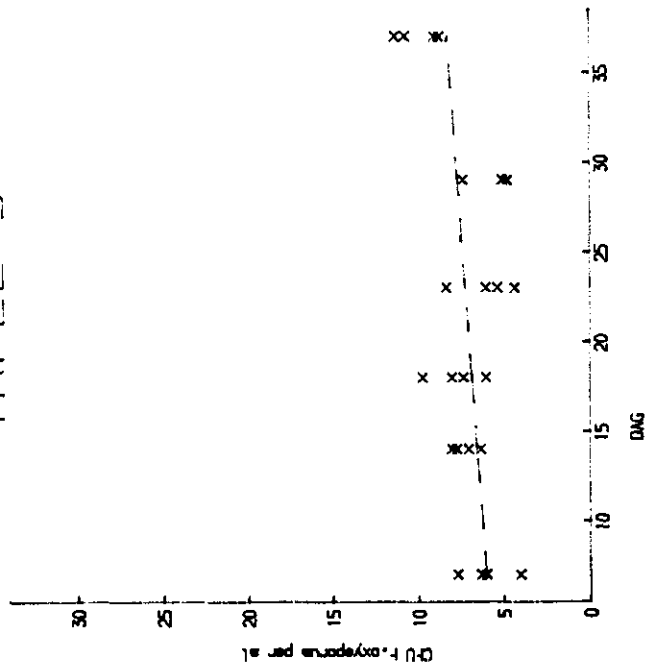


Figuur 2 A Concentratie Colony Forming Units in de voedingsoplossing op tafel 5 tijdens vloed (bemonstering B)

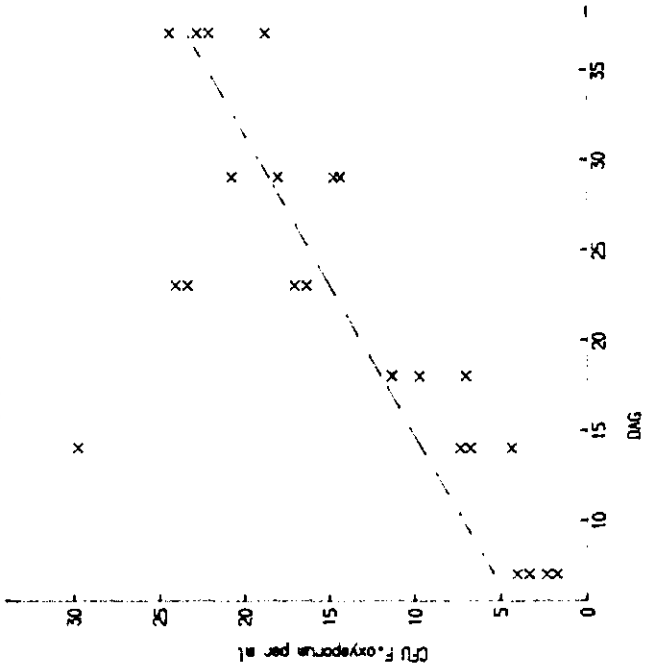


Figuur 2 B Concentratie Colony Forming Units in de voedingsoplossing op tafel 6 tijdens vloed (bemonstering B)

