

---

# PPS Verspreiding Rotbacteriën

PPS Verspreiding Rotbacteriën 2020-2021



Anne van Diepeningen, Yvonne Griekspoor, Odette Mendes, Priscilla Kok en Jan van der Wolf

Wageningen University & Research

Dit onderzoek is in opdracht van BO Akkerbouw en LNV uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Biointeracties en Plantgezondheid in het kader van de PPS Verspreiding Rotbacteriën LWV19011.

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, januari 2022

---

Rapport WPR-WUR-LWV19011

---

Van Diepeningen, A.D., Griekspoor Y, Mendes O, Kok, P. & van der Wolf, J.M., 2021. *PPS Verspreiding Rotbacteriën; PPS Verspreiding Rotbacteriën*. Wageningen Research, Rapport WPR-WUR-LWV19011. 43 blz.

Pectinolytische bacteriën van de geslachten *Dickeya*- en *Pectobacterium* (soft rot Pectobacteriaceae, SRP's), veroorzaken in Nederland grote schade in land- en tuinbouwgewassen (geschatte schade 20-30 MEuro/jaar in pootaardappelteelt). Er is geen resistentie (immunititeit) tegen SRP's bekend in commerciële rassen en er zijn geen bestrijdingsmiddelen beschikbaar. Beheersing is dus geheel afhankelijk van hygiëne en teeltmaatregelen. Verspreiding van de ziekteverwekker van een besmette knol naar overige oogst blijkt onafhankelijk van de grondsoort tot 30-50m na de oogst van een besmette knol plaats te kunnen vinden. Besmetting is het grootst tussen knollen die in dezelfde partij of krat worden opgevangen, maar via de oogstmachine worden besmettingen ook verder verspreid. De hoeveelheid overgedragen bacteriën neemt af met de afstand tot een geoogste besmette knol. Overleving van de bacterie op de oogstmachine is beperkt tot gemiddeld 1 dag en wordt verminderd door hogere omgevingstemperatuur, verminderde waterbeschikbaarheid en gebruik van ontsmettingsmiddelen.

Trefwoorden: Verspreiding van zachtrot bacteriën, *Pectobacterium brasiliense*, zandgrond, kleigrond, overleving

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Biointeracties en Plantgezondheid, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; [www.wur.nl/plant-research](http://www.wur.nl/plant-research)

KvK: 09098104 te Arnhem  
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. 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 Stichting Wageningen Research.

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

Rapport WPR-WUR-LWV19011

Foto omslag: Aardappelknol met zachtrot door *Pectobacterium brasiliense*.

---

# Inhoud

	<b>Woord vooraf</b>	<b>5</b>
	<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
	1.1 Achtergrond	9
	1.2 Diagnostiek van SRP's	12
	1.3 Het onderzoek	13
<b>2</b>	<b>Versmering tijdens de oogst</b>	<b>14</b>
	2.1 Merkerstam <i>P. brasiliense</i>	14
	2.2 Versmering op zandgrond	15
	2.3 Versmering op kleigrond	26
	2.4 Gemiddelde versmering	29
<b>3</b>	<b>Overleving en ontsmetting van <i>P. brasiliense</i></b>	<b>30</b>
	3.1 Overleving op de machine	30
	3.2 Effect omgevingsfactoren op overleving	32
	3.3 Effectiviteit ontsmettingsmiddelen	34
<b>4</b>	<b>Conclusies en discussie</b>	<b>35</b>
	<b>Literatuur</b>	<b>39</b>
	<b>Bijlage 1</b>	<b>41</b>

---

---

# Woord vooraf

Het hier beschreven onderzoek is uitgevoerd in opdracht van BO Akkerbouw en LNV door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Biointeracties en Plantgezondheid in het kader van de PPS Verspreiding Rotbacteriën LWV19011. Het project had een looptijd van 2 jaar (2020 en 2021). In dit project zijn kwantitatieve gegevens verzameld over de mate waarin de zachtrot-bacterie *Pectrobacterium brasiliense* zich tijdens de oogst verspreidt en hoe verspreiding voorkomen kan worden.



---

# Samenvatting

Pectinolytische bacteriën van de geslachten *Dickeya*- en *Pectobacterium* (soft rot Pectobacteriaceae, SRP's), veroorzaken in Nederland grote schade in land- en tuinbouwgewassen (geschatte schade 20-30 MEuro/jaar in pootaardappelteelt). Er is geen resistentie (immuniteit) tegen SRP's bekend in commerciële rassen en er zijn geen bestrijdingsmiddelen beschikbaar. Beheersing is dus geheel afhankelijk van hygiëne en teeltmaatregelen. Verspreiding van de ziekteverwekker binnen een pootgoedpartij en ook tussen partijen lijkt vooral tijdens de machinale oogst plaats te vinden. In dit project zijn kwantitatieve gegevens verzameld over de mate waarin de bacterie zich tijdens de oogst verspreidt en ook hoe verspreiding voorkomen kan worden.

In 2020 en 2021 zijn veldproeven gedaan naar de verspreiding van SRP tijdens de oogst op zand en klei grond. De afstanden en de mate van versmering tussen de grondtypen bleek niet significant van elkaar te verschillen en plaats te vinden tot 30-50 meter na de oogst van een besmette knol. De hoeveelheden overgedragen bacteriën zijn het hoogst naar knollen rondom de geoogste besmette knol, wat ook knollen betreft die geoogst werden in dezelfde kratten. Afharding van de knollen had geen gemeten significant effect op besmettingshoeveelheid of -afstand, al kan dat deels te niet gedaan zijn door de nattere weer- en veldcondities eind november/december tijdens de herhaling van het experiment op zand.

Verder werd onderzocht hoe lang de bacteriën (planktonisch en in biofilms) op oogstmachines kunnen overleven. Tenslotte werd het effect van wassen en het gebruik van biocide middelen onderzocht op reiniging en desinfectie van machines. Overleving van de bacterie op de oogstmachine is beperkt tot gemiddeld 1 dag en wordt verminderd door hogere omgevingstemperatuur, verminderde waterbeschikbaarheid en gebruik van ontsmettingsmiddelen. Deze resultaten kunnen door telers gebruikt worden voor een risico-inschatting. Zij kunnen de informatie gebruiken om kosten/baten analyses te maken m.b.t. het verwijderen van rotte knollen tijdens de oogst en het reinigen en desinfecteren van machines tussen de oogst van verschillende partijen.





---

# 1 Inleiding

Pectinolytische bacteriën van de geslachten *Dickeya* en *Pectobacterium* (soft rot Pectobacteriaceae, SRP's), veroorzaken in Nederland grote schade in land- en tuinbouwgewassen (circa 20-30 MEuro/jaar in pootaardappelteelt). Er is geen resistentie (immunitet) tegen SRP's bekend in commerciële rassen en er zijn geen bestrijdingsmiddelen beschikbaar. Beheersing is daarom geheel afhankelijk van hygiëne en teeltmaatregelen. Verspreiding van de ziekteverwekker binnen een pootgoedpartij en ook tussen partijen lijkt vooral tijdens de machinale oogst plaats te vinden. In dit project worden kwantitatieve gegevens verzameld over de mate waarin de bacterie zich tijdens de oogst verspreidt en ook hoe verspreiding voorkomen kan worden.

## 1.1 Achtergrond

### **De ziekte**

Zwartbenigheid en stengelnatrot in een aardappelgewas en zachtrot tijdens de bewaring van aardappelknollen worden veroorzaakt door bacteriën binnen de geslachten *Dickeya* en *Pectobacterium*. Voor 1992 werden deze bacteriën ingedeeld in het geslacht *Erwinia*. (Czajkowski et al 2011). In dit voorstel wordt deze pectinolytische bacteriën aangeduid met de afkorting SRP's, soft rot *Pectobacteriaceae*.

De ziekte zwartbenigheid in het veld kenmerkt zich vooral door verwelking van planten en een zwartgekleurde natrot aan de stengelbasis. De meeste symptomatische planten hebben een rotte moederknol. Pootgoedpartijen worden tijdens elk groeiseizoen door keurmeesters twee- of driemaal beoordeeld op het voorkomen van bacteriezieke planten. Voor de hogere pootgoedklassen geldt een nul tolerantie. De schade die SRP's jaarlijks in Nederland veroorzaken, vooral door afkeuringen en klasse verlagingen, wordt geschat op 20-30 miljoen Euro (Prins and Breukers 2008).

Bacterieziekten veroorzaakt door SRP's worden door pootgoedtelers gevreesd. Ze duiken onverwacht op, er zijn geen bestrijdingsmiddelen beschikbaar en er is geen resistentie in commerciële rassen aanwezig. De telers zijn volledig aangewezen op gebruik van schoon uitgangsmateriaal, bedrijfshygiëne en op teeltmaatregelen. De bacterie wordt via het pootgoed doorgegeven. Versmering binnen en tussen partijen vindt plaats vooral tijdens oogst werkzaamheden. Het is onduidelijk hoe tijdens het eerste groeiseizoen een gewas uit miniknollen al geïnfecteerd raakt, omdat contactinfecties tussen partijen tijdens teelthandelingen worden vermeden.

### ***Pectobacterium brasiliense***

*Pectobacterium brasiliense* is een van de bacteriën die zwartbenigheid en zachtrot in aardappel kan veroorzaken en die daarnaast verschillende groente- en siergewassen kan infecteren. De eerste rapporten over deze bacterie dateren uit 2004 over besmettingen in Brazilië (El-Tassa en Durate, 2004; Duarte et al., 2004). In 2012 werd de bacterie voor het eerst in Europa (België) waargenomen (van der Wolf et al., 2017) en sindsdien is het pathogeen in tal van landen in Europa, Azië, Afrika en Noord- en Zuid-Amerika waargenomen. Ook in Nederland is deze bacterie uitgegroeid tot een belangrijk probleem. *P. brasiliense* is niet alleen aangepast aan een brede temperatuurrange maar kent ook een brede waardplantenreeks (Meng et al., 2017; van der Wolf et al., 2017). De symptomen zoals deze worden veroorzaakt door *P. brasiliense* wijken echter niet af van die van andere SRPs, waardoor de soort niet te onderscheiden is van de andere SRPs is op grond van zijn symptomen in veld of laboratorium.

### **Problemen van teelt tot opslag**

Het risico op besmetting van knollen tijdens de oogst zal naar verwachting afhangen van de zwaarte van de infectiebron, de mate van contact met de infectiebron, de mate waarin de schil ontwikkeld is en de aanwezigheid van wonden. In hoeverre de infecties zullen leiden tot zachtrot tijdens de bewaring of zwartbenigheid in het veld zal ook afhangen van de bewaarcondities van de besmette knollen.

---

In de aardappelteelt wordt veelal gestart met miniknollen afkomstig van *in vitro* planten die vrij zijn van ziekteverwekkers. Echter, al tijdens de groei van een gewas uit miniknollen treden de eerste (symptoomloze) besmettingen op in de moederknollen. De opbouw van de bacteriepopulaties en verspreiding van de ziekteverwekker vinden vooral plaats wanneer (moeder)knollen gaan rotten. Met name tijdens de oogst is het risico op versmering (verspreiding van rottend, geïnfecteerd aardappelmateriaal) groot.

Rotte knollen kunnen ook micro-organismen bevatten die antagonistisch werken tegen SRP's, ook knollen die met SRP's geïnfecteerd zijn. (Van der Wolf, Wageningen, ongepubliceerde resultaten). Tijdens de oogst kunnen deze zich ook verspreiden in een partij of tussen partijen. Hoe groot dit effect is, is onbekend en wordt niet in dit project bepaald.

In Nederlands onderzoek is vastgesteld dat één rotte knol die over een oogstmachine gaat, knollen van planten na 80 meter in de rij nog kan infecteren (mededeling T. Douma, Agrico). Goede reiniging en desinfectie van sorteerdere elimineerden de risico's op verspreiding van SRP's (Elphinstone and Perombelon 1986). Er zijn gevoelige methoden beschikbaar voor detectie van SRP's, gebaseerd op microbiële verrijking en moleculaire (TaqMan) assays (zie §1.2).

Er is vastgesteld dat tijdens sortering één rotte knol 100 kg pootgoed kan besmetten, waarvan ongeveer de helft met hoge dichtheden van  $10^4 - 10^5$  cellen per knol (Elphinstone and Perombelon 1986). De mate van besmetting tijdens sortering is afhankelijk van de mate waarin de knollen zijn afgehard (Scholey et al 1968). Ook is vastgesteld dat de overleving van SRP's op knollen gecontamineerd tijdens sortering, tijdens bewaring bij lage temperaturen, afhankelijk was van de mate waarin knollen beschadigd waren, hetgeen direct gerelateerd was aan de afstelling van de mechanische sorteerdere (Elphinstone and Perombelon 1986).

Infecties van knollen bevinden zich vooral in de schil, waarbij de bacteriën vaak voorkomen in het stoloneinde, de lenticellen en in wonden (scheuren, kneuzingen). Er is aangetoond dat verwonding van knollen tijdens handelingen van een partij in aanwezigheid van rotte knollen leidt tot zwaardere besmetting (kolonie vormende eenheden (kve)/knol) (Elphinstone and Perombelon 1986). De gemiddelde aantallen direct na de sortering verschilden niet tussen knollen met en zonder verwonding, maar tijdens de bewaring overleefden de bacteriën in wonden veel beter dan op de schil. Sorteerdere verschilden sterk in de mate waarin beschadiging van knollen optrad. Verder werd aangetoond dat cultivars sterk kunnen verschillen in de mate waarin beschadigingen optreden.

Een belangrijke factor lijkt ook de mate van afharding. Knollen die vier dagen na de oogst gecontamineerd werden bleken veel gevoeliger voor zachtrot dan knollen die acht weken waren bewaard (Scholey et al 1968).

Desinfectie van machines zal besmetting tussen partijen tijdens de oogst kunnen voorkomen. Dit is reeds aangetoond voor sorteermachines (Elphinstone and Perombelon 1986). Voor ander gewassen is gevonden dat desinfectie alleen effectief is als machines eerst worden gewassen en daarna behandeld met een desinfecterend middel (Kastelein et al 2018). Ontsmetting van knollen zal ook de infectiedruk kunnen verlagen zoals is aangetoond voor knollen besproeid met het bactericide CGA78039 of behandeling met chlorine (Czajkowski et al 2013, Elphinstone and Perombelon 1986). Knolbehandelingen maken echter geen deel uit van dit onderzoek.

### **Problemen in Nederland**

De miniknollen zijn in principe vrij van ziekteverwekkers, maar het gewas dat groeit uit miniknollen kan al besmet zijn met SRP's (informatie NAO). In het 'Deltaplan Erwinia 2.0' (2013-2017) werden daarom minimoederknollen tijdens de eerste veldgeneratie aan het einde van het groeiseizoen opgegraven en onderzocht op besmettingen met SRP's. Al in ca. 20% van de 26 onderzochte partijen werden besmettingen gevonden. Het besmettingsniveau verschilde per partij, maar was gemiddeld 0.5% van de onderzochte minimoederknollen. In de latere veldgeneraties was een groot deel (ca. 70%) van de dochterknollen van onderzochte partijen besmet. Er zijn verschillende infectiebronnen geïdentificeerd (machines, insecten, aerosolen, regenwater en oppervlaktewater) maar het belang van de afzonderlijke bronnen in de epidemiologie van SRP's is onbekend, mede omdat in de tijd dat het onderzoek uitgevoerd werd, betrouwbare forensische methoden ontbraken.

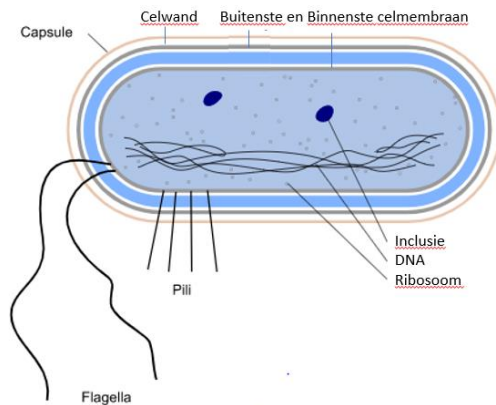
---

In een kleine survey in 2019 is bij een vijftal telers het gewas en de naoogst onderzocht op de aanwezigheid van soft rot Pectobacteriaceae (SRP= 'Erwinia's). Het gewas in het veld (100 planten per teler getest) was bij alle telers vrij van *P. brasiliense*. Echter, bij één van de vijf telers was wel de naoogst (400 knollen per teler getest) zwaar besmet met deze ziekteverwekker. Dit geeft nog eens aan dat er bij oogst en naoogst een eerstejaars stam alsnog besmet kan raken.

*Daarnaast* werden in 2019 totaal 361 rotte knollen geanalyseerd verzameld bij 9 verschillende pootgoedtelers tijdens de oogst (van de oogstmachine). De verzamelde knollen waren afkomstig van verschillende klassen pootgoed. Bij twee telers waren alle 40 rotte knollen vrij van SRP. Bij de overige 7 telers varieerden de percentages tussen de 1% en 95% besmette knollen. Een maximum van  $10^{11}$  cellen per gram rot weefsel werd gevonden. *P. brasiliense* was het meest frequent gedetecteerde pathogeen en daarna *P. parmentieri*. Het risico van verspreiding van SRP tijdens oogst is dus groot.

