

Toepassing van ozon bij de bewaring van pootaardappelen

Kees Bus & Arjan Veerman

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

April 2007

PPO nr. 32500109

© 2007 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

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

Dit rapport geeft de resultaten weer van het onderzoek dat het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving heeft uitgevoerd in samenwerking met:

Tolsma Techniek Emmeloord B.V.,
Excellent Ozone Systems B.V. (EOS) en
CU Ozone B.V.

Dit onderzoek is financieel mogelijk gemaakt door:

Stichting Proefboerderij Prof. Dr. J.M. van Bemmelenhoeve
Stichting Proefbedrijven Flevoland
Provincie Flevoland

Projectnummer: 32500109

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Business-unit Akkerbouw, Groene ruimte en Vollegrondsgroente
adres : Edelhertweg 1
: Postbus 430, 8200 AK Lelystad
Tel. : 0320 - 291111
Fax : 0320 - 230479
E-mail : infoagv.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

| | |
|--|----|
| SAMENVATTING..... | 5 |
| 1 INLEIDING | 7 |
| 2 WERKWIJZE..... | 9 |
| 2.1 Erwinia..... | 9 |
| 2.1.1 Inschuur- en bewaarbehandeling..... | 9 |
| 2.1.2 Praktijkproef..... | 9 |
| 2.1.3 Direct effect ozon en ozon+UV-straling op Erwiniabacteriën in petrischalen | 9 |
| 2.2 Phytophthora..... | 10 |
| 2.2.1 Inschuur- en bewaarbehandeling..... | 10 |
| 2.3 Zilverschurft | 10 |
| 2.3.1 Inschuur-, bewaar- en uitschuurbehandeling..... | 10 |
| 2.4 Vitaliteit pootgoed..... | 11 |
| 2.4.1 Inschuur- en bewaarbehandeling..... | 11 |
| 2.5 Statistische verwerking | 11 |
| 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE | 13 |
| 3.1 Erwinia..... | 13 |
| 3.1.1 Inschuurbehandeling | 13 |
| 3.1.2 Bewaring oktober - januari | 13 |
| 3.1.3 Bewaring januari - april | 14 |
| 3.1.4 Extra praktijkproef 16 januari..... | 14 |
| 3.1.5 Doding Erwinia's op voedingsbodems..... | 15 |
| 3.1.6 Bespreking resultaten Erwinia-bacteriën..... | 15 |
| 3.2 Phytophthora..... | 16 |
| 3.2.1 Inschuurbehandeling | 16 |
| 3.2.2 Bewaring oktober - januari | 16 |
| 3.2.3 Bewaring januari - april | 17 |
| 3.2.4 Bespreking resultaten Phytophthora infestans | 17 |
| 3.3 Zilverschurft | 17 |
| 3.3.1 Inschuurbehandeling | 17 |
| 3.3.2 Bewaring oktober - januari | 18 |
| 3.3.3 Bewaring januari - april | 18 |
| 3.3.4 Uitschuurbehandeling | 19 |
| 3.3.5 Bespreking resultaten zilverschurft..... | 19 |
| 3.4 Vitaliteit pootgoed..... | 19 |
| 3.4.1 Bespreking vitaliteit pootgoed..... | 20 |
| 4 CONCLUSIES | 21 |
| BIJLAGE 1. OZON-ONDERZOEK 2004-2005 | 23 |
| BIJLAGE 2. WERKWIJZE IN DETAIL | 25 |
| BIJLAGE 3. DODING ERWINIA'S IN PETRISCHALEN..... | 29 |

Samenvatting

Het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving heeft in samenwerking met Tolsma Techniek Emmeloord B.V., Excellent Ozone Systems B.V. en CU Ozone B.V. in het bewaar seizoen 2005-2006, in een moderne praktijkpootgoedbewaarplaats onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van ontsmetting van pootgoed met ozongas. De knollen werden met een hoge concentratie ozon op de band behandeld tijdens het inschuren, met een lage concentratie continu tijdens de bewaarperiode en met een hoge concentratie in combinatie gevolgd door UV-licht tijdens het uitschuren.