TAFEL 5

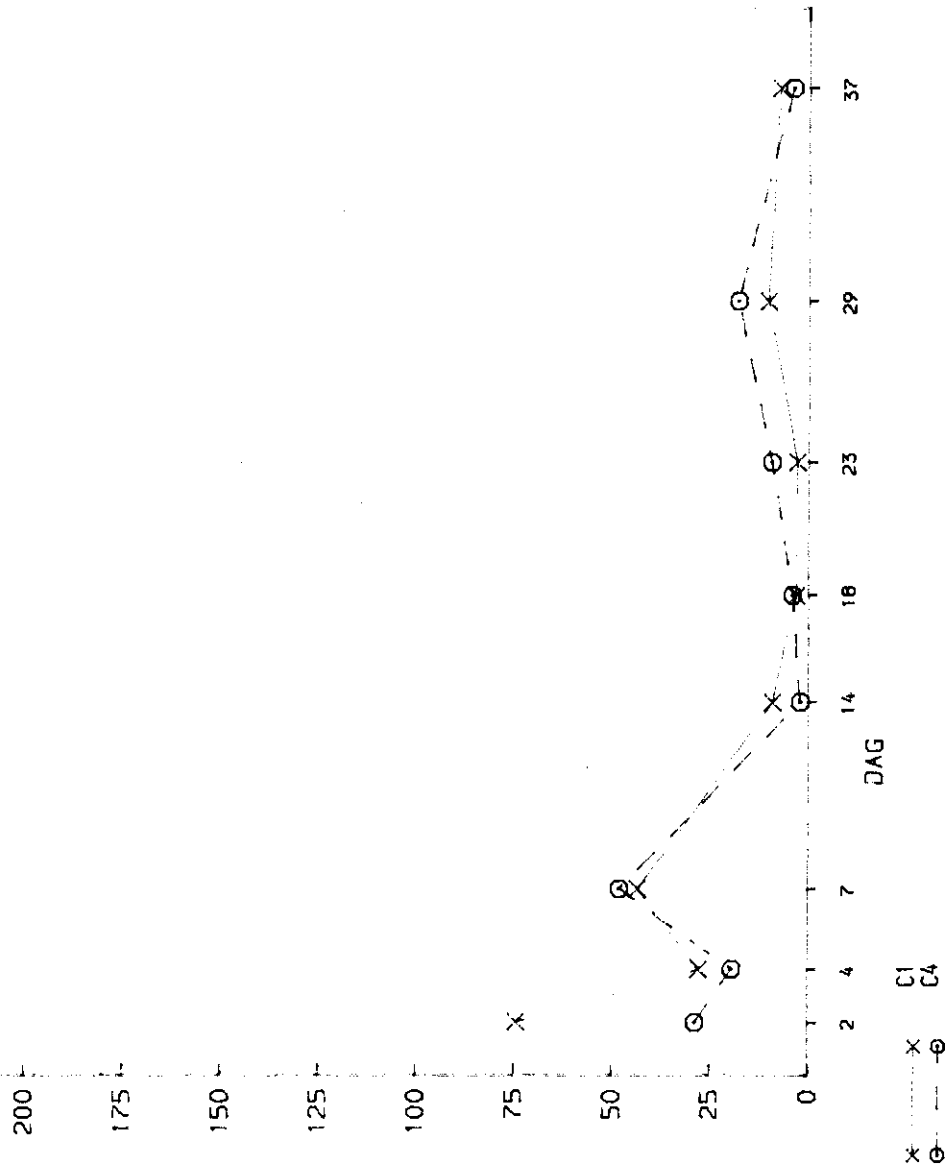


TAFEL 6

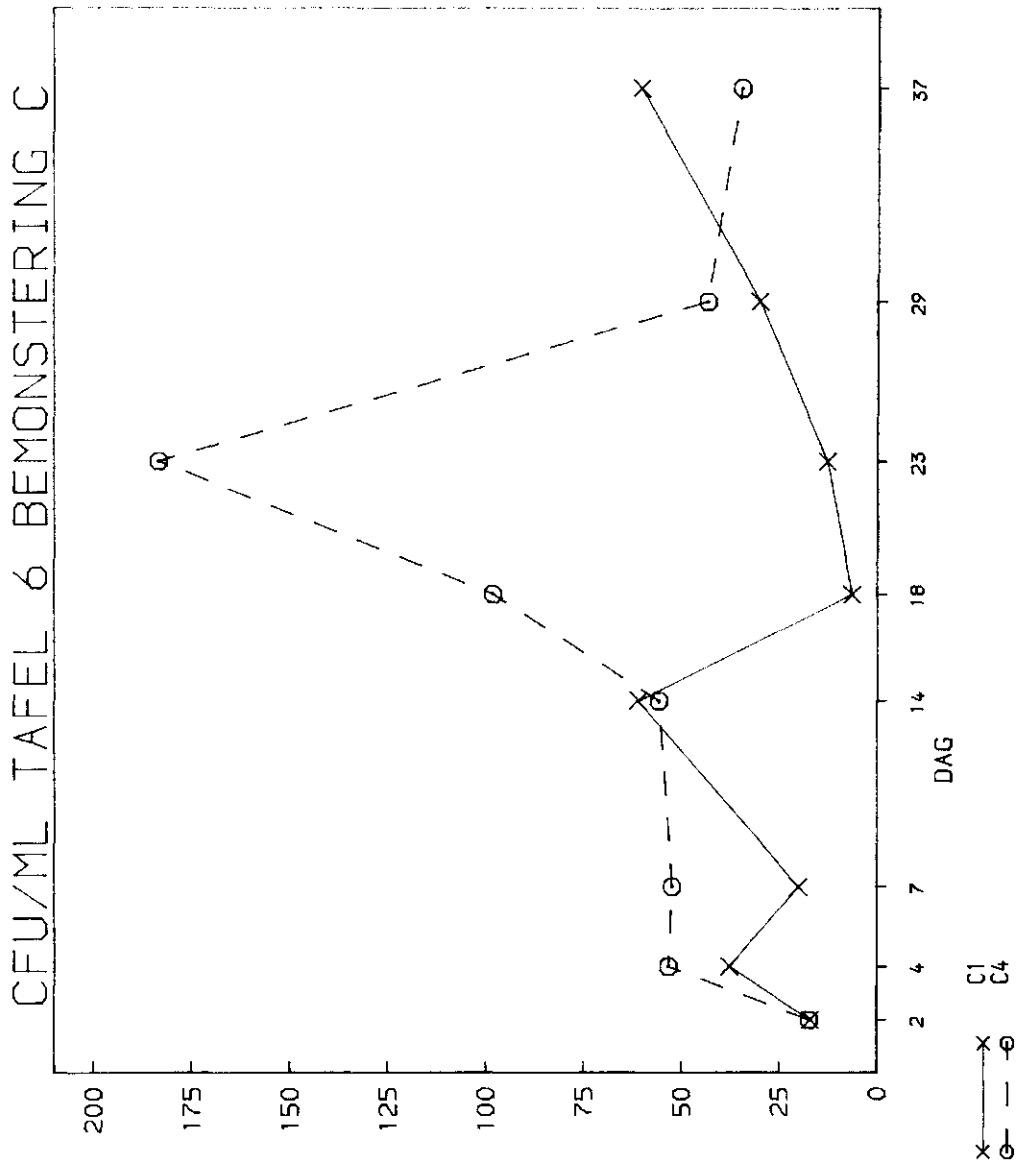


Figuur 3 Concentratie CFU's in de voedingsoplossing op de tafels 5 en 6 tijdens vloed (bemonstering B) en de berekende regressielijn

CEU/ML TAFEL 5 BEMONSTERING C



Figuur 4 A Concentratie Colony Forming Units in de voedingsoplossing op tafel 5 ná vloed (bemonstering C)



Figuur 4 B Concentratie Colony Forming Units in de voedingsoplossing op tafel 6 ná vloed (bemonstering C)

gevonden werd bij de bemonsteringen van de voedingsoplossing op tafel tijdens vloed (monstername B, figuur 2). Na een sterke daling wordt een niveau bereikt dat schommelt tussen de 5 en 20 CFU/ml. Op tafel 6 lopen de verschillen tussen de bemonsteringen veel sterker uiteen en ligt het niveau gemiddeld ook wat hoger. De oorzaak hiervan is niet geheel duidelijk, waarschijnlijk hangt dit samen met de weinig uniforme bemonsteringsmethode. Tweezijdige toetsing van de verschillen tussen C1 en C4 met behulp van de tekentoets laat zien dat er geen verschil tussen de bemonsteringen aantoonbaar is.