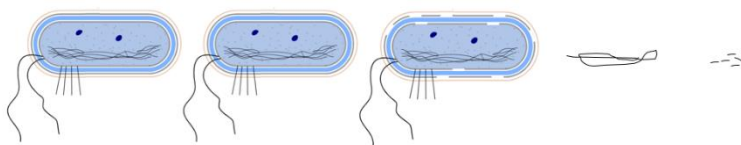
## 1.2 Diagnostiek van SRP's

SRP's zoals *P. brasiliense* behoren tot de gram negatieve bacteriën. *P. brasiliense* is een staafvormige bacterie die geen sporen vormt. De cel is omringd door zowel een celwand als een slijmlaag, die capsule wordt genoemd (figuur 1.1). De inhoud van de cel (cytoplasma) is verder beschermd door een dubbele membraanlaag. In de cel bevindt zich een nucleoid met al het DNA van de cel en ribosomen die zorgen voor de productie van eiwitten en enzymen. De cellen hebben verder een flagel en haarvormige pili die de cellen een zekere mate van mobiliteit geven in de grond of aan oppervlaktes. De cellen vermenigvuldigen zich door deling.



**Figuur 1.1** De bouw van een gramnegatieve bacterie zoals *P. brasiliense*.

Een levende, tot deling en groei in staat zijnde bacteriecel bevat een intacte celwand, celmembraan en DNA. Een verouderende, stervende cel, verliest langzaam zijn integriteit. Dat betekent allereerst het vermogen om te groeien en te delen. Als de celmembraan vervolgens permeabel wordt, kunnen celcomponenten weglekken en afgebroken worden. Zolang er grotere fragmenten DNA aanwezig zijn, is dit vaak nog detecteerbaar, totdat de fragmenten te klein worden voor detectie (Figuur 1.2).



Detectie op	A	B	C	D	E	Detectiemethode
Groei	+	-	-	-	-	Crystal Violet Medium
Celintegriteit	+	+	-	-	-	Flowcytometrie
DNA	+	+	+	+	-	TaqMan
Groei en DNA	+	(±)	(±)	(±)	-	Enrichment TaqMan*

**Figuur 1.2** De verouderende en stervende bacterie en mogelijkheden van detectie. Fase A, levende en delende cel. Fase B 'Viable-but-non-culturable cel', levend, maar niet meer in staat tot deling. Fase C, verlies van celintegriteit, nog gedeeltelijke bescherming van celcomponenten. Fase D, celcomponenten niet meer beschermd, maar nog wel aanwezig en detecteerbaar. Fase E, celcomponenten niet langer detecteerbaar. \* Als de Enrichment TaqMan aangeeft dat er meer cellen/DNA aanwezig zijn dan gemeten in de directe TaqMan zijn deze dus afkomstig van levende en delende cellen; is dit niet het geval kunnen cellen/DNA uit stadia B-D aanwezig zijn

De traditionele wijze om SRP bacteriën vast te stellen is via het uitplaten van materialen. Hiervoor kan gebruik gemaakt worden van het semi-selectieve medium Crystal Violet Pectate gebruikt, waarin SRP's

---

kenmerkende putjes maakt (Helias et al 2012). Een nadeel van deze methode is dat niet direct duidelijk is welke SRP bacterie of bacteriën verantwoordelijk zijn voor de infectie en verder onderzoek aan de isolaten nodig kan zijn. Bij een hoge achtergrond aan micro-organismen worden SRP's ook op de platen overgroeid.

De meest gevoelige wijze om SRP's in plantmateriaal aan te tonen is door gebruik te maken van een combinatie van verrijking in plantmateriaal en/of een vloeibaar medium en een detectie met een DNA-amplificatiemethode (TaqMan assay). Hiermee kunnen zeer lage dichtheden SRP's (ca. 100 cfu/g) worden aangetoond. Zonder een verrijkingsstap kunnen met een TaqMan assay ca. 10<sup>4</sup> cellen/g worden aangetoond. Door de TaqMan resultaten voor en na verrijking te vergelijken kunnen lagere hoeveelheden originele bacteriën gemeten worden én kan worden vastgesteld of de bacteriën in leven zijn. Er zijn TaqMan assays voor verschillende SRP varianten ontwikkeld die zwartbenigheid kunnen veroorzaken (Van der Wolf *et al.*, 2021)).

Flowcytometrie is een methode waarbij onder laboratoriumomstandigheden cellen geteld kunnen worden. Door het inzetten van zogenaamde levend- en dood-specifieke kleurstoffen kunnen in mengsels gemakkelijker worden bepaald hoe veel van de cellen nog intact zijn en hoeveel cellen stervende zijn. Flowcytometrie vergemakkelijkt bijvoorbeeld overlevingsexperimenten omdat grotere hoeveelheden monsters in kortere tijd kunnen worden verwerkt.

## 1.3 Het onderzoek

Dit onderzoek vindt plaats om goede, kwantitatieve, gegevens over risico's op versmering tijdens de oogst te genereren. Kennis over de verspreiding van de bacterie tijdens de oogst binnen en tussen partijen is van groot belang, omdat de mate waarin verspreiding en infectie plaatsvindt, in hoge mate bepaalt waar de focus moet liggen in een strategie om bacterieziekten te beheersen. Ook wordt er in dit onderzoek gekeken naar thans ontbrekende methodes om versmering tijdens de oogst te voorkomen of te elimineren.

In dit project werd onderzoek gedaan naar het risico op overdracht van SRP's tijdens de oogst vanuit besmette (rottende) knollen naar knollen die vrij zijn van de ziekteverwekker. Er werd geïnventariseerd hoe machines effectief kunnen worden ontsmet. Daarbij was het doel de volgende vragen te beantwoorden.

- Hoe vaak leidt overdracht daadwerkelijk tot infectie van knollen (die kunnen resulteren in bacteriezieke planten)?
- Hoe lang blijven bacteriën als planktonische (losse) cellen en in een biofilm (slijm laag) op het oppervlak van de knol in leven?
- Welk risico speelt verwonding bij het ontstaan van knolinfecties? In principe kan de knol ook via natuurlijke openingen (lenticellen) besmet raken.
- Wat is de beste manier om machines te ontsmetten?
- Wat is het risico op overleving van SRP's, ook bij reiniging en ontsmetting van oogstmachines?

De mate van versmering van de knollen wordt bepaald door individuele knollen en monsters van samengestelde knollen te wassen en het waswater te analyseren m.b.v. een kwantitatieve toets (TaqMan-assay) en een gevoelige kwalitatieve assay (enrichment TaqMan). Hiermee worden uitwendige besmettingen in kaart gebracht. Daarna worden de knollen uitwendig ontsmet en wordt de hele schil geëxtraheerd en geanalyseerd. Hiermee worden inwendige besmettingen aangetoond die kunnen leiden tot bacteriezieke planten. Waar nodig worden monsters ook geanalyseerd d.m.v. uitplaatmethoden waarbij gebruik wordt gemaakt van het semi-selectieve medium Crystal Violet Pectate. Dit onderdeel is in september 2020 uitgevoerd op zandgrond en in werd in een onafhankelijk experiment herhaald in december 2020. In 2021 is dit onderdeel opnieuw uitgevoerd, maar dan op kleigrond (Hoofdstuk 2).

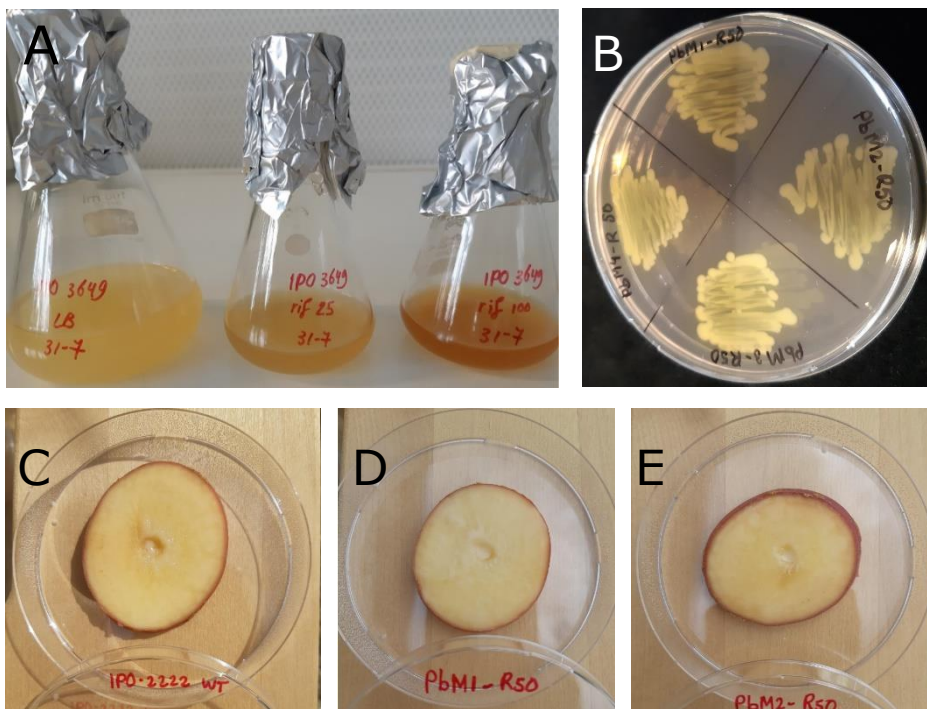
De overlevings- en ontsmettingsexperimenten op de rooimachine zelf en onder gecontroleerde onder laboratorium-omstandigheden zijn uitgevoerd respectievelijk in 2020 en 2021. Ook deze monsters zijn geanalyseerd d.m.v. uitplaatmethoden waarbij gebruik wordt gemaakt van het semi-selectieve medium Crystal Violet Pectate en (enrichment) TaqMan als ook geanalyseerd via flowcytometrie (Hoofdstuk 3).

## 2 Versmering tijdens de oogst

### 2.1 Merkerstam *P. brasiliense*

Om onderscheid te kunnen maken tussen van nature aanwezige SRP bacteriën in gronden en aardappels en de voor het onderzoek toegevoegde *P. brasiliense* pathoog, is er van *P. brasiliense* stam IPO3649 een rifampicine-resistente mutant geselecteerd. Rifampicine-resistente bacteriecellen komen van nature slechts in lage aantallen in natuurlijke populaties door mutaties in het DNA-dependente RNA polymerase (*rpoA* en/of *rpoB* gen) voor. Het toevoegen van rifampicine aan selectie- en verrijkmingsmedia maakt het mogelijk specifiek het toegevoegde pathoog te volgen tijdens versmerings- en/of overlevingsexperimenten.

Spontane mutanten van *P. brasiliense* stam IPO3649 zijn opgepikt na meerdere groeirondes op vloeibaar groeimedium met oplopende concentraties rifampicine (Figuur 3.1A). Vervolgens zijn hiervan verschillende rifampicine-resistente kolonies opgepikt (Figuur 3.1B). Deze kolonies zijn vervolgens getest met een zachtrot-test op gesteriliseerde aardappelschijven (Figuur 3.1C-E). Zelfde hoeveelheden wildtype of resistente cellen zijn hiervoor aangebracht in een putje gestanst midden in de aardappelschijf. Na vier dagen is de oppervlakte bepaald met zachtrot aantasting. Mutanten met vergelijkbare pathogeniciteit als de wildtype stam zijn bewaard in de collectie en gebruikt voor de versmerings- en overlevingsonderzoeken.



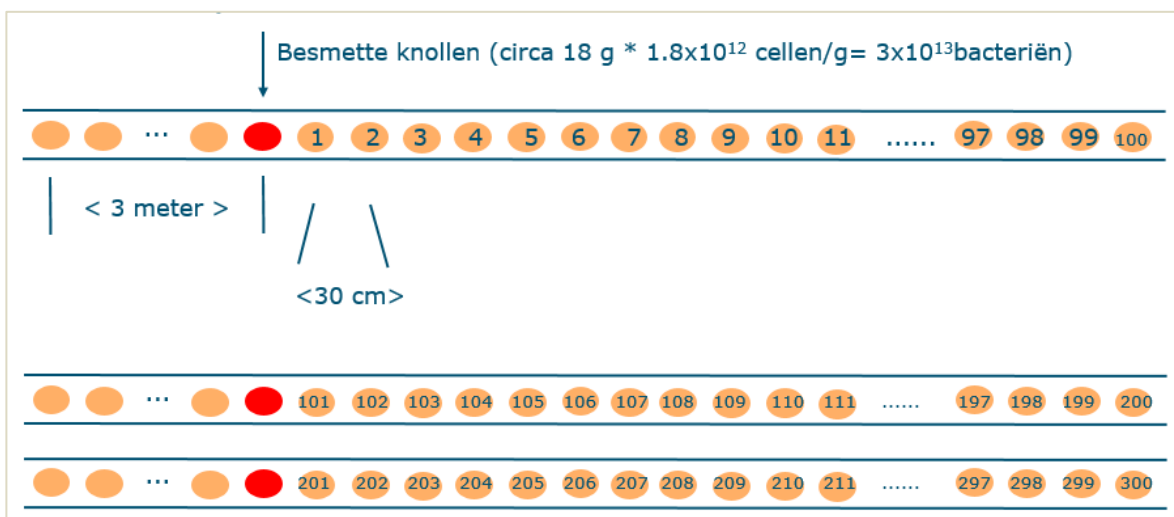
**Figuur 2.1** Selectie van rifampicine resistente mutanten van *P. brasiliense* IPO3649. A op vloeibaar selectiemedium met verschillende concentraties rifampicine. B. geselecteerde rifampicine resistente kolonies. C. zachtrot na 4 dagen incubatie met wildtype IPO3649. D en E. zachtrot verschijnselen in twee mutanten.

## 2.2 Versmering op zandgrond

Het doel van het versmerings experiment is kwantitatieve gegevens te genereren over de verspreiding van *Pectobacterium brasiliense* tijdens de oogst door een knol met zachtrot veroorzaakt door *P. brasiliense*. Om dit te bepalen op zandgrond zijn een tweetal veldproeven (22 september en 1 december 2020) met aardappelen (cv. Arizona) in verschillende stadia van afharding gedaan om de versmering van *P. brasiliense* over een oogstafstand van 30 meter te bepalen.

### Proefopzet

Op een proefveld met zandgrond aan de Droevendaalsesteeg in Wageningen, zijn verschillende ruggen neergelegd, waarin om de 30 cm genummerde aardappels zijn gepoot (Figuur 3.2). Op de positie '0' zijn gamma-gesteriliseerde aardappelen (25 kGy dosis, Steris Ede) gepoot met een geschatte bacterie hoeveelheid van  $3 \times 10^{13}$  rifampicine-resistente *P. brasiliense*. Alle aardappelen zijn vervolgens geoogst met een éénrijer (AMAC), waarbij de aardappels die van de oogstmachine kwamen in verschillende kratten (Bijlage 1) zijn verzameld en daarna verder gesorteerd. Alle verzamelde genummerde aardappelen zijn 1 nacht bij 4°C gezet om aanwezige levende bacteriën de kans te geven de knollen te infecteren en vervolgens geanalyseerd op besmetting.



**Figuur 2.2** Proefopzet van de versmerings\_experimenten op zand: Op drie ruggen op zandgrond aan de Droevendaalsesteeg in Wageningen zijn om de 30 centimeter aardappelen gepoot. Na drie meter (op plaats 0) is een zwaar besmette aardappel met circa  $3 \times 10^{13}$  rifampicine-resistente *P. brasiliense* bacteriën gepoot. Met een éénrijer zijn vervolgens alle aardappelen geoogst en genummerde knollen van de verschillende afstanden zijn beoordeeld op besmetting met de resistente bacterie.

Alle verzamelde, genummerde knollen zijn in het lab gewassen met 50 ml waswater, gedroogd en geschild (circa 1 mm van de schil), waarna waswatermonster en schil apart zijn geanalyseerd. De schil is vermalen en gemengd met een zelfde gewicht aan Ringer's oplossing om de bacteriën vrij te krijgen van het aardappelweefsel. Op alle was- en aardappelmonsters zijn zowel een directe TaqMan analyse gedaan (directe DNA extractie en TaqMan analyse specifiek voor *P. brasiliense* met een toegevoegde controle van de *Acidovorax cattleya* (Acat) of extractie en amplificatie gelukt zijn) als een *enrichment* TaqMan, waarbij 1 ml monster toegevoegd is aan 9 ml PEB met rifampicine (pectaat/aardappel verrijgings-bouillon) en drie dagen gegroeid bij 25°C alvorens een TaqMan analyse is uitgevoerd. Als ijking en ter controle zijn van elke eerste 20 genummerde knollen van een rij de monsters ook in twee verdunningen op Crystal Violet Medium met rifampicine uitgeplaat en na 2 dagen op 25°C zijn alle kolonies geteld. De grens van de directe TaqMan Assay ligt hierbij naar schatting op circa 10.000 kolonievormende eenheden per gram materiaal.

Door het gebruik van directe TaqMan en TaqMan naast elkaar kan worden ingeschat of er daadwerkelijk levende cellen aanwezig zijn die tijdens de verrijking zullen toenemen in aantal en dus een sterker signaal zullen geven. Testen van Waswater én schilmonsters geeft inzicht in de vraag hoever bacteriën die tijdens de oogst op de knol terecht komen, maar ook of ze beschermd in het schilweefsel bewaring

kunnen doorstaan en in het volgende groeiseizoen voor infecties kunnen zorgen. De verschillende mogelijkheden van positieve en negatieve monsters en wat dit betekent staat uitgelegd in Tabel (3.1).