De werking van ozon is nagegaan op knollen die kunstmatig waren besmet met *Erwinia chrysanthemi*-bacteriën en met *Phytophthora*- en zilverschurftsporen. Ook is het effect van ozon op de vitaliteit van het pootgoed nagegaan. Daarnaast zijn op 16 januari 2006 op de band en in de 3 maanden erna in de "ozon"bewaarplaats drie "probleem"partijen met ozon behandeld. Deze partijen zijn niet kunstmatig besmet. Vervolgens is in het najaar van 2006 het effect van verschillende behandelingstijden met ozon en met ozon+UV op 6 *Erwinia*-stammen nagegaan. Deze *Erwinia*-stammen groeiden op voedingsbodems in petrischalen.

De behandeling met ozon van met *Erwinia chrysanthemi* besmette knollen leidde tot betrouwbaar minder rotte knollen.

De behandeling van met *Erwinia chrysanthemi* besmette knollen met ozon leidde volgens de kort na de behandeling uitgevoerde toetsing bij de NAK met behulp van hun standaard Elisa-toets, tot betrouwbaar minder positieve reacties (minder besmetting) op *Erwinia carotovora*, subsp. *atroseptica*.

Alle toetsingen die bij de NAK zijn uitgevoerd op *Erwinia chrysanthemi* waren positief. De aangebrachte besmetting met deze bacterie was achteraf te hoog.

Bij de op 16 januari ingezette praktijkproef leek de gecombineerde behandeling op de band en in de bewaarplaats, de besmetting met *Erwinia chrysanthemi* verlagen. Het effect was net niet ($F_{prop.} = 0,054$) significant. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* kwam nauwelijks voor.

De proef in het najaar van 2006 waarbij de duurwerking van ozon en van ozon+UV op verschillende *Erwinia*-stammen in petrischalen werd getoetst leidde tot verrassend weinig doding. Zelfs na 4 uur behandeling was het gemiddelde dodingpercentage nog maar 13%. Wel was er een betrouwbaar verschil in doding tussen de verschillende stammen en nam de doding toe met de ozon-blootstellingstijd. Ook 30 seconden aanvullend UV-licht leek de doding te doen toenemen.

Ozon heeft de infectie van de knollen met een agressief *Phytophthora*-isolaat niet kunnen beperken. De besmetting vond hierbij 3 uur voor de behandeling met ozon op de band plaats en twee weken voordat de monsters de "ozon"bewaarplaats in gingen.

Behandeling van de knollen met ozon bij het inschuren en tijdens de bewaring heeft de uitbreiding van zilverschurft niet aantoonbaar beperkt. Ook de behandeling op 18 juli, waarbij de knollen met ozon behandeld zijn gevolgd door een behandeling met UV-licht had geen schimmeldodend effect op zilverschurft.

De vitaliteit van het pootgoed is beoordeeld door een aantal aspecten van de kieming waar te nemen aan het einde van de bewaarperiode; in april/ mei. Hieruit is vastgesteld dat ozon op deze aspecten van de kieming geen negatief effect heeft.



Foto 1. Een transportband met kap om aardappelknollen tijdens de behandeling 15 seconden in contact te brengen met een hoge concentratie ozon.



Foto 2. Het verder vullen van de kuubskist op 7 oktober nadat 9 zakjes met monsters halverwege in de kuubskist zijn gelegd.

1 Inleiding

In Flevoland en Noord-Holland zijn ongeveer 2000 bewaarplaatsen voor aardappelen in bedrijf. Deze aardappelen worden voor een groot gedeelte beschermd tegen schimmel- en bacterieziekten door het inzetten van chemische ontsmetting van het product en de materialen. Ondanks deze inzet van chemische middelen is er toch nog veel verlies aan product(kwaliteit) als gevolg van ziekten. Maar mogelijk is er een nieuwe oplossing; namelijk ozon.

De techniek van ozon voor ontsmetting heeft de laatste jaren een grote vlucht genomen. Dit vooral als ontsmetting van water in o.a. koelsystemen. Ozon heeft als voordeel dat het een volkomen natuurlijke stof (gas) is, dat bijzonder snel weer afbreekt in normale zuurstof. Ook zonder water zijn er mogelijkheden als ontsmettingsmiddel. In de VS is al enige ervaring met ozon bij ontsmetting van aardappelbewaarplaatsen en het opgeslagen product. Ook in Nederland is al enig oriënterend werk verricht naar de mogelijkheden van ozon; zie ook bijlage 1.