Bemonstering van voedingsoplossing in de tank

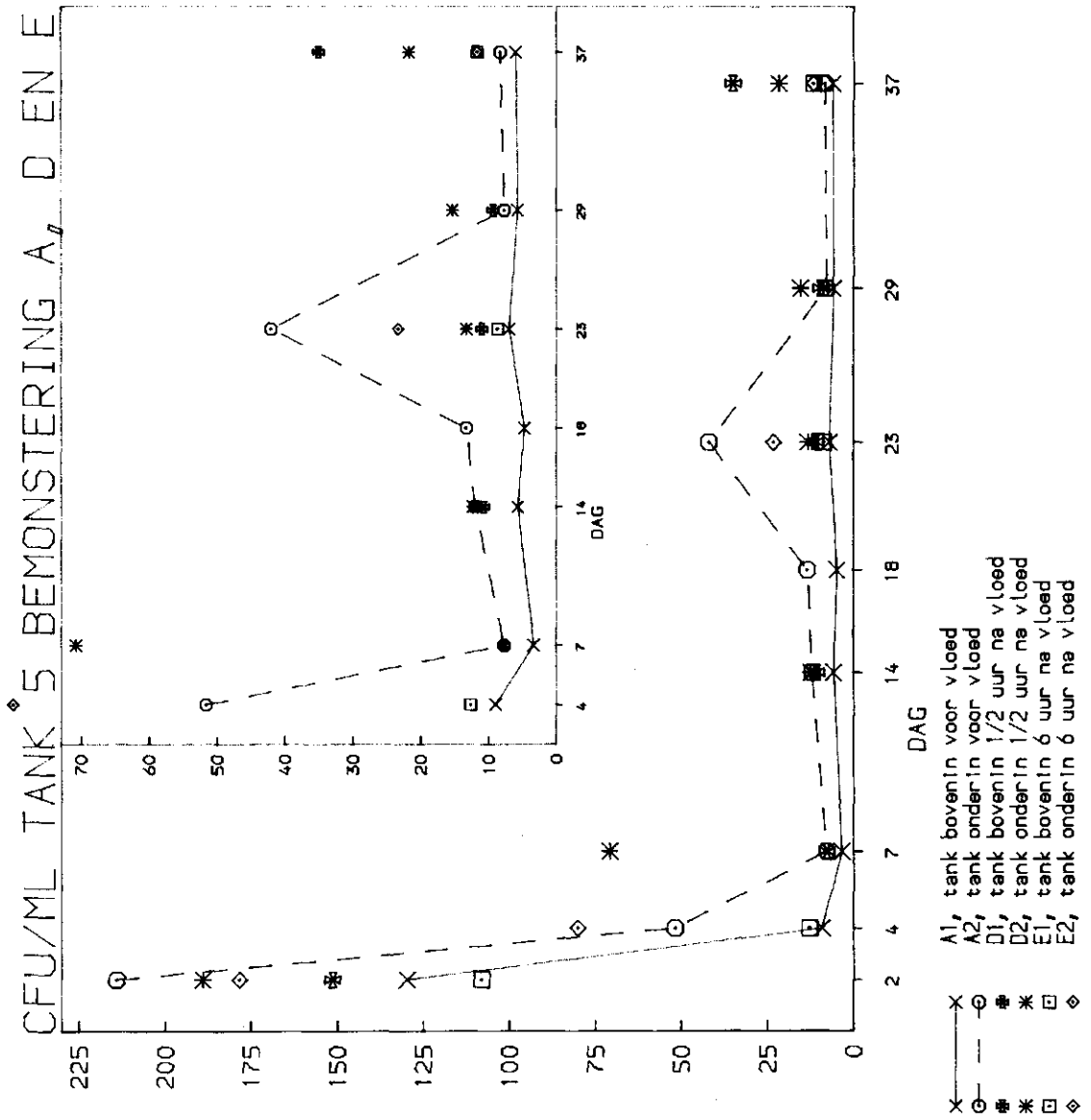
In figuur 5 is het aantal CFU in de voedingsoplossing op verschillende plaatsen in de tank weergegeven. De voedingsoplossing in de tanks is op het moment dat de A-monsters genomen werden ruim 23 uur niet in beweging geweest. Wederom blijkt er een grote overeenkomst te zijn tussen de resultaten van de in figuur 5 weergegeven bemonsteringen en die op de tafels tijdens vloed (figuur 2). Na een aanvankelijke sterke daling lijkt de hoeveelheid CFU zich op een laag niveau te stabiliseren.

In figuur 5 is ook het aantal CFU weergegeven in de monsters die ongeveer één uur na bevoeiing genomen werden in de tank en die zes uur na bevoeiing werden genomen.