**Tabel 2.1.** Uitslag van de verschillende waswater en schilmonsters tijdens directe en enrichment TaqMan en wat dit zegt over de aanwezigheid van dode en/of levende *P. brasiliense*.

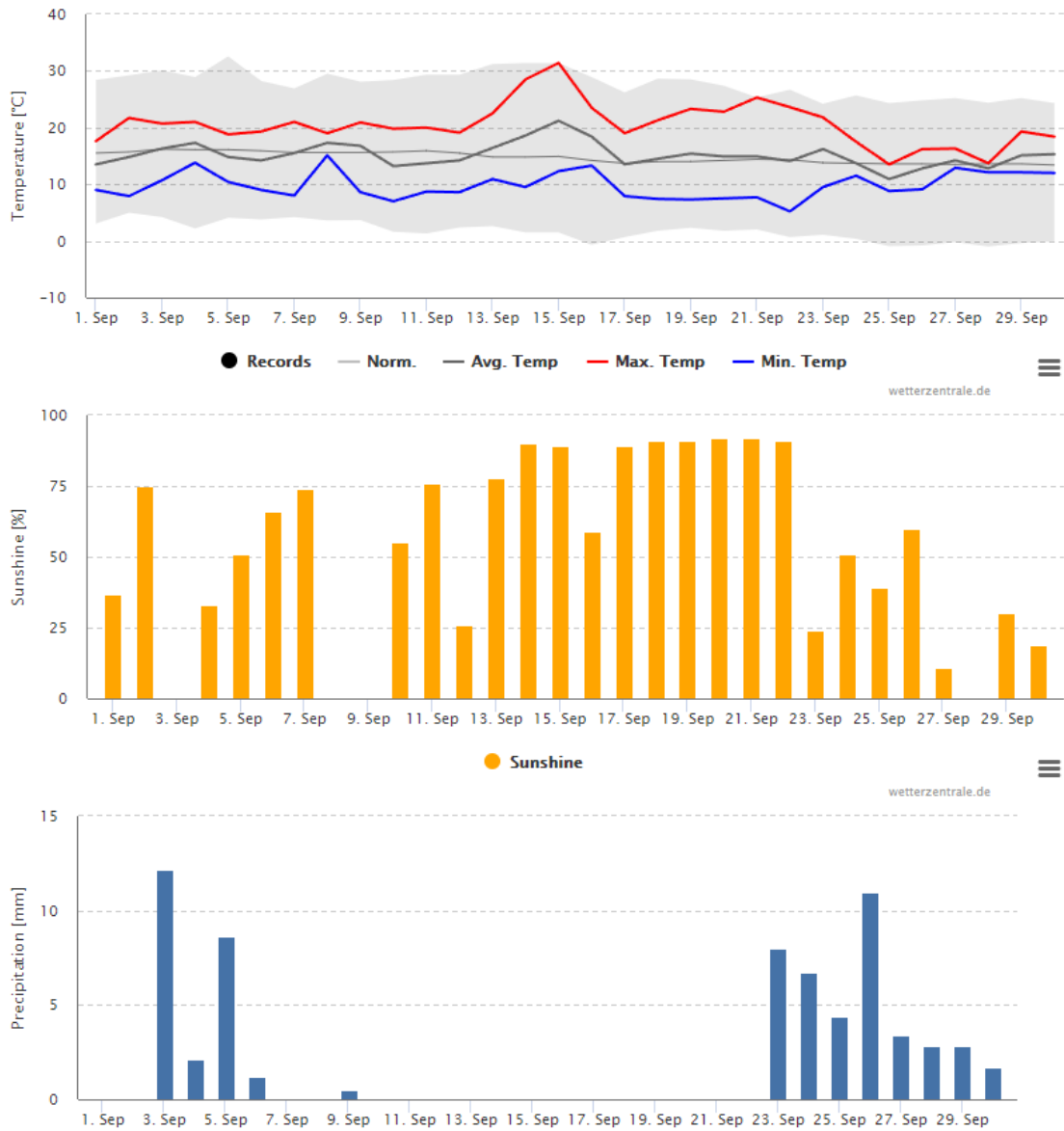
Positief monster in:				Conclusie:
Waswater		Schil		
Directe TaqMan	Enrichment TaqMan	Direct e TaqMan	Enrichment TaqMan	
-	-	-	-	Negatief: Geen <i>P. brasiliense</i>
+	-	-	-	Lage dichtheid, dode cellen in waswater, geen in de aardappel
-	+	-	-	Lage dichtheid levende cellen in waswater, geen in de aardappel
+	+	-	-	Hoge dichtheid dode/levende cellen, oppervlak
+	-	+	-	Lage dichtheid dode cellen oppervlak en schil
+	-	-	+	<b>Lage dichtheid levende cellen in schil, dode in waswater</b>
+	-	+	+	<b>Als in detectie Enrichment TaqMan meer cellen dan zonder enrichment: Hoge dichtheid levende cellen in schil; lage dichtheid, dode cellen in waswater</b>
+	+	+	-	Hoge dichtheid dode cellen in schil; dood en levend in waswater
+	+	-	+	<b>Lage dichtheid levende cellen in schil en hoge dichtheid levende/dode cellen in waswater</b>
-	+	-	+	<b>Lage dichtheid levende cellen in schil en waswater</b>
-	+	+	+	<b>Als in detectie Enrichment TaqMan meer cellen dan zonder enrichment: Hoge dichtheid levende cellen in schil en lage dichtheid in waswater</b>
-	+	+	-	Lage dichtheid levende cellen in waswater, lage dichtheid dode cellen in de schil
+	+	+	+	<b>Als in detectie Enrichment TaqMan meer cellen dan zonder enrichment: Hoge dichtheid levende cellen in schil en waswater</b>

Er is gekozen voor een bemonstering eind september 2020 en een bemonstering 2 maanden later (1 december) om de gebruikte aardappelknollen extra te laten afharden. De hypothese was dat door het afharden het risico op interne besmettingen zou afnemen. De proefopzet was in principe op beide tijdstippen gelijk. Echter door een menselijke fout is in december in één rij de besmette knol niet toegevoegd. Dat gaf ruimte om ook de monsters uitgeplant voor de besmette knol mee te nemen in de analyses.

### September 2020

*Weersomstandigheden.* In de dagen voor 22 september was het mooi, droog nazomerweer. Maximumtemperaturen tijdens de dag waren 25°C, terwijl het in de twee weken ervoor nauwelijks geregend had (Figuur 2.3). Om de grond en ruggen niet te droog te laten zijn tijdens de oogst, is er in de dagen voor de oogst licht beregend. Voor een sfeerimpressie van de oogstdag zie Figuur 2.4.



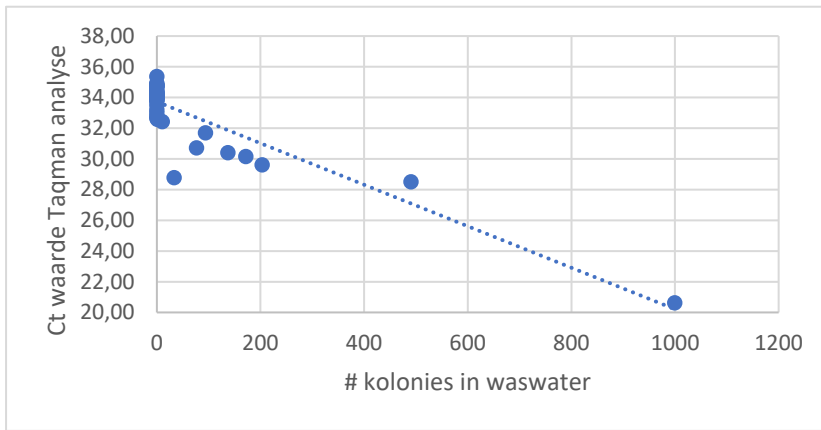


**Figuur 2.3** Minimale en maximale temperaturen, zonneschijnnuren en neerslag in september 2020



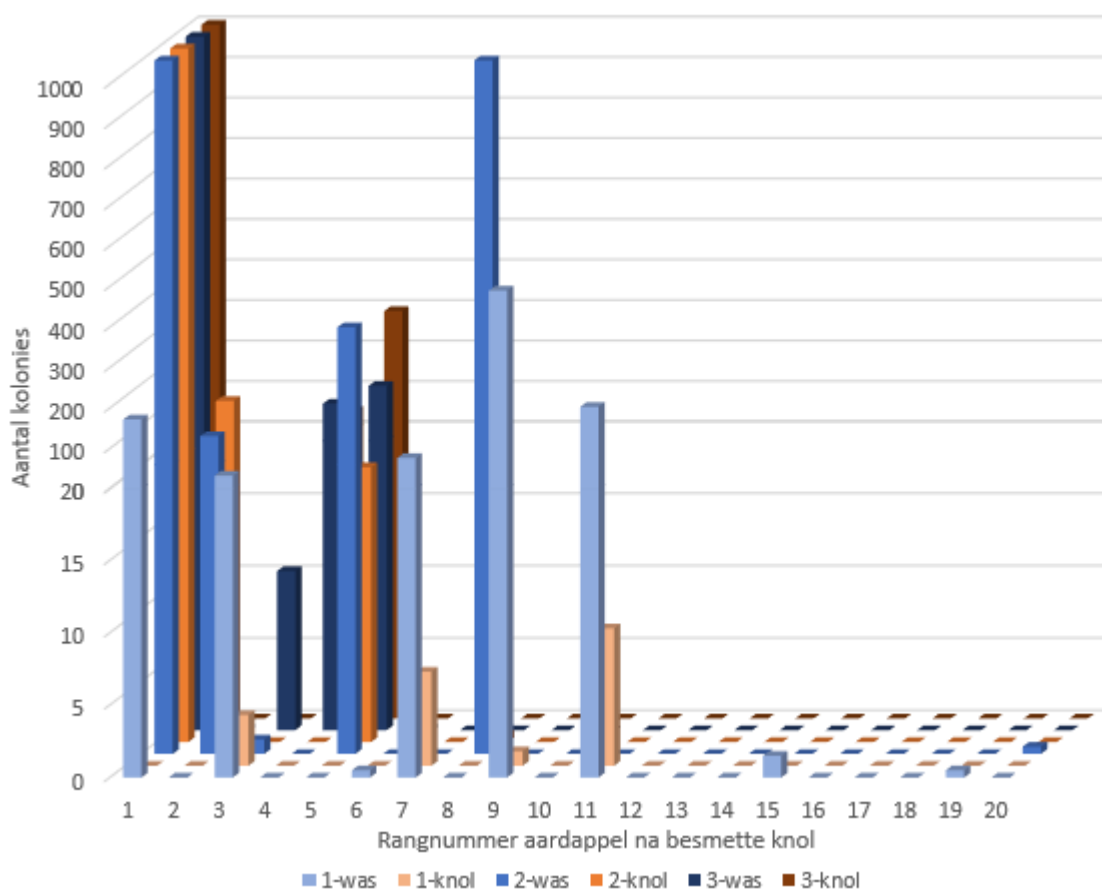
**Figuur 2.4** Sfeerimpressie versmeringsexperiment september 2020

*IJking detectiemethoden.* Om de extractiemethode en de Taqman-amplificatie te controleren werd aan alle monsters een vaste hoeveelheid van het controle organisme *Acidovorax cattleya* toegevoegd. De extractiemethode en TaqMan detectie bleken prima te werken. Om de TaqMan verder te ijken werden de TaqMan gegevens ook vergeleken met de resultaten van het direct uitplaten op selectief medium, welke een keurig verband lieten zien (bijvoorbeeld Figuur 2.5). Door het gebruik van een verrijking kunnen we echter de gevoeligheid van de TaqMan methode verhogen en hele lage besmettingsniveaus beter waarnemen.



**Figuur 2.5** Correlatie tussen de TaqMan metingen en aantallen kolonies geteld na uitplaten op Crystal Violet Medium ( $R^2=0.73$ ).

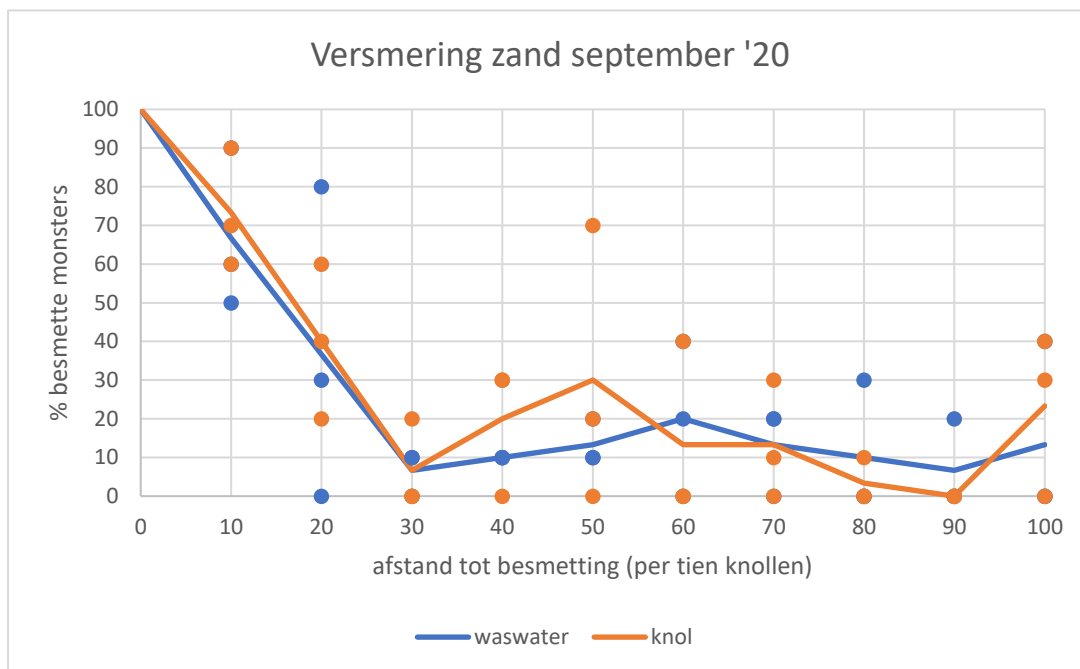
*Resultaten versmering van bacteriën-Uitplaten.* Bij het uitplaten varieerden de besmettingen in waswater en in de knol van enkele levende tot meer dan duizend cellen per monster (Figuur 2.6). Van deze eerste monsters was 30% van de waswatermonsters besmet, tegen 20% van de knollen. Dit geeft aan dat niet elke cel rondom de knol daadwerkelijk de knol weet binnen te dringen. Besmettingen van knol en waswater gaan in de meeste gevallen per locatie gelijk op.



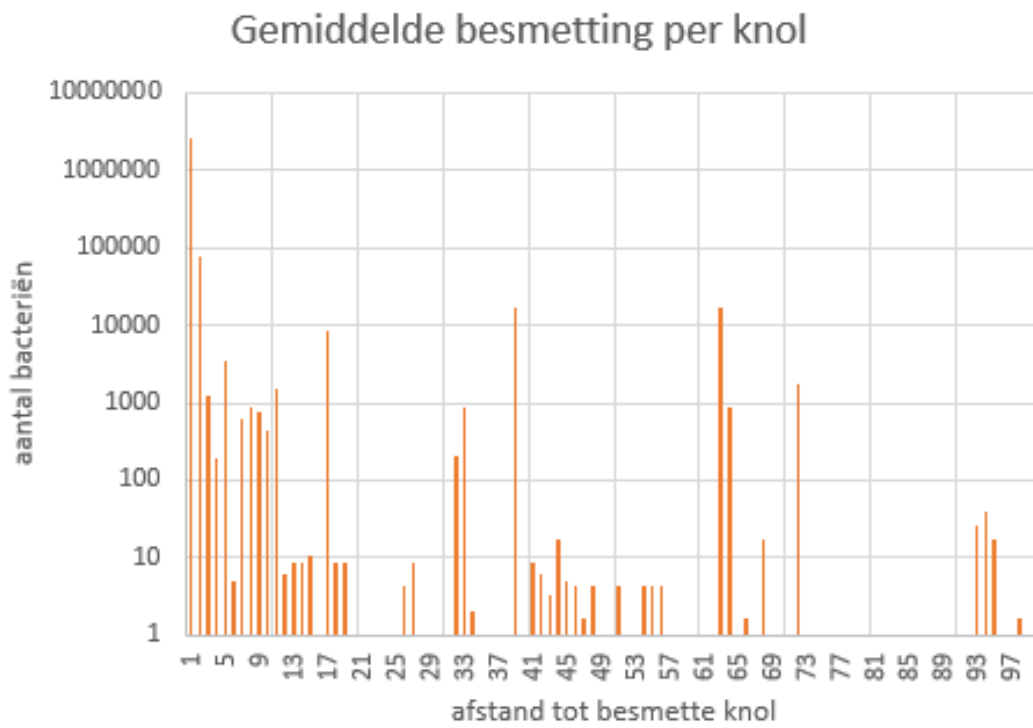
**Figuur 2.6** Aantal infecties per knol vanaf de besmette knol in drie geoogste rijen. Per bemonsterde rij zijn de aantallen bacteriën in het waswater aangegeven in blauwtinten (1-was, 2-was en 3-was), van de besmetting in de aardappelen zijn deze weergegeven in oranje-bruintinten (1-knol, 2-knol en 3-knol). Om zowel lage als hoge aantallen besmetting te tonen is gebruik gemaakt van een gestapelde y-as.