Hieruit blijkt dat de toepassing bij de bewaring van aardappelen perspectieven biedt. Er is nog een aantal vragen over effectiviteit (tegen ziekten en plagen), veiligheid (schade aan product) en technische aspecten van de toepassing. Voor een succesvolle introductie van de mogelijke toepassing van ozon bij de bewaring moeten antwoorden gegeven zijn op deze essentiële vragen.

Hiertoe is een samenwerking tot stand gekomen met Tolsma Techniek Emmeloord B.V., Excellent Ozone Systems B.V. (EOS) en CU Ozone B.V.

Tolsma is marktleider in Nederland m.b.t. inrichting en adviezen voor aardappelbewaring. Excellent Ozone Systems is marktleider in Nederland m.b.t. het leveren van ozongeneratoren en service CU Ozone BV is leverancier van kennis op het vlak van agrarische ozontoepassingen in Nederland.

Deze samenwerking heeft geleid tot een uitgebreide proef in het bewaar seizoen 2005/2006 bij een pootgoedteler in de Noordoostpolder waarbij pootgoed op de band tijdens het inschuren is behandeld met een hoge concentratie ozon en vervolgens tijdens de bewaarperiode tot april met een lage concentratie ozon. Ook bij het uitschuren is een behandeling uitgevoerd. Er zijn monsters genomen waaraan het effect van ozon op bacterieziekte, zilverschurft en Phytophthora en de kiemkracht is nagegaan. Daarnaast vond tijdens de bewaring nog een oriënterende praktijkproef plaats op het effect van ozon op bacterieziekte.

Als gevolg van onverwachte problemen met de bacterietoetsingen zijn in het najaar van 2006 de proefnemingen op een fundamentele wijze, met een proefopstelling met Erwinia-bacteriën op voedingsbodems in petrischalen, voortgezet.

In dit verslag zijn eerst de resultaten van de behandelingen met ozon op Erwinia-bacteriën beschreven en vervolgens op Phytophthora, zilverschurft en vitaliteit pootgoed. Alleen bij Erwinia zijn drie verschillende proeven met ozon uitgevoerd.

Bij de proef die begon met een ozonbehandeling bij het inschuren is, voor zover dit mogelijk was, het effect van de inschuurbehandeling, de behandeling tijdens de bewaarperiode en de behandeling tijdens het uitschuren apart beschreven.

In Hoofdstuk 2 Werkwijze is de werkwijze globaal beschreven, meer gedetailleerde informatie staat in Bijlage 2.

2 Werkwijze

2.1 Erwinia

2.1.1 Inschuur- en bewaarbehandeling

Behandelingen

De behandelingen met ozon zijn uitgevoerd met een partij Agria-pootgoed bij

- A. het inschuren op 23 september met een concentratie van 400-600 ppm gedurende maximaal 15 seconden en
- B. tijdens de bewaring van 7 oktober tot 10 april met een concentratie tot 15 december van ongeveer 0,5 ppm en daarna 1 ppm continu.

Monsternames (proef in 3-voud)

30 Monsters van 30 knollen zijn voor de inschuren behandeld met een suspensie van 10^8 bacteriën per ml van *Erwinia chrysanthemi* (Ech). Na behandeling zijn ze op volgende tijdstippen bij de NAK getoetst met behulp van verrijking/ ELISA op Ech en Eca (*Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica*).

- 6 monsters op 27 september
- 12 monsters op 31 januari
- 12 monsters op 10 april.

Wijze van bemonstering bij de NAK

Een positieve reactie betekent dat de bacterie in het medium is aangetoond. Bij een monster van 30 knollen is steeds het schilweefsel van 3 knollen samengevoegd zodat er per monster maximaal 10 positieve reacties zijn.

2.1.2 Praktijkproef

De behandelingen met ozon zijn uitgevoerd bij drie partijen; één partij Agria, één partij Picasso S en één partij Picasso SE. In Agria waren in het veld enkele bacteriezieke planten waargenomen, in Picasso S waren in de nacontrole 4 positieve reacties vastgesteld en in Picasso SE waren bij toetsing 2 positieve reacties vastgesteld met Ech en 0 bij Eca.

Behandelingen

1. Op 16 januari met een concentratie van 400-600 ppm gedurende maximaal 15 seconden en
2. tijdens de bewaring van 16 januari tot 10 april met een concentratie van 1 ppm continu.

Monsternames (proef in 2-voud)

Na behandeling zijn monsters van 30 knollen op volgende tijdstippen bij de NAK getoetst met behulp van verrijking/ ELISA op Ech en Eca.