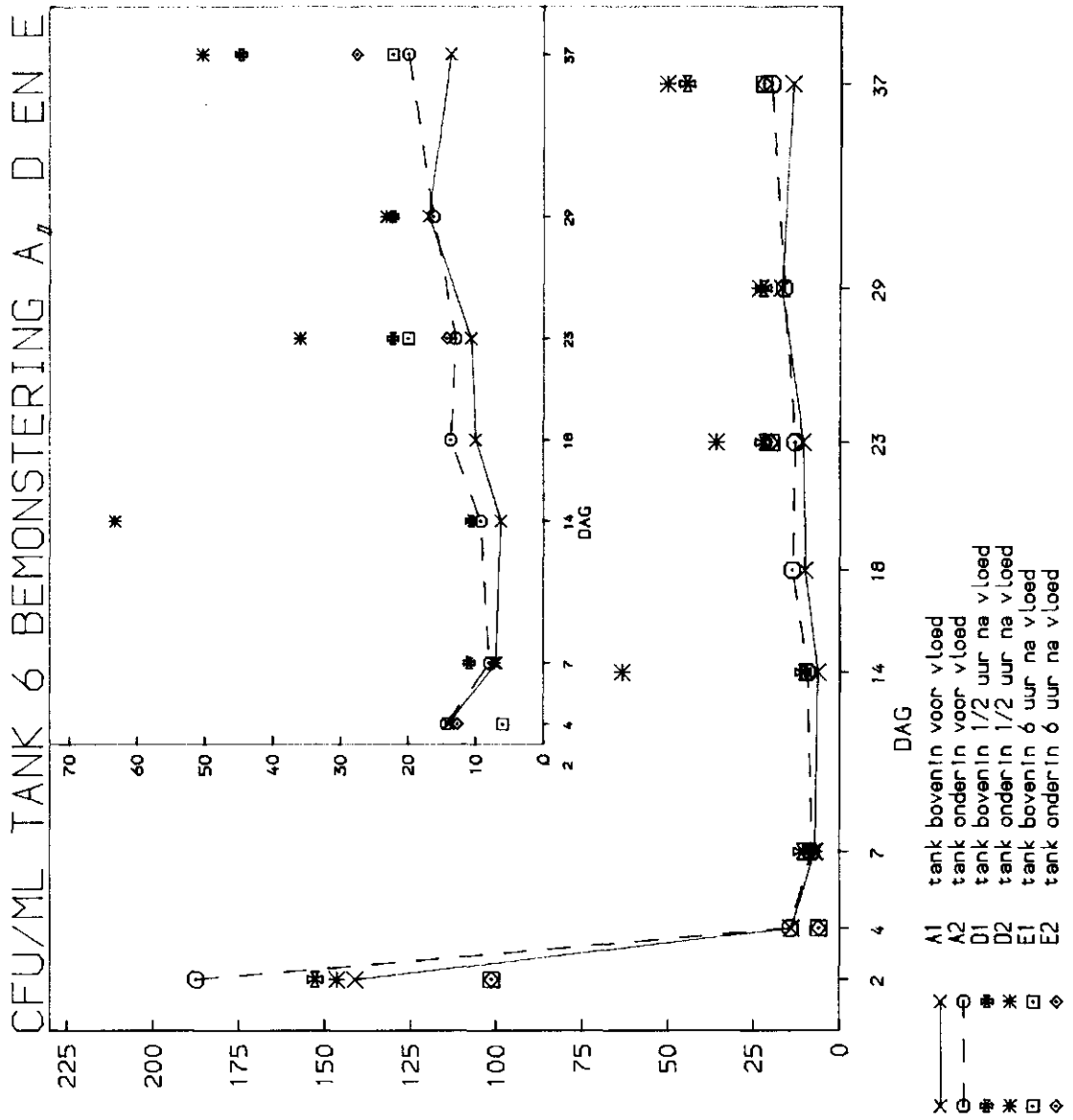
De gevonden waarden werden met behulp van de tekentoets eenzijdig getoetst, waarbij de verwachting was dat, als gevolg van bezinking, de hoeveelheid CFU onderin de tank hoger was dan bovenin. Worden hiervoor alle tankbemonsteringen meegenomen, dan blijkt het verschil duidelijk significant te zijn. Bij toetsing van de verschillen tussen de gevonden concentraties boven en onder in de tank per bemonstering blijkt dat hierin direct vóór bevoeiing van de tafels een significant verschil aanwezig is. Boven in de tank bevinden zich significant minder CFU dan onderin. Een half uur na bevoeiing is het verschil niet meer significant. Zes uur na bevoeiing blijkt er echter weer een significant verschil te zijn.

Ook werden de bemonsteringen in de tank een half uur voor bevoeiing vergeleken met die een half uur na bevoeiing. Ook hier werd eenzijdig getoetst met de verwachting dat de monsters na vloed een hoger aantal CFU per milliliter voedingsoplossing zouden bevatten. Hierbij moet worden vermeld dat niet alle waarnemingen waartussen het verschil getoetst werd op dezelfde dag waren genomen. Acht maal (van de 22) was er een verschil van twee dagen tussen de bemonstering vóór en na vloed. Uit de toetsing bleek het verschil significant te zijn.

Op drie dagen (dag 7, 18 en 23) werd ook de voedingsoplossing op de bodem van de tank bemonsterd vóór bevoeiing van de tafels. Op dag 18 werd op twee plaatsen op de bodem een monster genomen, op dag 7 en dag 25 op één plaats. In tabel 2 staan de resultaten van deze bemonsteringen. Ook zijn ter vergelijking de resultaten van de andere tankbemonsteringen op hetzelfde tijdstip weergegeven. Uit de tabel blijkt dat zich op de bodem van de tank zeer grote hoeveelheden schimmeldeeltjes bevinden. Deze moeten hier bezonken zijn. De hoeveelheid CFU in de monsters op de drie bemonsteringsdata loopt



Figuur 5 A Concentratie Colony Forming Units in de voedingsoplossing op verschillende plaatsen in tank 5 vóór en ná vloed



Figuur 5 B Concentratie Colony Forming Units in de voedingsoplossing op verschillende plaatsen in tank 6 vóór en ná vloed

sterk uiteen. Ook tussen de twee bemonsteringen op verschillende plaatsen op de bodem (dag 18) zitten grote verschillen. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de verdeling van het 'depot' op de bodem, die niet overal gelijk is. Dit was ook zichtbaar in de tank. Bovendien speelt ook hier de monsternamen een belangrijke rol. Met de gebruikte bemonsteringsmethode is het zeer moeilijk een 'standaard hoeveelheid' van het bezonken materiaal te nemen.