Voor onderzoek naar het voorkomen van levende bacteriën in waswater ende schil van knollen over een grotere afstand, is gebruik gemaakt van een TaqMan assay (kwantitatief) als een verrijkings-TaqMan (kwalitatief). De eerste 3 meter na een besmette knol is de kans op besmetting het hoogst en circa 70%. Na circa 10 meter is de kans op een besmetting afgenomen tot circa 20%, waarna deze nog ruime tijd tussen de 10-30% blijft schommelen. Zelfs op 30 m afstand werden nog besmette monsters gevonden.

De infectiedruk de hoeveelheid bacteriën en omgekeerd evenredig het resulterende TaqMan signaal neemt met de afstand af. In de eerste meters worden honderdduizenden cellen in waswater en knol gevonden, terwijl er aan het einde van de rij slechts enkele bacteriën in het waswater en per knol gevonden worden.



**Figuur 2.7** Kans op besmetting vanaf de besmette knol. Per tien knollen (afstand 3 meter) zijn de aantallen bacteriën in het waswater aangegeven in blauwtinten, van de besmetting in de aardappelen zijn deze weergegeven in oranje-bruintinten.



**Figuur 2.8** Gemiddelde besmetting per knol naar de afstand tot de besmette knol, meting september 2020. Grafiek op een logaritmische as.

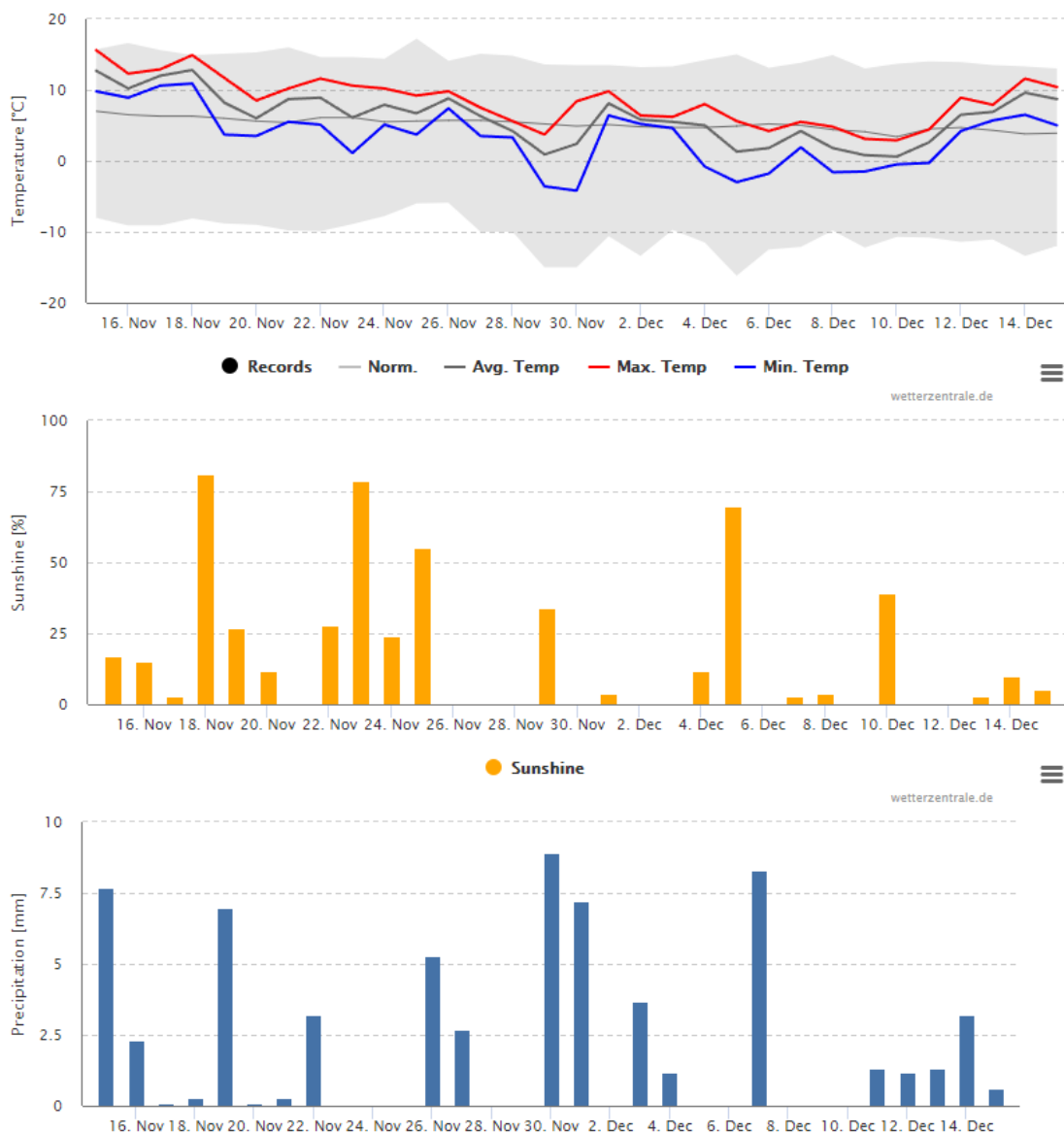
---

### *Resultaten-kisten*

Bij het oogsten tijdens de veldexperimenten met de een-rijer, zijn geoogste knollen opgevangen aan het eind van de lopende band in kratten en daarna uit gesorteerd. De zwaarste besmettingen werden in het algemeen in de eerste 10-20 knollen gevonden, die allen in dezelfde kist verzameld zijn (bijlage 1). Toch werden ook in latere kisten regelmatig knollen aangetroffen met een hoge graad van besmetting. Deze besmettingen moeten dus afkomstig zijn van besmettingen op de machine en niet van knol-knol contact binnen de kist.

## December 2020

*Weersomstandigheden.* In de dagen voor 1 december was het wisselvallig herfstweer met nattere en drogere dagen. Maximumtemperaturen tijdens de oogstdag waren zo'n 10°C (Figuur 2.8). Het veld was tijdens de oogstdag relatief nat.



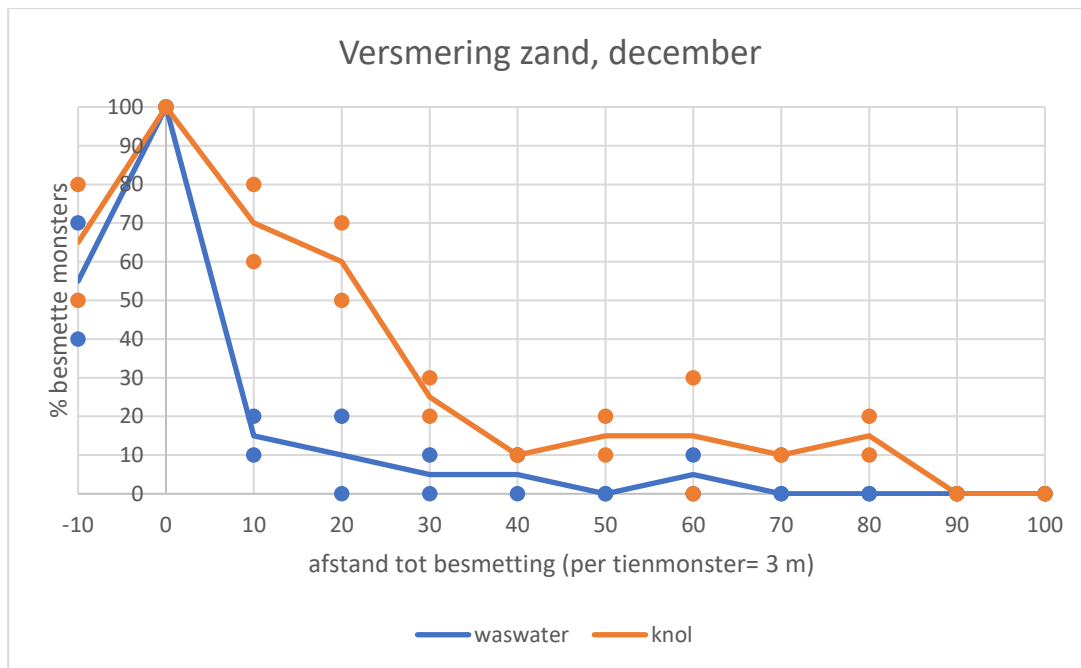
**Figuur 2.8** Minimale en maximale temperaturen, zonneshijningen en neerslag in november/december 2020.

### Resultaten

De voor de herhaling op zandgrond gebruikte knollen waren afkomstig van dezelfde partij Arizona aardappelen als voor de september-oogst en hebben in de tussenliggende periode in de opslag gelegen bij 5°C om verder af te harden. De proefopzet was vergelijkbaar met de proefopzet beschreven in figuur 2.2. Alleen is door een menselijke fout, in een van de rijen, geen besmette knol toegevoegd aan het begin van de te oogsten rij. Door de extra capaciteit die hierdoor ontstond zijn daarom ook knollen beoordeeld die net voor de rotte knol werden geoogst.

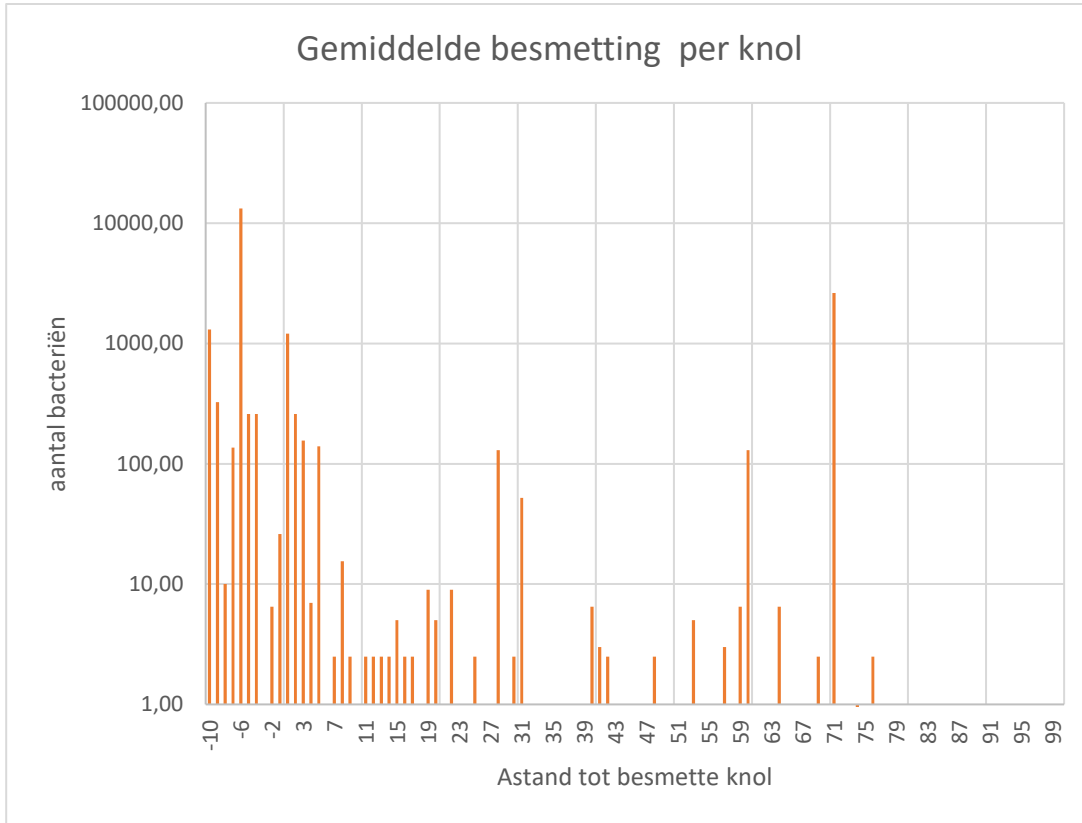
Kijkend naar de kansen op besmetting blijkt dat zowel in de meters net voordat de rotte knol geoogst wordt als direct erna, kansen op besmetting vergelijkbaar hoog zijn (Figuur 2.9). Dit zijn knollen die gezamenlijk in dezelfde krat belanden voor het uitsorteren.

Ook hier nemen met afstand vanaf de besmette knol de besmettingskansen en de hoeveelheid bacteriën in de besmetting geleidelijk af. De maximale afstand waarbij nog besmetting gemeten werd, was 24 meter. Maar als we deze afstand vergelijken waarop versmering plaats vond tussen september en december dan kunnen we niet concluderen dat deze significant minder ver is in december dan in september (t-test  $p= 0.471$ ). Ook het aantal bacteriën per besmette knol per knol verschilde niet significant tussen september en december (t-test  $p= 0.166$ ) (Figuur 2.10).



**Figuur 2.9** Kans op besmetting vanaf de besmette knol. Per tien knollen zijn de aantallen bacteriën in het waswater aangegeven in blauwtinten, van de besmetting in de aardappelen zijn deze weergegeven in oranje-bruintinten.

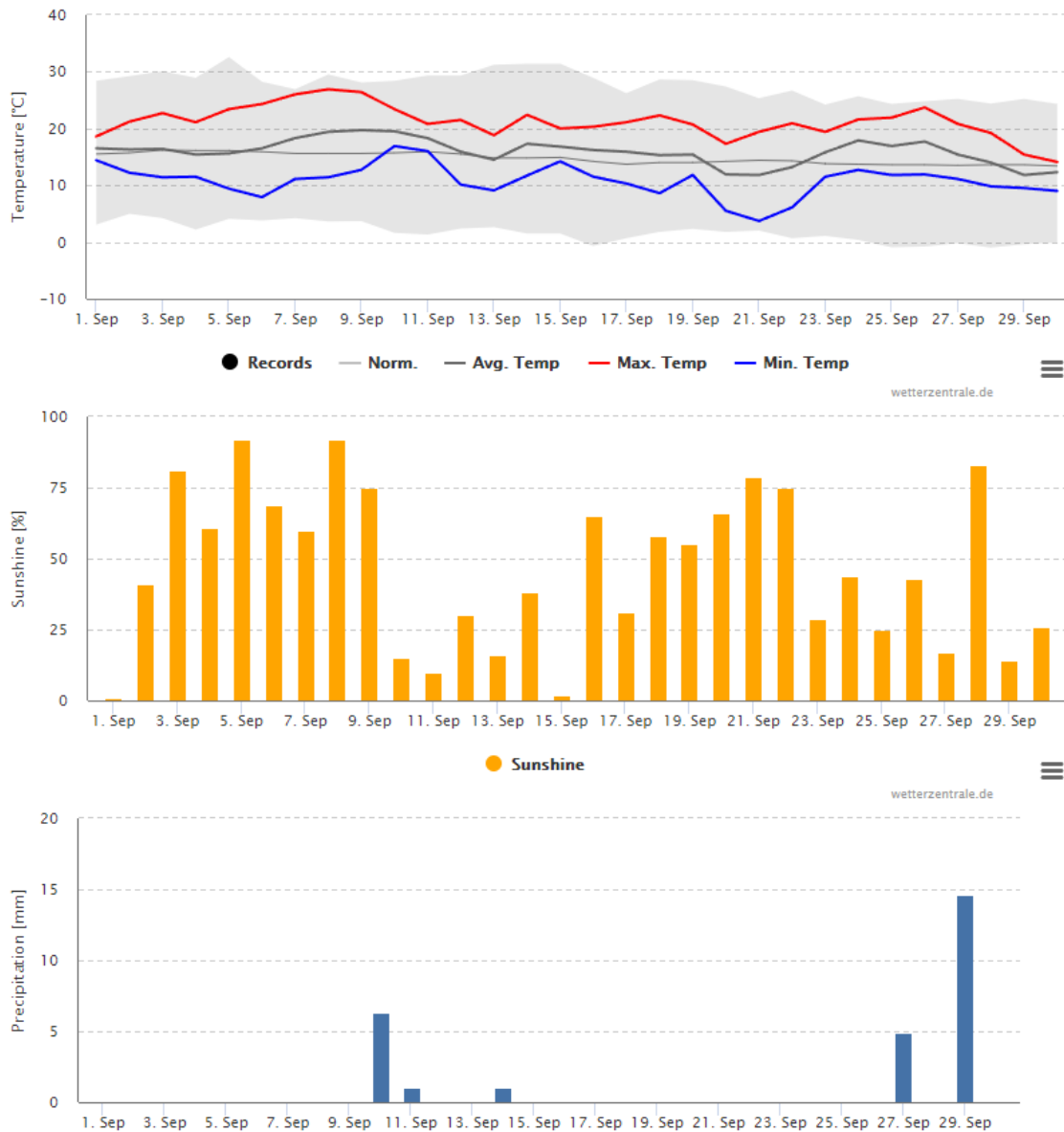




**Figuur 2.10** Gemiddelde besmetting per knol naar de afstand tot de besmette knol, meting december 2020 op een logaritmische schaal.