- 6 behandelde en 6 onbehandelde monsters op 16 januari en
- 6 behandelde en 6 onbehandelde monsters op 13 april.

2.1.3 Direct effect ozon en ozon+UV-straling op Erwiniabacteriën in petrischalen

Op 28 en 29 november 2006 is een extra proef uitgevoerd waarbij de rechtstreekse doding van ozon en UV op *Erwinia*-bacteriën op voedingsbodems in glazen petrischalen is vastgesteld. Hierbij zijn 7 verschillende inwerktijden van ozon onderzocht op 3 verschillende *Erwinia*-soorten en per soort op 2 verschillende stammen. De behandeling op 28 november vond alleen met ozon plaats en op 29 november met ozon plus UV-licht. UV-licht betekende UV-straling de laatste 30 seconden van de ozonbehandeling. De schalen met *Erwiniabacteriën* zijn door Plant Research International (PRI) geleverd. Na de behandelingen met ozon en ozon+UV is op PRI ook het percentage doding bepaald.

Behandelingen (proef in 3-voud)

Verschillende behandelingstijden met op

- dag 1 400 ppm ozon
- dag 2 400 ppm ozon + de laatste 30 seconden UV-straling

Duur van de behandelingen

- 0 minuten
- 1 minuut
- 5 minuten
- 10 minuten
- 15 minuten
- 1 uur
- 4 uur en met

6 bacteriestammen

- Eca 1601
- Eca 1987
- Ecc 1960
- Ecc 1966
- Ech 1991
- Ech 2019

2.2 Phytophthora

2.2.1 Inschuur- en bewaarbehandeling

Behandelingen met ozon Zie 2.1.1

De wijze van besmettingen en de beoordelingen (proef in 3-voud)

30 Monsters van 50 knollen zijn voor de inschuren behandeld met een sporensuspensie van een agressief isolaat van *Phytophthora infestans*. Vervolgens zijn op de volgende data bij alle monsters de door *Phytophthora* aangetaste knollen geteld en verwijderd.

- 7 oktober
- 31 januari
- 11 april

2.3 Zilvereschurft

2.3.1 Inschuur-, bewaar- en uitschuurbehandeling

Voor de inschuur- en bewaarbehandelingen met ozon Zie 2.1.1

Daarnaast heeft voor zilvereschurft op 18 juli een 'uitschuurbehandeling' plaatsgevonden. Naast een behandeling met ozon is toen ook een behandeling uitgevoerd met ozon gevolgd door UV-licht. Omdat met deze extra behandeling bij het opzetten van de proef geen rekening was gehouden is besloten van de 4 te behandelen objecten de eerste herhaling alleen met ozon te behandelen en de 2^e en 3^e herhaling met ozon gevolgd door UV-licht.

De wijze van besmetten en de beoordelingen (proef in 3-voud)

54 Monsters van 50 knollen zijn voor de inschuren behandeld met een sporensuspensie van *Helminthosporium solani*. Vervolgens zijn op de volgende data monsters te incuberen gezet en 10 dagen later beoordeeld op mate van bedekking met zilvereschurft.

- 6 monsters op 11 november
- 12 monsters op 3 februari
- 12 monsters op 24 april en

- 24 monsters op 5 augustus

Op 5 augustus zijn ook bij monsters van 10 knollen de zilverschurftsporen afgewassen en deze sporen vervolgens onder de microscoop op mogelijke afwijkingen beoordeeld.

2.4 Vitaliteit pootgoed

2.4.1 Inschuur- en bewaarbehandeling

Behandelingen met ozon Zie 2.1.1.

Monsters en beoordelingen (proef in 3-voud)

Er zijn op 11 april monsters genomen van 30 knollen van gelijke potmaat voor de objecten AOBO, AOB1, A1B0 en A1B1. Dus 4 behandelingen x 3 herhalingen x 30 knollen. Deze knollen zijn bij 18 graden donker geplaatst en na 30 dagen op kieming beoordeeld. Kiemen met zwarte punten zijn apart geteld.

2.5 Statistische verwerking

De gegevens zijn statistisch verwerkt met het programma Genstat for Windows, eight edition. In een aantal tabellen is de lsd (5%) opgenomen. Dit is de "Least Significant Difference"; het kleinste verschil tussen de objecten dat nog significant is bij een onbetrouwbaarheid van 5 procent.