Tabel 2 Bemonstering bodem tanks

DAG	HOEVEELHEID (CFU/ML)					
	TANK 5			TANK 6		
	BODEM	A1	A2	BODEM	A1	A2
7	3340,0	3,3	7,7	1443,3	7,0	8,0
18 (MONSTER 1)	980,0			740,0		
18 (MONSTER 2)	228,0			2508,0		
18		4,7	13,3		10,0	13,7
25 (23)	5500,0	(7,0)	(42,0)	6266,7	(10,7)	(13,0)

Conclusie en discussie

Uit regressieanalyse, uitgevoerd met de gevonden waarden op de tafels tijdens vloed, blijkt dat de herhalingen (tafel 5 en 6) niet aan elkaar gelijk zijn. Hoewel in beide gevallen de regressiecoëfficiënt groter is dan 0, is er alleen op tafel 6 een significante toename van de concentratie in de tijd. De oorzaak hiervan is niet duidelijk, de systemen zijn namelijk exact gelijk. Wel werd op tafel 6 een grotere algengroei waargenomen. Mogelijk biedt deze voor *Fusarium oxysporum* een voedingsbodem, waardoor groei mogelijk is en er een toename van CFU in de voedingsoplossing ontstaat. Dit zal verder onderzocht moeten worden.

Een groot deel van de bij aanvang van de proef toegevoegde sporen van Foc blijkt binnen een aantal dagen niet meer voor te komen in de voedingsoplossing die tijdens vloed in het systeem rondgepompt wordt. Het grootste deel van de sporen lijkt te zijn bezonken op de bodem van de tank, wat blijkt uit de hoge concentratie die daar aangetroffen werd. Een andere mogelijkheid is dat een groot deel van de microconidiën van Foc binnen enkele dagen gestorven of niet meer kiemkrachtig is. Dit werd in de beschreven proef niet onderzocht. Uit eerdere waarnemingen is bekend dat de overlevingsduur van Foc in voedingsoplossing zeer lang is (Rattink, 1990, Stelder, niet gepubliceerde waarnemingen). In een aparte proef zal echter nogmaals worden nagegaan wat het overlevings- en het kiempercentage is in de voedingsoplossing.

Ook de hoeveelheden CFU die bij de bemonsteringen in de tank gevonden werden wijzen op het bezinken van schimmeldeeltjes in de tank in de periode dat de voedingsoplossing niet in beweging is. Vóór

bevloeiing blijkt de hoeveelheid CFU boven in de tank significant lager dan onderin. Dit verschil is er een half uur na bevloeiing niet meer, maar zes uur later weer wel. Het oppompen van de voedingsoplossing en het weer deels terugstromen van de voedingsoplossing in de tank tijdens bevloeiing veroorzaakt turbulentie, waardoor menging van de voedingsoplossing ontstaat. Hierdoor is er geen verschil meer in concentratie CFU in de voedingsoplossing boven en onder in de tank.

Ook blijken de bemonsteringen in de tank direct vóór bevloeiing een significant lager aantal CFU te bevatten dan die direct ná bevloeiing. Tijdens de turbulatie, als gevolg van bevloeiing van de tafels, wordt blijkbaar een deel van de reeds op de bodem van de tank bezonken CFU weer meegenomen in de stromende voedingsoplossing.

Uit de resultaten van deze proef blijkt dat het overgrote deel van de sporen dat bij aanvang van de proef is toegevoegd aan de voedingsoplossing binnen enkele dagen bezonken is op de bodem van de tank. Niet alle sporen bezinken echter. Van de bezonken sporen wordt een klein deel tijdens bevloeiing van de tafels weer meegenomen in de stroom voedingsoplossing. De periode van circa 23 uur stilstand van de voedingsoplossing die volgt, leidt ertoe dat dezelfde hoeveelheid CFU weer bezinkt op de bodem van de tank. Hierdoor ontstaat er als het ware een evenwicht tussen bezonken en weer in de stromende voedingsoplossing opgenomen hoeveelheid CFU, waardoor de gevonden concentratie CFU in de loop van de tijd op een bepaald niveau blijft.