## 2.3 Versmering op kleigrond

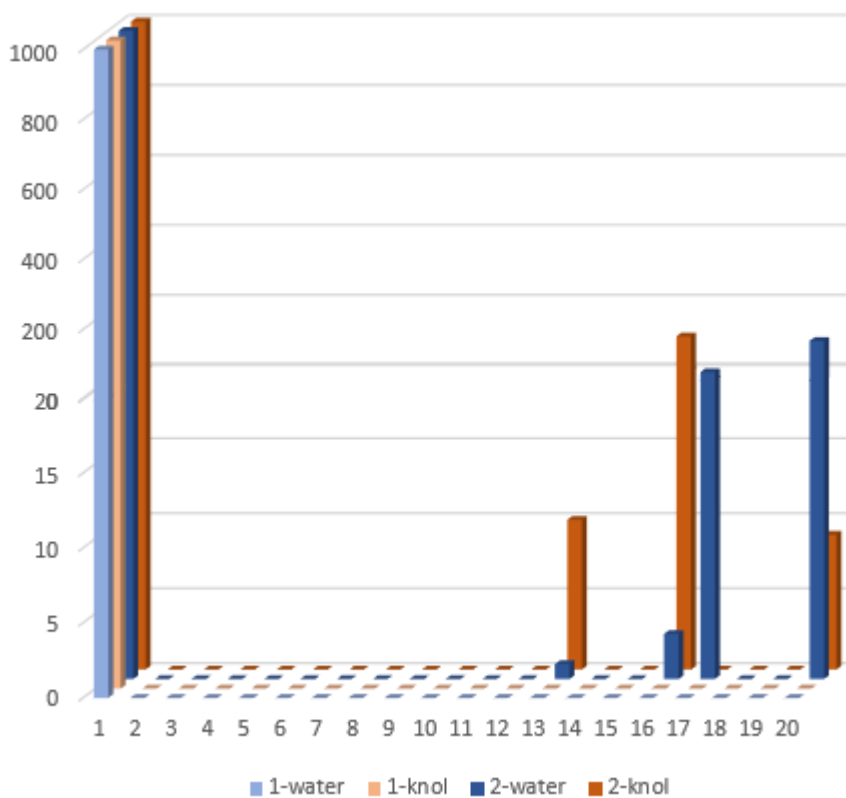
In 2021, is de septemberoogst herhaald op kleigrond, waarbij de verspreiding over een grotere afstand is gevolgd dan in 2021. De oogst is verdeeld over twee dagen, 20 en 22 september. Net als in 2020 viel de oogst in een relatief droge periode (Figuur 2.11).



**Figuur 2.11** Minimale en maximale temperaturen, zonnenschijningen en neerslag in september 2021.

### Resultaten versmering van bacteriën-Uitplaten.

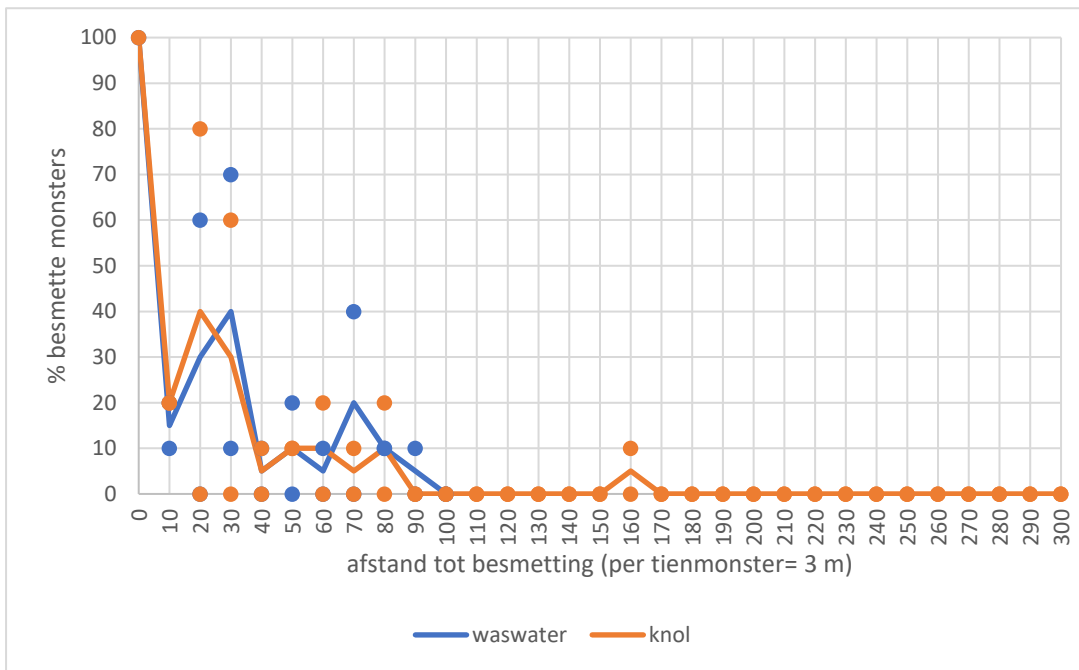
Bij beide herhalingen (rijen) op kleigrond was het percentage besmette knollen gemeten na het oogsten van een geïnfecteerde knol met behulp van een uitplaatmethode relatief laag. Daarnaast waren ook de aantallen kolonies per knol relatief laag (Figuur 2.12). De gemiddelde aantallen waren lager dan die tijdens de veldproeven op zandgrond.



**Figuur 2.12** Aantal infecties per knol vanaf de besmette knol. Per bemonsterde rij zijn de aantallen bacteriën in het waswater aangegeven in blauwtinten, van de besmetting in de aardappelen zijn deze weergegeven in oranje-bruintinten. Om zowel lage als hoge aantallen besmetting te tonen is gebruik gemaakt van een gestapelde y-as. September 2022, kleigrond.

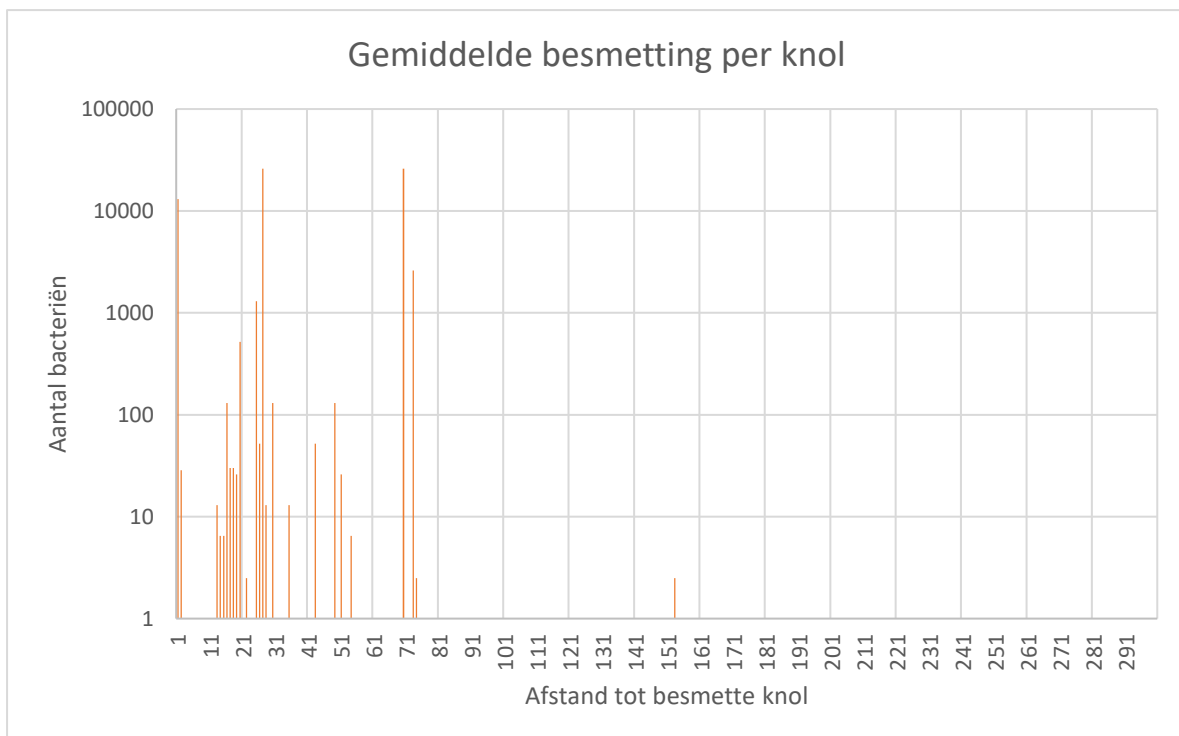
### Resultaten versmering van bacteriën-TaqMan en Enrichment TaqMan

Kijken we naar de eerste 30 meter na de besmette knol en vergelijken we de september 2020 meting op zandgrond met die op kleigrond in 2021, dan blijken de kansen op besmettingen in beide gronden niet significant van elkaar te verschillen (t-test,  $p=0.092$ ) (Figuur 2.13). Tussen de 15 en 30 meter is er een kans van 10-20% dat een knol besmet raakt. Na 30 meter raakte er slechts één knol, bij 54 meter, in de eerste geogoste rij besmet. Ook de zwaarte van de besmetting gemeten als aantal bacteriën per knol blijkt niet significant van elkaar te verschillen tussen de zand- en kleigrond (t-test,  $p=0.173$ ).



**Figuur 2.13** Kans op besmetting vanaf de besmette knol. Per tien knollen zijn de aantallen bacteriën in het waswater aangegeven in blauwtinten, van de besmetting in de knollen zijn deze weergegeven in oranje-bruintinten. September 2022, kleigrond.

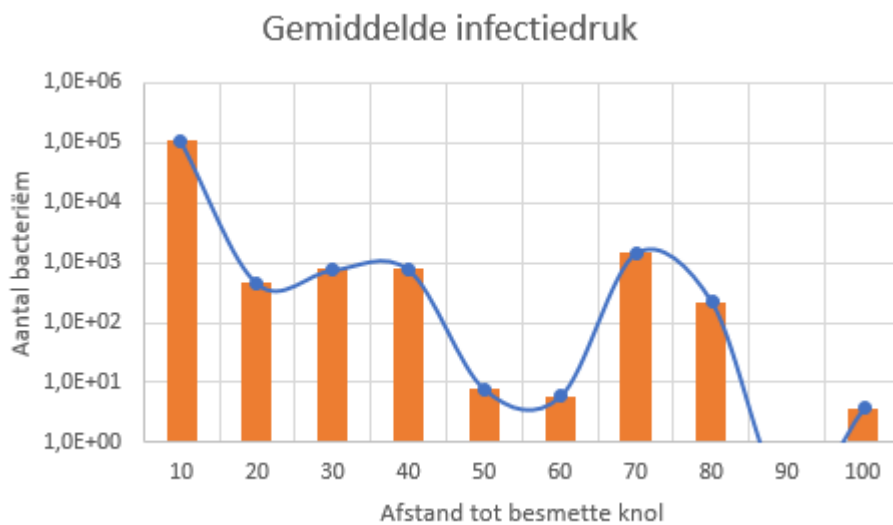
Metend met de (enrichment) TaqMan werden, waarbij de directe TaqMan gebruikt wordt ter kwantificatie en de enrichment om te checken voor levend materiaal, werd er nog wel regelmatig knollen met een relatief hoge besmetting waargenomen tot een 20-25 m na de besmette knol toe (Figuur 2.14).



**Figuur 2.14** Gemiddelde besmetting per knol naar de afstand tot de besmette knol, meting september 2020 in kleigrond, op een logaritmische y-as.

## 2.4 Gemiddelde versmering

Omdat de verschillende versmeringsexperimenten op zand- en kleigrond niet significant van elkaar blijken te verschillen, kunnen we alle data gebruiken voor het bepalen van een gemiddelde infectiedruk per knol (Fig 2.15). De gemiddelde besmetting is het hoogst in de eerst geoogste 3 meter (10 gesimuleerde planten) na de oogst als ongeveer 100.000 bacteriën per knol als besmetting terecht komen. Dit zijn knollen die ook het vaakst met elkaar in eenzelfde krat worden geoogst. Daarna fluctueren de besmettingen tussen de circa 1000 bacteriën per knol en 0-10 bacteriën in wat samen lijkt te hangen met de rotaties van de lopende band van de oogst machine (Fig 2.15). Na meer dan 30 meter van een zwaar besmette geoogste knol komen infecties nog slechts zelden voor en gaat het om zeer lage aantallen van slechts enkele bacteriën.

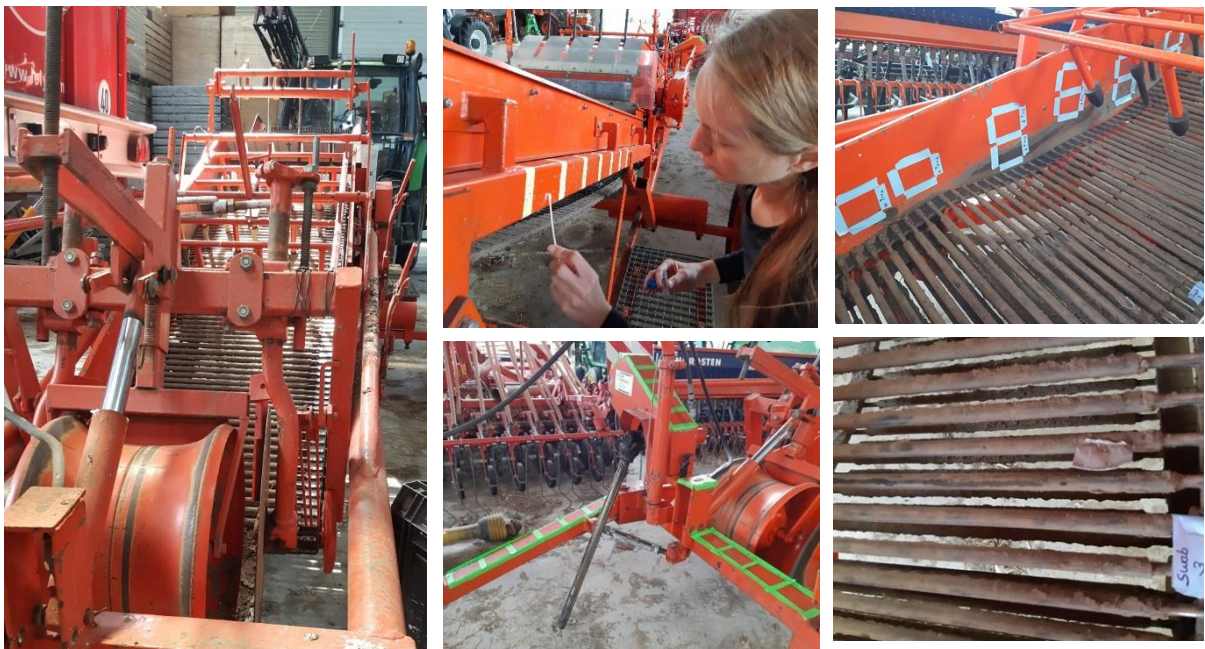


**Figuur 2.15** Gemiddelde besmetting per knol naar de afstand tot de besmette knol voor zowel klei- als zandgrond, op een logaritmische y-as.

# 3 Overleving en ontsmetting van *P. brasiliense*

## 3.1 Overleving op de machine

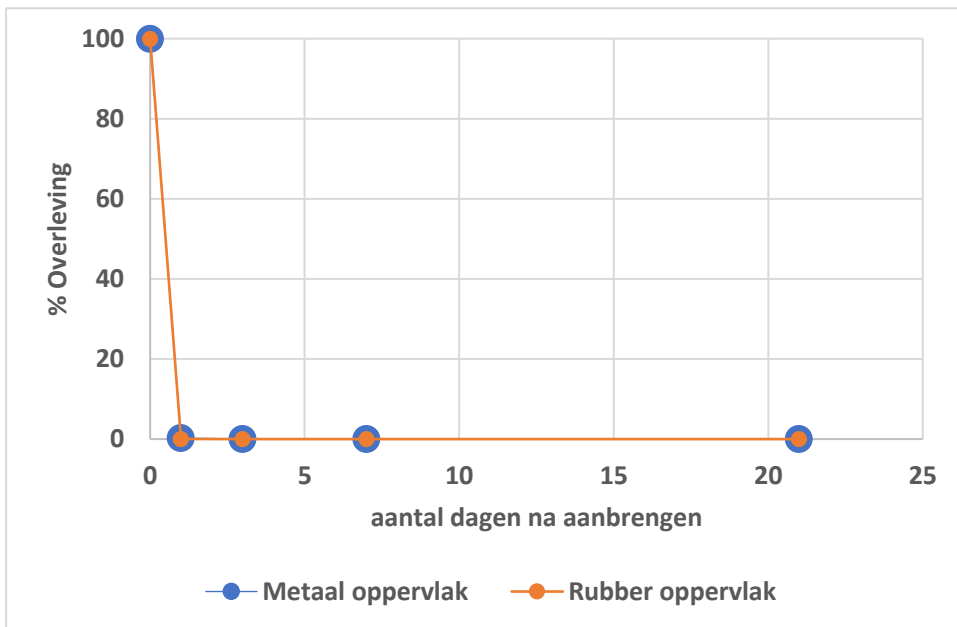
De overleving van de rifampicine-resistente bacterie op de machine werd vastgesteld op een ingeschuurde machine die niet schoongemaakt was in de periode tot maximaal 2 maanden na de oogst van symptomatische knollen, tijdens de veldproeven in september 2020 (Figuur 3.1). Daarnaast werd op een deel van de machine extra inoculum aangebracht in de vorm van planktonische cellen (een celsuspensie) of cellen in een biofilm (gegroeid in gamma-gesteriliseerde knollen).



**Figuur 3.1** De rooimachine en het monstern van 70 cm<sup>2</sup> grote oppervlaktes op metalen of rubberen ondergrond van de machine.