Ook wordt over de "F probability" gesproken. Dit cijfer geeft de kans aan – uitgedrukt als percentage - dat de verschillen tussen de objecten door het toeval tot stand zijn gekomen. Als de F-probability kleiner is dan 5%, dan wordt aangenomen dat dit te klein is om aan het toeval toe te schrijven, zodat verondersteld wordt dat er wezenlijke verschillen zijn tussen de objecten. Tussen de 5 en 10% wordt niet als wezenlijk verschil gezien maar het neigt er wel toe.

3 Resultaten en discussie

3.1 Erwinia

3.1.1 Inschuurbehandeling

In tabel 1 zijn de resultaten van de toetsing van de inschuurbehandeling bij de NAK weergegeven en in de laatste kolom het percentage bacterierotte knollen in de op het PPO bewaarde monsters.

Tabel 1. **Het percentage positieve reacties bij Ech als Eca op 27 september en het percentage bacterierotte knollen op 4 oktober op het PPO.**

| Object | | NAK | NAK | PPO |
|------------|------------------------|-----|------|-------|
| | | Ech | Eca | % rot |
| A0 | Geen ozon | 100 | 48,5 | 35,0 |
| A1 | Ozon bij het inschuren | 100 | 41,5 | 18,1 |
| Lsd (0,05) | | | 6,4 | 13,5 |

De kunstmatige besmetting met Ech (*Erwinia chrysanthemi*) is gelukt. Alle monsters reageerden voor 100% positief in de toets. Het aantal positieve reacties is door de ozonbehandeling niet verminderd.

Er was ook een besmetting met Eca (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*). Iets minder dan de helft van de reacties was positief. Deze, waarschijnlijk, natuurlijke besmetting is betrouwbaar door ozon verminderd. Op 4 oktober, toen alle resterende monsters op het PPO in één cel bij 18°C lagen, bleek dat er (nat)rot in de monsters aanwezig was. De geheel en gedeeltelijk rotte knollen zijn uit de kunststof zakjes verwijderd. Het verwijderde percentage rotte knollen is in tabel 1 weergegeven.

Bij de met ozon behandelde knollen was gemiddeld 18% rot en bij de niet met ozon behandelde knollen 35%. Ozon heeft dus de ontwikkeling van rot significant tegengegaan.

3.1.2 Bewaring oktober - januari

In tabel 2 zijn de resultaten van de toetsing weergegeven van de knollen die op 31 januari naar de NAK zijn gebracht.

Tabel 2. **Het percentage positieve reacties bij Ech als Eca op 31 januari.**

| Object | | Ech | Eca |
|------------|---|------|------|
| A0B0 | Geen ozon | 96,7 | 20,0 |
| A0B1 | Ozon van oktober tot januari | 100 | 3,7 |
| A1B0 | Ozon bij het inschuren | 100 | 0,0 |
| A1B1 | Ozon bij het inschuren en van oktober tot januari | 100 | 6,7 |
| Lsd (0,05) | | 5,8 | 27,8 |

Ondanks de verandering in wijze van toetsing zijn op één reactie na nog steeds alle Ech-reacties positief. Er zijn geen betrouwbare verschillen en er kan dus geen uitspraak worden gedaan over het effect van de ozonbehandeling bij het inschuren en tijdens de bewaring van oktober tot eind januari op de hoeveelheid Ech-bacteriën. Het aantal positieve reacties op Eca is sinds september wel gedaald. (Met dit organisme is niet kunstmatig besmet.) Dat het aantal positieve reacties bij Eca is gedaald, kan door de verandering in wijze van toetsing komen; wel een stuk schilweefsel maar er is niet meer inclusief het navelende. Ozon lijkt de besmetting met Eca beperkt te hebben. Bij het niet behandelde object A0B0 was de Eca-besmetting gemiddeld het hoogst. De verschillen zijn echter **niet** betrouwbaar.

3.1.3 Bewaring januari - april

In tabel 3 zijn de resultaten van de toetsing bij de NAK weergegeven op 10 april.