De bezonken schimmeldeeltjes maken een aanzienlijk deel uit van de totale hoeveelheid sporen die bij aanvang van de proef werd toegevoegd aan de voedingsoplossing. Het is echter op grond van de uitgevoerde bemonsteringen niet mogelijk een goede inschatting te maken van de totale hoeveelheid deeltjes die aanwezig is op de bodem van de tank in relatie tot de hoeveelheid aan het begin van de proef.

Uit de in deze proef verkregen gegevens blijkt dat in het gebruikte eb/vloedsysteem verspreiding van sporen van Foc plaatsvindt en dat de verdeling van sporen over het systeem zeer gelijkmatig is. Als vervolg op de hier beschreven proef is onderzocht hoe de verspreiding van sporen van Foc en van de door Foc veroorzaakte verwelkingsziekte in het eb/vloedsysteem is tijdens een teelt van Cyclamen. Deze proef werd uitgevoerd op dezelfde eb/vloedeenheden als hier gebruikt werden en zal eveneens in een proefverslag worden beschreven.

LITERATUUR

- Komada, H., 1975, Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant. Protec. Res. 8; 114-125.
- Rattink, H., 1990, Epidemiology of Fusarium wilt in an ebb and flow system. Neth. J. Pl. Path. 96; 171-177.

Bijlage 1 Recept voedingsoplossing cyclamen

Algemeen advies BLGG / Consulentenschap Aalsmeer-Utrecht

Stockoplossing (100x geconcentreerd) per 1000 liter:

A:	kalksalpeter	64.8 kg
	ammoniumnitraat	7.8 KG
	Fe-chelaat (6%)	1.4 kg
B:	Kalisalpeter	35.4 kg
	monokalifosfaat	20.4 kg
	kalisulfaat	4.4 kg
	bitterzout	18.5 kg
	mangaansulfaat	85 gram
	zinksulfaat	85 gram
	borax	95 gram
	kopersulfaat	12 gram
	natriummolybdaat	12 gram

EC wordt + 2.0

verhouding elementen:

	NO3	H2PO4	SO4	NH4	K	Ca	Mg
mMol/liter	10.6	1.5	1.0	1.1	5.5	3.0	0.75

Bijlage 2 A. Berekenen concentratie CFU tabel 5

DAG	MONSTER	VERD	CFU/ML	DAG	MONSTER	VERD	CFU/ML
1	AA	100	0.0	14	B4	100	7.0
1	A	10	926.7	14	C1	100	9.0
1	B1	10	1076.7	14	C4	100	2.0
1	B2	10	1140.0	15	D1	100	10.7
1	B3	10	743.3	15	D2	100	12.3
1	B4	10	903.3	18	A1	100	4.7
1	C1	100	317.3	18	A2	100	13.3
1	C2	100	*	18	B1	100	6.0
1	C3	100	225.0	18	B2	100	9.7
1	C4	100	256.3	18	B3	100	7.3
1	E1	10	675.0	18	B4	100	8.0
1	E2	10	1455.0	18	C1	100	3.0
2	A1	100	129.7	18	C4	100	4.0
2	A2	100	214.0	18	F2	10	228.0
2	D1	100	151.3	18	F1	10	980.0
2	D2	100	189.0	23	A1	100	7.0
2	B1	100	121.0	23	A2	100	42.0
2	B2	100	130.7	23	B1	100	5.3
2	B3	100	130.3	23	B2	100	8.3
2	B4	100	123.0	23	B3	100	4.3
2	C1	100	74.3	23	B4	100	6.0
2	C2	100	100.4	23	C1	100	2.7
2	C3	100	72.0	23	C4	100	9.3
2	C4	100	28.7	23	E1	100	8.7
2	E1	100	108.0	23	E2	100	23.3
2	E2	100	178.3	25	D1	100	11.0
4	A1	100	9.0	25	D2	100	13.3
4	A2	100	51.7	25	F1	1	5500.0
4	B1	100	13.3	29	A1	100	5.7
4	B2	100	14.0	29	A2	100	7.7
4	B3	100	12.0	29	B1	100	5.0
4	B4	100	9.3	29	B2	100	4.7
4	C1	100	27.7	29	B3	100	7.3
4	C2	100	17.6	29	B4	100	5.0
4	C3	100	21.3	29	C1	100	10.3
4	C4	100	19.3	29	C4	100	18.0
4	E1	100	12.7	29	D1	100	9.3
4	E2	100	80.0	29	D2	100	15.3
7	A1	100	3.3	30	D1	100	9.3
7	A2	100	7.7	30	D2	100	6.3
7	B1	100	4.0	37	A1	100	6.0
7	B2	100	6.3	37	A2	100	8.3
7	B3	100	7.7	37	B1	100	8.7
7	B4	100	6.0	37	B2	100	10.7
7	C1	100	43.3	37	B3	100	9.0
7	C4	100	48.0	37	B4	100	11.3
7	F1	10	3340.0	37	C1	100	7.3
9	D1	100	7.7	37	C4	100	4.0
9	D2	100	70.7	37	D1	100	35.0
14	A1	100	5.7	37	D2	100	21.7
14	A2	100	12.0	37	E1	100	11.7
14	B1	100	6.3	37	E2	100	11.7
14	B2	100	7.7				
14	B3	100	8.0				