Per tijdstip werden er 10 veegmonsters genomen van de natuurlijk besmette oppervlaktes (70 cm<sup>2</sup>) van metaal én van rubberen ondergrond afzonderlijk en drie van de extra geïnoculeerde oppervlaktes, eveneens van metaal én van rubberen ondergrond afzonderlijk. Elk monstertijdstip werden nieuwe vakken bemonsterd. Analyse van deze monsters vond plaats met een kwantitatieve TaqMan assay, een kwalitatieve enrichment-TaqMan assay en door middel van de uitplaatmethode waarbij gebruik wordt gemaakt van het semi-selectieve medium Crystal Violet Pectate, waarin *Pectobacterium* kenmerkende putjes maakt (Helias et al 2012). Monsterning was gepland op 0, 1, 3, 7, 21 en 60 dagen na de oogst, maar nadat op dag 21 alle monsters voor de derde monsterning op rij negatief waren is de 60 dagen bemonsterning komen te vervallen.

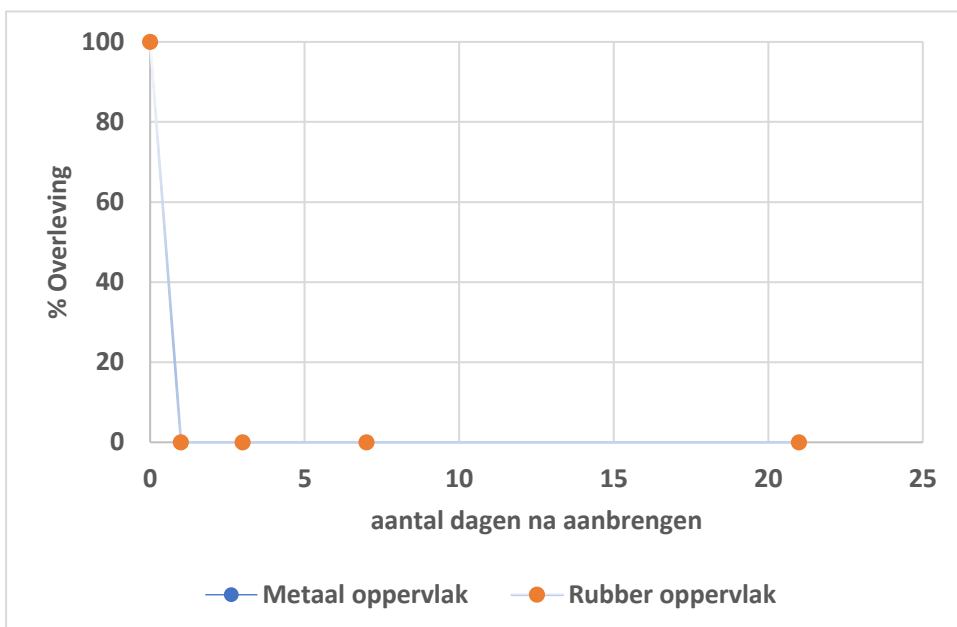
Natuurlijke besmettingen van de machine-onderdelen na het versmeringsexperiment waar 1 rotte knol voor de besmetting had gezorgd, werden niet gedetecteerd in de machine. Op geen van de tien metalen en geen van de tien rubberen oppervlaktes bemonsterd op de verschillende opeenvolgende tijdstippen konden levende *P. brasiliense* cellen worden aangetoond.



**Figuur 3.2** Overleving van planktonische *P. brasiliense* cellen op de rooimachine na inschuren: Na 1 dag konden er met behulp van uitplaten geen levende cellen meer worden aangetoond.

Bij de overlevingsexperimenten op de rooimachine met aangebrachte planktonische cellen, was er een snelle afname van de levende cellen (Figuur 3.2). Op dag 0 zijn er circa 5000 cellen per oppervlakte van 70 cm<sup>2</sup> aangebracht, een dag later was daarvan niets meer in leven.

Om biofilm-cellen te maken zijn gamma-gesteriliseerde aardappelknollen gebruikt. Inoculatie van deze knollen leverde circa  $1.8 \times 10^{12}$  cellen per gram rotte aardappelknol op. Na aanbrengen van de biofilm op de machine leverde dit meer dan 10000 cellen per monsteroppervlak van 70 cm<sup>2</sup> op. Na 1 dag waren hiervan nog slechts enkele cellen in leven. Een afdoening van 99.99% (0.01% overleving), met geen significante verschillen tussen de overleving op metaal of plastic (Figuur 3.3).



**Figuur 3.3** Overleving van *P. brasiliense* cellen on een biofilm op de rooimachine na inschuren. Na 1 dag was nog 0.1% van de cellen levend en in staat tot delen, na 3 dagen werden geen levende cellen meer aangetoond.

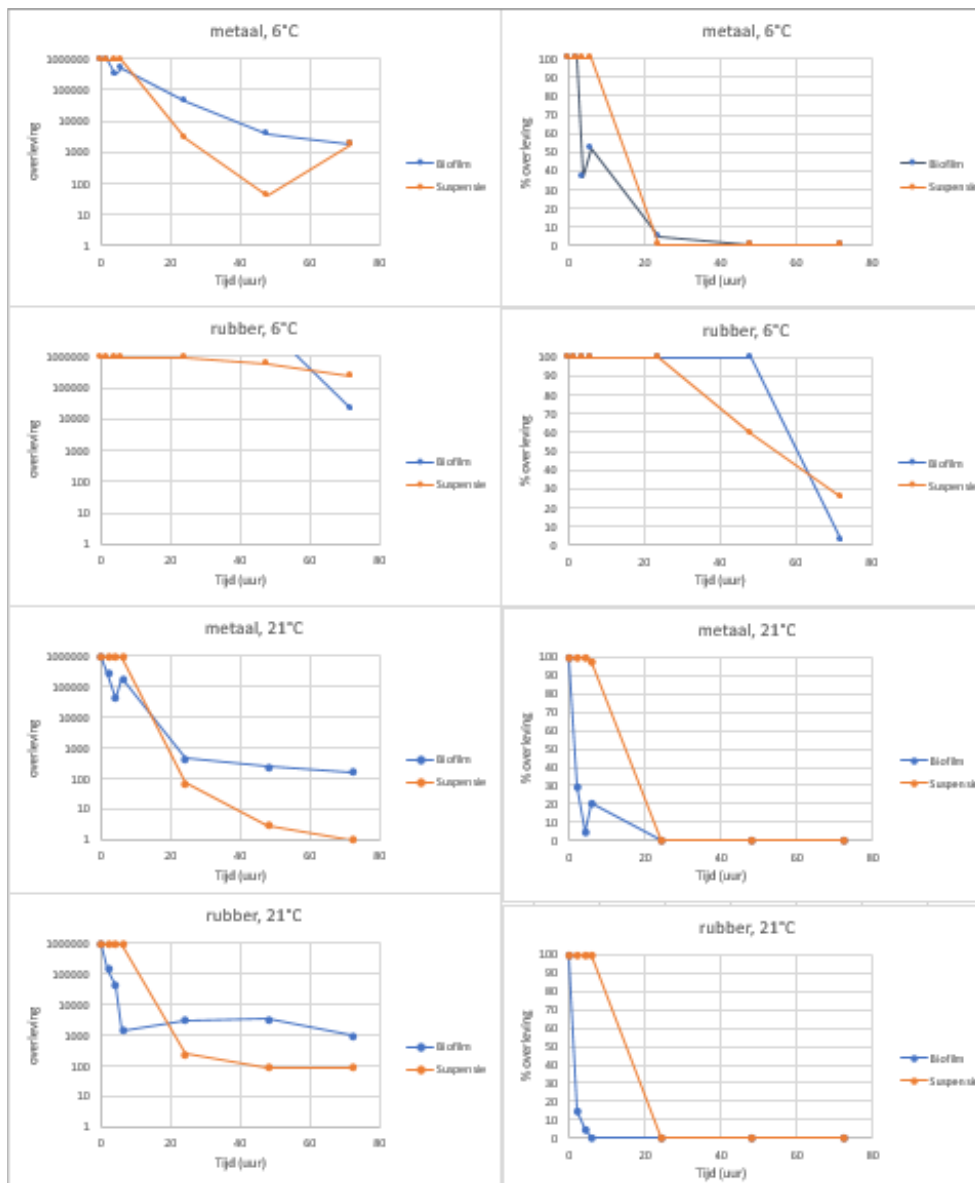
## 3.2 Effect omgevingsfactoren op overleving

Naast de overlevingsexperimenten op de roommachine, zijn er in het laboratorium afzonderlijke overlevingsexperimenten gedaan naar de effecten van verschillende omgevingsfactoren op de overleving van planktonische cellen en biofilm cellen van *P. brasiliense*. Deze experimenten zijn uitgevoerd in 2-of drievoud en monsters zijn genomen over verloop van enkele uren of maximaal dagen. De analyses zijn gedaan via het uitplaten van de monsters op Crystal Violet Medium (CVP) en een combinatie van kwantitatieve TaqMan assay en een kwalitatieve enrichment-TaqMan assay dan wel via flowcytometrie met behulp van levend & dood kleuringen. In dit verslag zijn de gegevens van het uitplaten op CVP meegenomen: deze zijn vergelijkbaar met de TaqMan Assays, terwijl de flowcytometrie een vertraging laat zien van het afsterven omdat er vaak nog enige tijd intacte, maar niet meer delende, cellen kunnen worden waargenomen.

### Cellen in suspensie versus cellen in aardappelrot

Cellen in een biofilm zijn omgeven door een laag bestaande uit materialen afkomstig uit de aardappelresten en door de bacterie zelf uitgescheiden stoffen. Als we de overleving vergelijken van planktonische cellen versus biofilm cellen, op metaal of rubber, onder lage (6°C) of hogere (21°C) temperatuur, kunnen we zien dat de overleving tussen beide typen cellen niet sterk van elkaar verschilt (Figuur 3.4).

**Figuur 3.4** Aantallen cellen (links) en Percentage overleving (rechts) d van *P. brasiliense* cellen in

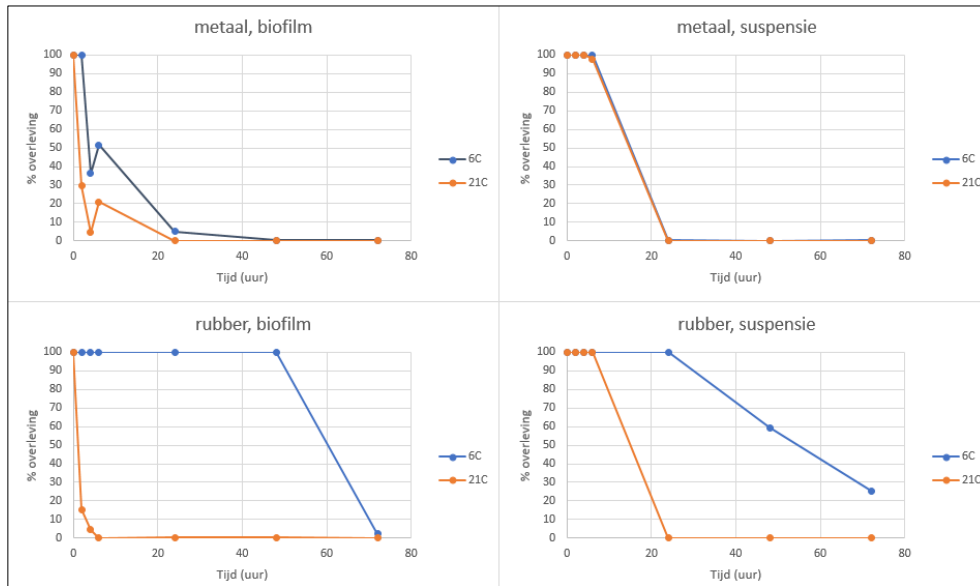


biofilm (blauw) of in suspensie (oranje) op metaal of op een rubber ondergrond bij 6°C of 21°C.



### Temperatueffecten: 6°C versus 21°C

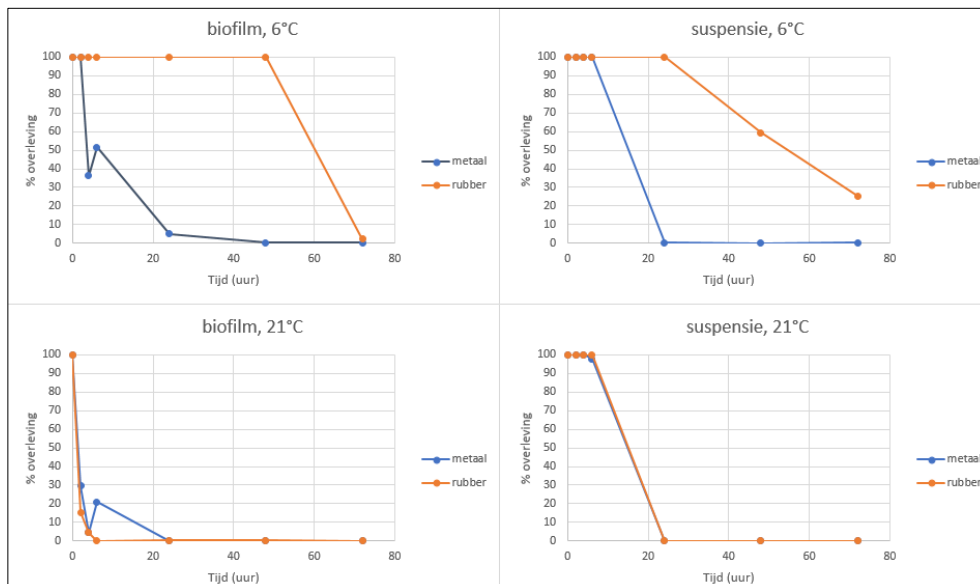
De overleving van *P. brasiliense* is bij lagere temperatuur (6°C) hoger dan bij hogere temperatuur (21°C) (Figuur 3.4). Zeker gemeten op een rubberen ondergrond zijn deze verschillen groot. Dit is niet alleen een effect puur van de lagere temperatuur, maar ook een effect van minder sterke uitdroging van de monsters bij deze temperaturen. De monsters bij 6°C bleven langer zichtbaar nat.



**Figuur 3.4** Relatieve overleving van *P. brasiliense* cellen bij 6°C en 21°C, overleving gemeten op verschillende ondergronden (metaal/rubber) in biofilm cellen of cellen in suspensie.

### Rubber versus metaal

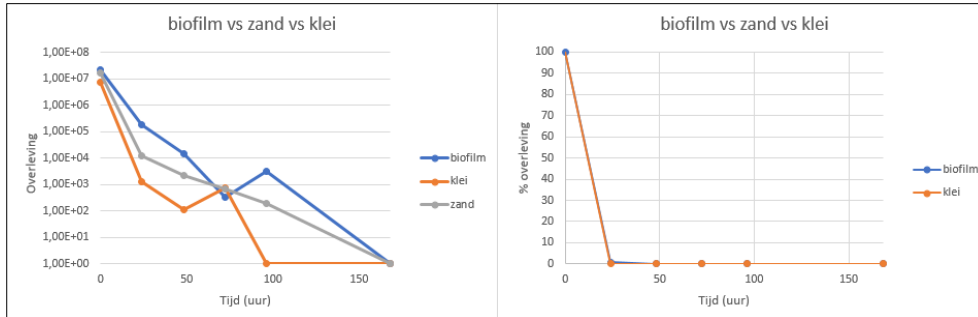
De overleving van *P. brasiliense* op rubberen ondergrond blijkt beter dan op metalen ondergrond. Deze verschillen zijn zeker bij lagere temperaturen duidelijk te meten (Figuur 3.5)



**Figuur 3.5** Relatieve overleving van *P. brasiliense* cellen op metalen of rubberen ondergrond, overleving gemeten bij 6°C en 21°C, in biofilm cellen of cellen in suspensie.

## Zand versus klei

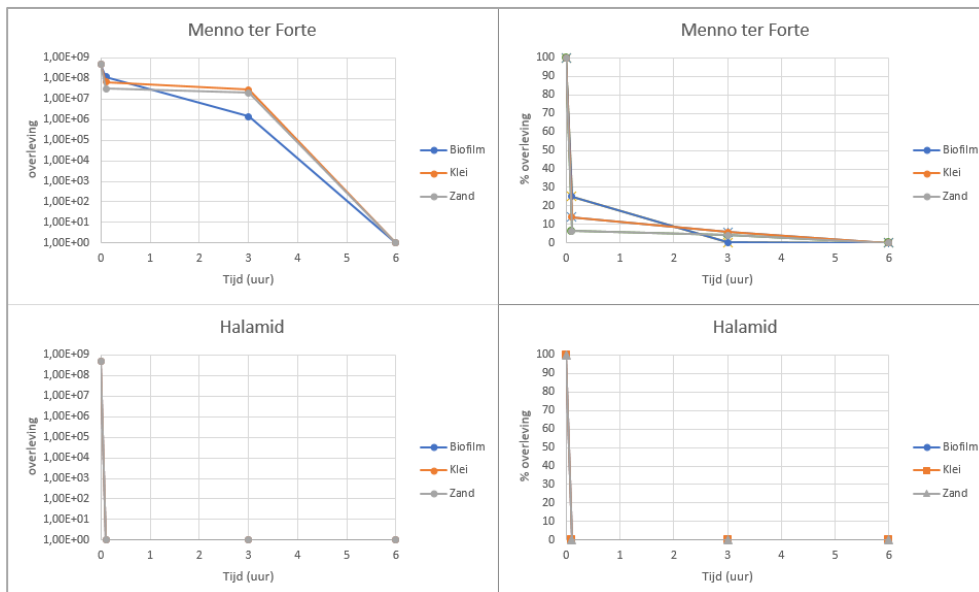
De overleving van *P. brasiliense* biofilm gemengd met zand- of kleigrond bij 21°C, verliep net als in een biofilm zonder gronddeeltjes snel, met een afsterving van 99.9% over de eerste 24 uur. Na 150 uur werden er geen levende cellen meer gevonden. De aantallen daalden kleigrond sneller dan in de zandgrond, en in zandgrond sneller dan in pure biofilm.