VERD = gebruikte verdunning monster voor berekening concentratie CFU.
 100 = onverdund; 10 = 10% verdunning

Bijlage 2 B Berekende concentratie CFU tafel 6

DAG	MONSTER	VERD	CFU/ML	DAG	MONSTER	VERD	CFU/ML
1	AA	100	0.0	14	B4	100	29.7
1	A	10	1003.3	14	C1	100	61.0
1	B1	10	940.0	14	C4	100	55.7
1	B2	10	876.7	15	D1	100	10.7
1	B3	10	906.7	15	D2	100	63.3
1	B4	10	986.7	18	A1	100	10.0
1	C1	100	257.3	18	A2	100	13.7
1	C2	100	376.7	18	B1	100	9.7
1	C3	100	298.0	18	B2	100	11.3
1	C4	100	340.3	18	B3	100	11.3
1	E1	10	750.0	18	B4	100	7.0
1	E2	10	1145.0	18	C1	100	6.3
2	A1	100	141.0	18	C4	100	98.0
2	A2	100	187.3	18	F2	10	2508.0
2	D1	100	152.7	18	F1	10	740.0
2	D2	100	146.3	23	A1	100	10.7
2	B1	100	80.3	23	A2	100	13.0
2	B2	100	130.3	23	B1	100	16.3
2	B3	100	117.7	23	B2	100	17.0
2	B4	100	120.3	23	B3	100	23.3
2	C1	100	17.0	23	B4	100	24.0
2	C2	100	170.3	23	C1	100	12.7
2	C3	100	32.3	23	C4	100	183.3
2	C4	100	17.3	23	E1	100	20.0
2	E1	100	101.3	23	E2	100	14.3
2	E2	100	111.7	25	D1	100	22.3
4	A1	100	14.0	25	D2	100	36.0
4	A2	100	14.3	25	F1	0.1	6266.7
4	B1	100	6.0	29	A1	100	17.0
4	B2	100	5.0	29	A2	100	16.3
4	B3	100	8.0	29	B1	100	18.0
4	B4	100	6.0	29	B2	100	14.7
4	C1	100	37.7	29	B3	100	14.3
4	C2	100	4.7	29	B4	100	20.7
4	C3	100	2.0	29	C1	100	30.0
4	C4	100	53.3	29	C4	100	43.3
4	E1	100	6.0	29	D1	100	22.3
4	E2	100	12.7	29	D2	100	23.3
7	A1	100	7.0	30	D1	100	32.0
7	A2	100	8.0	30	D2	100	38.7
7	B1	100	2.3	37	A1	100	13.7
7	B2	100	3.3	37	A2	100	20.0
7	B3	100	4.0	37	B1	100	24.3
7	B4	100	1.7	37	B2	100	22.0
7	C1	10	20.0	37	B3	100	18.7
7	C4	100	52.3	37	B4	100	22.7
7	F1	10	1443.3	37	C1	100	60.3
9	D1	100	11.0	37	C4	100	34.7
9	D2	100	7.3	37	D1	100	44.7
14	A1	100	6.3	37	D2	100	50.3
14	A2	100	9.3	37	E1	100	22.3
14	B1	100	7.3	37	E2	100	27.6
14	B2	100	6.7				
14	B3	100	4.3				

VERD = gebruikte verdunning monster voor berekening concentratie CFU.
 100 = onverdund, 10 = 10% verdunning

Bijlage 3 Variantieanalyse

Response variate: sporen

Fitted terms: Constant + tafel + dag.tafel

*** Summary of analysis ***

	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.
Regression	3	1407.3	469.09	25.77
Residual	44	801.0	18.21	
Total	47	2208.3	46.98	
Change	-3	-1407.3	469.09	25.77

Percentage variance accounted for 61.3

* The following units have large standardized residuals:

B 4.88

*** Estimates of regression coefficients ***

	estimate	s.s.	t	t pr.
Constant	1.17	2.08	0.56	0.577
tafel 2	4.32	2.95	1.47	0.150
dag.tafel 1	0.5986	0.0888	6.74	<.001
dag.tafel 2	0.0738	0.0888	0.83	0.410