**Figuur 3.5** Absolute en relatieve overleving *P. brasiliense* cellen in een biofilm, biofilm gemengd met zandgrond en biofilm gemengd met kleigrond.

## 3.3 Effectiviteit ontsmettingsmiddelen

Een tweetal ontsmettingsmiddelen is getest op hun effecten op *P. brasiliense*: Menno ter Forte en Halamid-d. Menno ter Forte bestrijdt algen (groene aanslag) en bacteriën. Het middel bestaat uit de quaternaire ammoniumverbinding DDAC in combinatie met een biologisch afbreekbare uitvloeier voor een goede doordringing en contactwerking. Halamid-d is een middel wat gebruikt wordt in de bestrijding van bacteriën en virussen. Dit middel ontleent zijn werkzaamheid aan de chloramine-t, wat een oxidatiereactie aangaat met micro-organismen. Geen van beide middelen is specifiek gericht op *P. brasiliense*.



**Figuur 3.6** Absolute en relatieve overleving *P. brasiliense* cellen in een biofilm, biofilm gemengd met zandgrond en biofilm gemengd met kleigrond na toevoeging van de ontsmettingsmiddelen Menno ter Forte en Halamid-d.

Voor de experimenten met Menno ter Forte en Halamid-d zijn respectievelijk cellen in een biofilm, biofilm gemengd met zandgrond en biofilm gemengd met kleigrond blootgesteld aan de aanbevolen concentratie middel (Figuur 3.6). In de mengsels met Halamid-d werden na 5 minuten reeds geen levende cellen meer waargenomen. Bij behandeling met Menno ter Forte was de afdoding binnen 5 minuten zo'n 75-95%, en waren er na 3 uur minder dan 10% van de cellen nog in leven, terwijl er na 6 uur geen levende cellen meer aanwezig waren. Aanwezigheid van gronddeeltjes gaf een lichte remming van Menno ter Forte.

---

## 4 Conclusies en discussie

In dit project werd onderzoek gedaan naar het risico op overdracht van soft rot Pectobacteriaceae (SRP's) tijdens de oogst vanuit besmette (rottende) knollen naar knollen die vrij zijn van de ziekteverwekker. Er werd geïnventariseerd hoe lang de bacteriën op oogstmachines overleven en hoe deze effectief kunnen worden ontsmet. De volgende onderwerpen werden geadresseerd:

- Hoe ver vindt er versmering van *P. brasiliense* plaats tijdens de oogst na de oogst van een besmette knol?

In totaal zijn er op drie tijdstippen veldproeven gedaan waarbij gekeken is in hoeverre de bacteriën van een besmette knol versmeren over de volgende, op afstand genummerde knollen. Om onderscheid te kunnen maken tussen de aangebrachte besmettingen en eventueel al aanwezige besmetting in de grond of gebruikte aardappelmaterialen, is er voor de besmettingen gebruik gemaakt van een rifampicine resistente *P. brasiliense* stam. Onderscheid tussen rif-ampicine resistente stam en natuurlijke stammen op grond van TaqMan kan niet gemaakt worden; de *enrichment* TaqMan kan door gebruik van rifampicine in het ophopingsmedium wél specifiek gemaakt worden.

Zowel op zand- als op kleigrond werden de hoogste aantallen besmette knollen waargenomen in knollen die dichtbij de besmette knol zaten in de rij. De eerste drie meter is de besmetting kans zo'n 60-70%. Rond de 30 meter is deze kans afgenomen tot circa 10-30% voor zowel klei als zand. Slechts éénmaal werd een besmette knol waargenomen op 54 meter na de besmette knol.

Ook knollen die net voor een rottende knol worden geoogst hebben een grote kans om op de machine of in kratten met de besmetting in aanraking te komen. Dit kan zijn omdat ze elkaar op de band raken en/of in dezelfde kratten verzameld werden.

Omdat de verschillende versmeringsexperimenten op zand- en kleigrond niet significant van elkaar blijken te verschillen, kunnen we alle data gebruiken voor het bepalen van een gemiddelde infectiedruk per knol (Fig 2.15). De gemiddelde besmetting is het hoogst in de eerst geoogste 3 meter (10 gesimuleerde planten) na de oogst, als ongeveer 100.000 bacteriën per knol als besmetting terecht komen. Dit zijn knollen die ook het vaakst met elkaar in eenzelfde krat worden geoogst. Daarna fluctueren de besmettingen tussen de circa 1000 bacteriën per knol en 0-10 bacteriën in wat samen lijkt te hangen met de rotaties van de lopende band van de oogst machine (Fig 2.15). Na meer dan 30 meter van een zwaar besmette geoogste knol komen infecties nog slechts zelden voor en gaat het om zeer lage aantallen van slechts enkele bacteriën.

Kijkend naar het besmettingsniveau van de knollen neemt deze op een golvende wijze af (figuur 2.15). Deze golven van besmettingen lijken samen te gaan met de omwentelingen van de oogstmachine tijdens onze oogst.

- Het aantal besmette knollen en niveau van besmetting

Kijken we naar het percentage/aantal besmette knollen dat een rotte, versmerende knol gemiddeld oplevert, kunnen we zeggen dat 19.7% van de knollen geoogst in de eerste 30 meter na een besmette knol besmet raakte met enkele tot veel *P. brasiliense* bacteriën. Een 5.9% van deze knollen is besmet met circa  $10^5$  bacteriën per knol, wat vooral knollen zijn geoogst in de eerste meters na de besmetting; 9.4% met circa  $10^2 - 10^3$  bacteriën per knol, terwijl een 4,4% minder dan  $10^1$  bacteriën per knol bevat. Na 30 meter is kans op besmetting erg klein. Ook de knollen geoogst net voor een besmette knol, blijken vaak een relatief hoge besmetting te hebben opgelopen op de oogstmachine

Voor het uitsorteren van mogelijk (hoog tot zeer hoog) besmette knollen in de praktijk is het dus goed om zowel de knollen die net voor de restanten van een besmette knol op de machine komen als net erna uit te sorteren.

- 
- Infectie van knollen en kansen op bacterieziek materiaal tijdens de volgende teelt

Hoe zwaarder een besmetting van een knol, hoe groter naar verwachting de kans dat deze besmetting tot problemen leidt. Vooral temperatuur en waterbeschikbaarheid zullen bepalen hoe sterk de bacterieaantallen na een besmetting zullen toenemen. Er bestaan geen duidelijke schadedrempels wanneer een besmetting tot onherroepelijke problemen leidt omdat deze sterk jaar- en weerafhankelijk kunnen zijn.

Of besmettingen in de grootorde van enkele bacteriën per knol tot 100.000 per knol daadwerkelijk tot een zachtrot besmetting in de besmette knollen leiden tijdens de bewaring of in het veld, is vooral afhankelijk van de hoeveelheid beschikbaar water en van de omgevingstemperaturen van de aardappelknollen. Maceratie, het verslijmen van het aardappelweefsel in de knol wordt pas zichtbaar als de bacterieaantallen lokaal zijn toegenomen tot  $10^7$  (10.000.000) per gram aardappelweefsel (Pérombelon *et al.*, 1979).

De ontwikkeling van zwartbenigheid vanuit besmette moederknollen in het veld is vooral gelinkt aan de hoeveelheid bodemwater (uit regen en irrigatie), die kan zorgen voor relatief zuurstofarme condities in de moederknollen die de bacterieaantallen sterk doen toenemen en die zich dan door de plant verspreiden (Pérombelon *et al.*, 1989). Vooral jongere planten zijn sterk gevoelig voor zwartbenigheid, bij oudere planten komen ook latente en symptoomloze infecties plaats (Pérombelon, 2002). In de studie van Bain en collega's met *Pectobacterium carotovorum* gaven afhankelijk van de locatie en aardappelras, besmettingen van circa  $10^3$  of  $10^4$  bacteriën per knol na vacuuminfiltratie verschijnselen van zwartbenigheid in 20-30% van de planten (Bain *et al.*, 1990). Ook in de studie van Jan van der Wolf en collega's gaven lage hoeveelheden inoculum na vacuuminfiltratie hoge ziekteincidenties; zonder infiltratie was de uitval minder (van der Wolf *et al.*, 2017).

- Afharding en gevoeligheid van de knol voor infectie/Rol van het oogstmoment

Het november/december 2021 veldexperiment was gepland om te kijken in hoeverre de mate van afharding van de knol effect heeft op de hoeveelheid waargenomen besmettingen. Ondanks de verwachtingen dat afharding gunstig zou werken, werd er geen significant verschil waargenomen in de mate van besmetting en verspreiding. Eventuele gunstige effecten van verder afgeharde knollen, zouden in dit geval te niet gedaan kunnen zijn door de nattere bodemomstandigheden van het perceel van de veldproef door de grotere hoeveelheid neerslag in de periode voorafgaand aan de late najaars-oogst en door de hoger luchtvochtigheid tijdens de oogst.

De overlevingsproeven met planktonische bacteriën en bacteriën in een slijmlaag lieten zien dat vooral nattere omstandigheden leiden tot een langere overleving van *P. brasiliense*, met mogelijk hogere infectiekansen tot gevolg. Oogsten onder relatief droge veld- en weercondities is dus aan te raden.

Tijdens het Deltaplan Erwinia is gekeken naar overleving van SRPs tijdens het twee fasen rooien, waarbij de knollen eerst worden opgerooid en in het zwad te drogen gelegd (soms voor langere periode), om later in een tweede werkgang met een rooimachine te worden opgeladen. In een veldproef, met een eerstejaars vermeerdering uit miniknollen, is destijds onderzocht wat het effect is van deze rooimethode op de overleving van Erwinia. Een deel van de opgerooid knollen werd daarbij uitwendig besmet. Tijdens de periode van drogen in het zwad werd deze uitwendige besmetting sterk gereduceerd. Een klein deel van de besmetting, waarschijnlijk binnengedrongen via de schil in de knol nam echter ook bij langer laten drogen niet verder meer af. Waarschijnlijk zijn dit bacteriën die de knol via de schil zijn binnengedrongen. Na 31 dagen werden de resterende knollen uit het veld meegenomen en gedurende de winterperiode droog bewaard bij 4°C. In het daarop volgende jaar is een aantal van deze knollen uitgepoot in het veld. Van de met Dickeya en vPcc behandelde knollen leverde resp. 25% en 37% een aangetaste plant op. Of het

- 
- Hoe lang blijven bacteriën als planktonische (losse) cellen en in een biofilm (slijm laag) in leven?

De overlevingsexperimenten hebben laten zien dat planktonische cellen sneller dood gaan dan cellen in de bescherming van een biofilm, die net iets langer leven dan cellen in een biofilm gemengd met zand- of kleideeltjes. Na 24 uur is ruim 99.9% van de cellen in alle gevallen dood. Echter als de besmetting zo'n  $10^7$  bacteriën is kunnen na 4 dagen nog steeds enkele levende cellen in de biofilms worden aangetroffen.

- Effecten van grondsoort?

In de versmeringsproeven in het veld werden er geen significante verschillen gevonden tussen klei- en zandgrond. In de overlevingsexperimenten met bacteriën in een biofilm (slijm laag) gemengd met klei- of zandgrond, leken kleideeltjes te leiden tot een snellere afname in het aantal levende *P. brasiliense* bacteriën.

- Wat is de beste manier om machines te ontsmetten? Wat is het risico op overleving van SRP's bij reiniging en ontsmetting van oogstmachines?

Zonder ontsmetting waren er tijdens op de oogstmachine in september 2020, na 1 dag nog slechts enkele van de aangebrachte cellen in leven: Een afdoding van 99.99% (0.01% overleving) werd waargenomen, met geen significante verschillen tussen de overleving op metaal of rubber. Na drie dagen waren er geen levende *P. brasiliense* cellen meer detecteerbaar.

De overleving van *P. brasiliense* is sterk afhankelijk van de omgevingstemperatuur en de daarbij behorende mate van uitdroging. Hogere temperaturen/sterkere uitdroging leidt tot snellere afdoding dan lagere temperaturen en vochtiger omstandigheden. In de laboratoriumproeven bleek de overleving op rubber beter dan op een metalen ondergrond, maar op ingeschuurde machines werd er geen verschil gemeten.

Al tijdens het afspoelen van de oogstmachines met water zullen er veel bacteriecellen worden verwijderd. Het gebruik van zowel Halamid-d als Menno ter Forte getest op biofilm cellen met of zonder menging met zand- of kleigrond, leidde tot een snellere afdoding. Bij Halamid waren na 5 minuten reeds geen levende cellen meer waargenomen. Bij behandeling met Menno ter Forte was de afdoding binnen 5 minuten zo'n 75-95%, waren na 3 uur minder dan 10% van de cellen nog in leven, terwijl na 6 uur geen levende cellen meer aanwezig waren. Aanwezigheid van gronddeeltjes gaf een lichte remming van Menno ter Forte. Gebruik van deze middelen kan de afdoding op de (oogst)machine dus versnellen en geschikt zijn om tussen verschillende velden de machines te ontsmetten.

Machines ontsmetten tijdens de oogst zelf is waarschijnlijk moeilijk. De besmetting van de machine lijkt vooral op te treden op het moment van oogst van een besmette knol naar de directe buurknollen en met het rondraaien van de lopende band ook bij volgende rotaties voor lichte besmetting te kunnen zorgen. Als men visueel knollen uit sorteert op de band voor mogelijke besmetting zou men kunnen overwegen lokaal de band te ontsmetten met een snelwerkend middel.



---

# Literatuur

- Bain RA, Pérombelon MCM, Tsrer L. and Nachmias A (1990), Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. *Plant Pathology*, 39: 125-133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02483.x>
- Czajkowski R, Perombelon MCM, van Veen JA, van der Wolf JM (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* **60**: 999-1013.
- Czajkowski R, De Boer W, Van der Wolf J (2013). Chemical disinfectants can reduce potato blackleg caused by '*Dickeya solani*'. *European journal of plant pathology* **136**: 419-432.
- Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafra S, Lojkowska E, Potrykus M, van der Wolf JM *et al* (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology* **166**: 18-38.
- Duarte V, de Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 535-545. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x
- El-Tassa SOM, Duarte V (2004). Occurrence of pectobacteria in potato seed tubers in Rio Grande do Sul. (Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no estado do Rio Grande do Sul). *Fitopatologia Brasileira*, 29(6), 620-625. doi: 10.1590/S0100-41582004000600004
- Elphinstone JG, Perombelon MCM (1986). Contamination of potatoes by *erwinia-carotovora* during grading. *Plant Pathology Oxford 1986*; **35**: 25-33.
- Helias V, Hamon P, Huchet E, Wolf JVD, Andrivon D (2012). Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology* **61**: 339-345.
- Kastelein P, Evenhuis A, Van der Zouwen P, Krijger M, Van der Wolf J (2018). Spread of *Xanthomonas fragariae* in strawberry fields by machinery. *EPPO Bulletin* **48**: 569-577.
- Meng XL, Chai A, Shi YX, Xie XW, Ma ZH, Li BJ (2017). Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Disease*, 101(2), 279-287. doi: 10.1094/PDIS-05-16-0763-RE
- Naumann K, Zielke R, Peter K (1978). Infection of the potato tuber by the pathogen of blackleg and tuber soft rot, *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (van Hall) Dye, and other bacteria causing soft rot, under commercial production conditions. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz* **14**: 151-161.
- Pérombelon MCM, Gullings-Handley J, Kelman A, (1979) Population dynamics of *Erwinia carotovora* and pectolytic clostridia in relation to decay of potatoes. *Phytopathology* **69**, 167-73.
- Pérombelon MCM, Lumb VM, Zutra D, Hyman LJ, Burnett EM (1989). Factors affecting potato blackleg development. In: Tjamos, EC, Beckman, CH, eds. *Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on 'the Interaction of Genetic and Environmental Factors in the Development of Vascular Wilt Diseases of Plants' 1988, Cape Sounion, Greece*. Berlin: Springer-Verlag, 421-31.
- Pérombelon, M.C.M. (2002), Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51: 1-12. <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>
- Prins H, Breukers A (2008). In de puree? De gevolgen van aantasting door *Erwinia* voor de aardappelsector in kaart gebracht: Den Haag, The Netherlands.
- Robertson I (1961). The use of paracresol for the detection of damage in the potato tuber. *J agric Engng Res* **6**: 220-221.
- Scholey J, Marshall C, Whitbread R (1968). A Pathological Problem Associated with Pre-packaging of Potato Tubers. *Plant Pathology* **17**: 135-139.
- van der Wolf JM, de Haan EG, Kastelein P, Krijger M, Haas BH, Velvis H, Mendes O, Kooman-Gersmann M, van der Zouwen PS (2017). Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. *Plant Pathology*, 66(4), 571-583. doi: 10.1111/ppa.12600
- van der Wolf JM, Cahil G, van Gijsegem F, Helias V, Humphris S, Xiang L, Lojkowska E, Pritchard L (2021). Isolation, detection and characterization of *Pectobacterium* and *Dickeya* species. "*Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*". Springer, Cham, 2021. 149-173.





# Bijlage 1- Verdeling over de kratten

Sept 20 -rij 1		
monster	besmetting	krat
1	1	B
2	1	B
3	1	B
4	1	B
5	1	B
6	0	B
7	1	B
8	0	B
9	1	B
10	0	C
11	1	B
12	1	-
13	1	B
14	0	B
15	1	B
16	0	B
17	0	B
18	0	B
19	0	C
20	0	C
21	0	C
22	0	C
23	0	C
24	0	C
25	0	C
26	0	C
27	0	C
28	0	C
29	0	C
30	0	C
31	0	C
32	1	C
33	0	C
34	1	C
35	0	C
36	0	C
37	0	C
38	0	C
39	1	C
40	0	C
41	0	C
42	0	D
43	0	D
44	0	D
45	0	D
46	0	D
47	0	D
48	0	D
49	0	D
50	0	D
51	0	D
52	0	D
53	0	D
54	0	D
55	0	D
56	0	D
57	0	D
58	0	D
59	0	D
60	0	D
61	0	D
62	0	D
63	1	D
64	1	D
65	0	D
66	0	D
67	0	D
68	1	D
69	0	D
70	0	D
71	0	D

Sept 20 -rij2		
sample	besmetting	krat
101	1	B
102	1	B
103	1	B
104	1	B
105	1	B
106	1	B
107	1	B
108	1	B
109	0	B
110	1	B
111	0	B
112	0	B
113	1	B
114	1	B
115	1	B
116	0	B
117	1	B
118	1	B
119	1	B
120	0	C
121	0	C
122	0	C
123	0	C
124	0	C
125	0	C
126	1	C
127	1	C
128	0	C
129	0	C
130	0	C
131	0	C
132	1	C
133	1	-
134	1	C
135	0	-
136	0	D
137	0	D
138	0	D
139	0	E
140	0	D
141	1	D
142	1	D
143	0	D
144	0	D
145	0	D
146	0	-
147	0	D
148	0	D
149	0	E
150	0	E
151	0	E
152	0	E
153	0	E
154	0	E
155	0	E
156	0	E
157	0	E
158	0	E
159	0	E
160	0	E
161	0	E
162	0	E
163	0	E
164	0	E
165	0	-
166	0	E
167	0	E
168	0	E
169	0	E
170	0	E
171	0	E

Sept 20 -rij 3		
sample	besmetting	krat
201	1	A
202	1	A
203	1	A
204	1	A
205	1	A
206	1	B
207	0	B
208	0	B
209	0	B
210	0	B
211	1	B
212	1	B
213	0	B
214	0	B
215	0	B
216	0	B
217	0	B
218	0	B
219	0	B
220	0	B
221	0	B
222	0	B
223	0	B
224	0	B
225	0	B
226	0	B
227	0	B
228	0	B
229	0	B
230	0	B
231	0	C
232	0	C
233	0	C
234	0	C
235	0	C
236	0	C
237	0	C
238	0	C
239	0	C
240	0	C
241	0	C
242	1	C
243	1	C
244	1	C
245	1	C
246	1	C
247	1	D
248	1	D
249	0	C
250	0	D
251	1	D
252	0	D
253	0	-
254	1	D
255	1	D
256	1	D
257	0	D
258	0	D
259	0	D
260	0	D
261	0	D
262	0	D
263	0	D
264	0	D
265	0	D
266	1	D
267	0	D
268	0	D
269	0	D
270	0	D
271	0	D

Dec 20 -rij 1		
monster	besmetting	krat
R1 -1	1	A
R1 -2	1	A
R1 -3	0	A
R1 -4	1	C
R1 -5	1	A
R1 -6	0	A
R1 -7	0	A
R1 -8	0	A
R1 -9	0	A
R1 -10	1	A
1	1	A
2	1	B
3	1	B
4	1	B
5	1	B
6	0	B
7	0	B
8	1	B
9	0	B
10	0	B
11	1	B
12	1	B
13	1	B
14	1	B
15	1	B
16	0	B
17	0	B
18	0	B
19	1	B
20	1	C
21	0	C
22	1	C
23	0	D
24	0	C
25	0	C
26	0	C
27	0	C
28	0	C
29	0	C
30	1	C
31	0	C
32	0	-
33	0	C
34	0	C
35	0	C
36	0	C
37	0	C
38	0	C
39	0	D
40	1	D
41	1	D
42	1	D
43	0	D
44	0	D
45	0	D
46	0	D
47	0	D
48	0	D
49	0	D
50	0	D
51	0	D
52	0	D
53	1	D
54	0	D
55	0	E
56	0	E
57	1	E
58	0	E
59	1	E
60	0	E
61	0	E

Dec 20 -rij2		
sample	besmetting	krat
R2 -1	1	A
R2 -2	1	A
R2 -3	1	A
R2 -4	1	A
R2 -5	1	A
R2 -6	1	A
R2 -7	1	A
R2 -8	0	A
R2 -9	1	A
R2 -10	0	A
101	1	A
102	1	A
103	1	A
104	1	A
105	1	A
106	0	A
107	1	A
108	1	B
109	1	B
110	0	B
111	0	B
112	0	B
113	0	B
114	0	B
115	1	B
116	1	B
117	1	C
118	0	C
119	1	C
120	1	C
121	0	C
122	1	C
123	0	C
124	0	C
125	1	C
126	0	C
127	0	C
128	1	C
129	0	C
130	0	C
131	1	C
132	0	C
133	0	C
134	0	D
135	0	D
136	0	D
137	0	-
138	0	D
139	0	D
140	0	D
141	0	D
142	0	D
143	0	D
144	0	D
145	0	D
146	0	D
147	0	D
148	1	E
149	0	E
150	0	E
151	0	E
152	0	E
153	0	E
154	0	E
155	0	E
156	0	E
157	0	E
158	0	E
159	0	E
160	0	E
161	0	E

72	0	E
73	0	E
74	0	E
75	0	E
76	0	E
77	0	E
78	0	E
79	0	E
80	0	E
81	0	E
82	0	E
83	0	E
84	0	E
85	0	E
86	0	E
87	0	E
88	0	F
89	0	F
90	0	F
91	0	F
92	0	F
93	1	F
94	1	F
95	1	F
96	0	F
97	0	F
98	0	F
99	0	F
100	0	F

172	1	F
173	0	E
174	0	E
175	0	F
176	0	F
177	0	F
178	0	F
179	0	F
180	0	F
181	0	F
182	0	F
183	0	F
184	0	F
185	0	F
186	0	F
187	0	F
188	0	F
189	0	F
190	0	F
191	0	F
192	0	F
193	1	F
194	1	F
195	1	F
196	0	F
197	0	F
198	1	F
199	0	F
200	0	F

272	0	-
273	0	D
274	0	D
275	0	E
276	0	E
277	0	E
278	0	E
279	0	E
280	0	E
281	0	E
282	0	E
283	0	E
284	0	E
285	0	E
286	0	E
287	0	E
288	0	E
289	0	E
290	0	E
291	0	E
292	0	F
293	0	F
294	0	F
295	0	F
296	0	F
297	0	F
298	0	F
299	0	F
300	0	F

62	0	E
63	0	E
64	0	E
65	0	E
66	0	F
67	0	E
68	0	E
69	1	E
70	0	E
71	1	E
72	0	-
73	0	E
74	1	E
75	0	-
76	0	E
77	0	E
78	0	-
79	0	E
80	0	F
81	0	F
82	0	F
83	0	F
84	0	F
85	0	F
86	0	F
87	0	F
88	0	F
89	0	F
90	0	F
91	0	F
92	0	F
93	0	F
94	0	F
95	0	F
96	0	F
97	0	F
98	0	-
99	0	F
100	0	F

162	0	E
163	0	E
164	1	E
165	0	F
166	0	F
167	0	F
168	0	F
169	0	-
170	0	F
171	0	F
172	0	F
173	0	F
174	0	F
175	0	F
176	1	F
177	0	F
178	0	-
179	0	F
180	0	F
181	0	F
182	0	F
183	0	F
184	0	F
185	0	F
186	0	F
187	0	F
188	0	F
189	0	F
190	0	F
191	0	F
192	0	F
193	0	F
194	0	F
195	0	F
196	0	F
197	0	F
198	0	F
199	0	F
200	0	-

Sept 21 -rij 1		
monster	besmetting	krat
1	1	C
2	1	A
3	0	C
4	0	A
5	0	A
6	0	A
7	0	-
8	0	-
9	0	D
10	0	-
11	0	C
12	0	A
13	0	-
14	0	A
15	0	E
16	0	A
17	0	B
18	0	-
19	0	B
20	0	A
21	0	A
22	0	G
23	0	A
24	0	A
25	0	A
26	0	A
27	0	A
28	0	A
29	0	F
30	0	C
31	0	E
32	0	-
33	0	B
34	0	B
35	1	B
36	0	D
37	0	A
38	0	G
39	0	B
40	0	B
41	0	A
42	0	A
43	1	E
44	0	D
45	0	C
46	0	F
47	0	B
48	0	A
49	0	-
50	0	E
51	0	B
52	0	B
53	0	C
54	0	B
55	0	C
56	0	D
57	0	D
58	0	E
59	0	-
60	0	B
61	0	C
62	0	C
63	0	B
64	0	B
65	0	C

Sept 21 -rij 1		
monster	besmetting	krat
101	0	D
102	0	D
103	0	C
104	0	E
105	0	D
106	0	D
107	0	-
108	0	D
109	0	H
110	0	C
111	0	D
112	0	C
113	0	C
114	0	C
115	0	C
116	0	D
117	0	C
118	0	C
119	0	D
120	0	C
121	0	D
122	0	I
123	0	-
124	0	D
125	0	D
126	0	E
127	0	D
128	0	D
129	0	-
130	0	D
131	0	D
132	0	D
133	0	-
134	0	D
135	0	D
136	0	E
137	0	-
138	0	F
139	0	-
140	0	D
141	0	D
142	0	-
143	0	D
144	0	E
145	0	E
146	0	F
147	0	D
148	0	-
149	0	E
150	0	F
151	0	E
152	0	E
153	0	E
154	0	D
155	0	F
156	0	D
157	0	-
158	0	E
159	0	E
160	0	F
161	0	F
162	0	-
163	0	E
164	0	E
165	0	E

Sept 21 -rij 1		
monster	besmetting	krat
201	0	G
202	0	-
203	0	F
204	0	-
205	0	F
206	0	G
207	0	-
208	0	G
209	0	G
210	0	G
211	0	F
212	0	F
213	0	G
214	0	F
215	0	G
216	0	H
217	0	G
218	0	-
219	0	-
220	0	G
221	0	-
222	0	G
223	0	G
224	0	G
225	0	H
226	0	G
227	0	G
228	0	-
229	0	G
230	0	G
231	0	G
232	0	I
233	0	G
234	0	H
235	0	I
236	0	H
237	0	-
238	0	G
239	0	G
240	0	H
241	0	-
242	0	G
243	0	H
244	0	H
245	0	-
246	0	H
247	0	-
248	0	-
249	0	H
250	0	I
251	0	-
252	0	H
253	0	H
254	0	H
255	0	H
256	0	H
257	0	H
258	0	H
259	0	I
260	0	H
261	0	H
262	0	I
263	0	H
264	0	I
265	0	-

Sept 21 -rij2		
sample	besmetting	krat
1	1	A
2	1	B
3	0	B
4	0	B
5	0	B
6	0	B
7	0	B
8	0	B
9	0	B
10	0	B
11	0	B
12	0	B
13	1	C
14	1	B
15	1	C
16	1	C
17	1	C
18	1	C
19	1	C
20	1	C
21	0	E
22	1	C
23	0	C
24	0	C
25	1	C
26	1	C
27	1	C
28	1	C
29	0	C
30	1	C
31	0	D
32	0	D
33	0	D
34	0	D
35	0	D
36	0	D
37	0	D
38	0	D
39	0	D
40	0	D
41	0	-
42	0	E
43	0	E
44	0	E
45	0	E
46	0	E
47	0	E
48	0	E
49	1	E
50	0	E
51	1	E
52	0	E
53	0	E
54	1	E
55	0	E
56	0	F
57	0	E
58	0	E
59	0	F
60	0	F
61	0	F
62	0	F
63	0	F
64	0	F
65	0	G

Sept 21 -rij2		
sample	besmetting	krat
101	0	I
102	0	I
103	0	H
104	0	M
105	0	H
106	0	H
107	0	H
108	0	I
109	0	H
110	0	H
111	0	I
112	0	I
113	0	I
114	0	I
115	0	I
116	0	I
117	0	I
118	0	I
119	0	I
120	0	I
121	0	I
122	0	I
123	0	I
124	0	I
125	0	I
126	0	I
127	0	I
128	0	J
129	0	-
130	0	L
131	0	J
132	0	J
133	0	J
134	0	P
135	0	J
136	0	K
137	0	J
138	0	J
139	0	J
140	0	J
141	0	J
142	0	M
143	0	J
144	0	K
145	0	J
146	0	K
147	0	K
148	0	K
149	0	K
150	0	K
151	0	K
152	0	K
153	1	K
154	0	K
155	0	L
156	0	L
157	0	K
158	0	K
159	0	L
160	0	L
161	0	L
162	0	M
163	0	L
164	0	M
165	0	L

Sept 21 -rij2		
sample	besmetting	krat
201	0	O
202	0	O
203	0	N
204	0	-
205	0	Q
206	0	O
207	0	O
208	0	O
209	0	O
210	0	O
211	0	O
212	0	O
213	0	O
214	0	R
215	0	O
216	0	P
217	0	P
218	0	-
219	0	P
220	0	T
221	0	P
222	0	Q
223	0	P
224	0	P
225	0	Q
226	0	P
227	0	P
228	0	Q
229	0	P
230	0	P
231	0	Q
232	0	Q
233	0	Q
234	0	Q
235	0	Q
236	0	R
237	0	R
238	0	Q
239	0	Q
240	0	Q
241	0	R
242	0	Q
243	0	Q
244	0	R
245	0	R
246	0	R
247	0	R
248	0	R
249	0	R
250	0	R
251	0	R
252	0	R
253	0	R
254	0	R
255	0	S
256	0	R
257	0	R
258	0	R
259	0	T
260	0	S
261	0	S
262	0	S
263	0	S
264	0	T
265	0	T

66	0	C
67	0	B
68	0	D
69	0	E
70	0	B
71	0	B
72	0	-
73	1	B
74	1	D
75	0	F
76	0	B
77	0	D
78	0	C
79	0	-
80	0	B
81	0	B
82	0	C
83	0	E
84	0	F
85	0	-
86	0	C
87	0	C
88	0	C
89	0	C
90	0	-
91	0	F
92	0	D
93	0	C
94	0	C
95	0	C
96	0	F
97	0	-
98	0	C
99	0	F
100	0	D

166	0	-
167	0	E
168	0	F
169	0	-
170	0	F
171	0	E
172	0	G
173	0	G
174	0	E
175	0	G
176	0	F
177	0	E
178	0	-
179	0	E
180	0	E
181	0	E
182	0	E
183	0	E
184	0	E
185	0	E
186	0	E
187	0	F
188	0	G
189	0	F
190	0	E
191	0	-
192	0	F
193	0	G
194	0	-
195	0	H
196	0	F
197	0	I
198	0	G
199	0	-
200	0	-

266	0	I
267	0	H
268	0	-
269	0	J
270	0	H
271	0	H
272	0	-
273	0	H
274	0	I
275	0	I
276	0	-
277	0	-
278	0	I
279	0	H
280	0	I
281	0	I
282	0	-
283	0	I
284	0	-
285	0	I
286	0	-
287	0	-
288	0	I
289	0	-
290	0	-
291	0	-
292	0	-
293	0	J
294	0	I
295	0	-
296	0	I
297	0	I
298	0	-
299	0	I
300	0	-

66	0	F
67	0	I
68	0	F
69	0	F
70	1	F
71	0	F
72	0	I
73	0	F
74	0	F
75	0	F
76	0	F
77	0	G
78	0	G
79	0	H
80	0	G
81	0	H
82	0	G
83	0	G
84	0	G
85	0	G
86	0	G
87	0	I
88	0	G
89	0	G
90	0	I
91	0	I
92	0	G
93	0	H
94	0	H
95	0	H
96	0	H
97	0	H
98	0	H
99	0	H
100	0	H

166	0	L
167	0	L
168	0	L
169	0	L
170	0	N
171	0	L
172	0	L
173	0	L
174	0	L
175	0	M
176	0	M
177	0	M
178	0	N
179	0	M
180	0	M
181	0	M
182	0	M
183	0	M
184	0	M
185	0	M
186	0	M
187	0	N
188	0	N
189	0	O
190	0	P
191	0	N
192	0	V
193	0	N
194	0	N
195	0	N
196	0	N
197	0	N
198	0	N
199	0	N
200	0	N

266	0	T
267	0	S
268	0	S
269	0	S
270	0	V
271	0	S
272	0	T
273	0	T
274	0	-
275	0	T
276	0	V
277	0	T
278	0	T
279	0	T
280	0	T
281	0	T
282	0	T
283	0	T
284	0	T
285	0	T
286	0	T
287	0	T
288	0	T
289	0	T
290	0	T
291	0	T
292	0	T
293	0	T
294	0	U
295	0	U
296	0	U
297	0	U
298	0	U
299	0	U
300	0	U



---

Correspondentie adres voor dit rapport:

Postbus 16  
6700 AA Wageningen  
T 0317 48 07 00  
[www.wur.nl/plant-research](http://www.wur.nl/plant-research)

Rapport WPR-WUR-LWV19011

---

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