Tabel 3. **Het percentage positieve reacties bij Ech als Eca op 10 april.**

| Object | | Ech | Eca |
|--------|---|-----|-----|
| A0B0 | Geen ozon | 100 | 0 |
| A0B1 | Ozon van oktober tot april | 100 | 0 |
| A1B0 | Ozon bij het inschuren | 100 | 0 |
| A1B1 | Ozon bij het inschuren én van oktober tot april | 100 | 6,7 |

Bij deze toetsing waren alle reacties bij Ech positief en kan dus opnieuw geen uitspraak worden gedaan op het effect van ozon. Bij Eca is het aantal positieve reacties sinds de vorige toetsing in januari nog verder teruggelopen. Ozon heeft deze afname niet bevorderd.

3.1.4 Extra praktijkproef 16 januari

Van de extra praktijkproef zijn 12 van de 24 monsters direct na de behandeling op de band naar de NAK gebracht om het effect van ozon op de besmetting van de knollen met Eca en Ech bacteriën te onderzoeken. In tabel 4 zijn de gemiddelde resultaten van de twee herhalingen weergegeven.

Tabel 4. **Percentage positieve reacties bij Ech als Eca bij drie partijen pootgoed die wel en niet met ozon zijn behandeld, direct na de inschuurbehandeling op 16 januari.**

| Partij → | Picasso SE | | Agria | | Picasso S | |
|-----------|------------|-----|-------|-----|-----------|-----|
| | Ech | Eca | Ech | Eca | Ech | Eca |
| Geen ozon | 20 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| Wel ozon | 35 | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 |

Uit de resultaten blijkt dat bij Eca geen enkel monster positief was en er dus totaal geen Eca in de monsters is aangetoond. Dit was bij het ras Agria ook voor Ech het geval. Alleen in de beide partijen Picasso waren enkele reacties met Ech positief. De ozonbehandeling heeft deze besmetting echter niet teruggedrongen.

De andere monsters zijn op 13 april onderzocht. De resultaten hiervan staan in tabel 5. Hierbij is wel ozon dus zowel een ozonbehandeling op de band als in de bewaarplaats van 16 januari tot 12 april.

Tabel 5. **Percentage positieve reacties bij Ech als Eca bij drie partijen pootgoed die wel en niet met ozon behandeld zijn. Tijdstip toetsing direct na de bewaarperiode op 13 april.**

| Partij → | Picasso SE | | Agria | | Picasso S | |
|-----------|------------|-----|-------|-----|-----------|-----|
| | Ech | Eca | Ech | Eca | Ech | Eca |
| Geen ozon | 35 | 10 | 10 | 0 | 25 | 0 |
| Wel ozon | 15 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |

Uit tabel 5 blijkt dat het gemiddeld percentage positieve reacties ten opzichte van januari nauwelijks is veranderd. Bij Eca is nu in één partij een besmetting vastgesteld; bij Picasso SE in een monster dat niet met ozon is behandeld.

Bij Ech zijn er meer positieve reacties; deze keer méér in de niet met ozon behandelde monsters dan in de wel behandelde. De behandeling met ozon lijkt dus de besmetting met Ech beperkt te hebben. Het verschil is echter **net niet** statistisch betrouwbaar ($F_{pr}=0,054$).

Wat de rassen betreft heeft bij de tweede monstersserie ook bij Agria één monster positief gereageerd bij Ech. Gemiddeld over beide data had Agria betrouwbaar minder positieve reacties dan de beide Picassopartijen die onderling niet betrouwbaar verschilden.

3.1.5 Doding Erwinia's op voedingsbodems

Uit de statistische verwerking van deze proef blijkt dat alle verschillen betrouwbaar zijn. Er is ook een betrouwbare interactie tussen Erwiniastammen, behandelingstijden en wel of geen aanvullend UV-licht. Dit betekent dat in feite over de hoofdeffecten zelf geen uitspraken kunnen worden gedaan. Om het bespreekbaar te maken is dit toch gebeurd.

In bijlage 3 zijn de dodingpercentages per object weergegeven. Hier worden de belangrijkste objectverschillen besproken.

Het gemiddelde dodingpercentage was 4,6%. Dit is laag.

Erwiniastam

In tabel 6 is de gemiddelde doding per Erwiniastam weergegeven.

Tabel 6. **De gemiddelde doding per Erwinia-stam.**

| Stam | Eca 1601 | Eca 1987 | Ecc 1990 | Ecc 1996 | Ech 1991 | Ech 2019 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| % doding | 2.6 | 3.0 | 3.7 | 1.2 | 8.7 | 8.2 |

Er waren betrouwbare verschillen in doding tussen de Erwinia-stammen. De l.s.d. was 1.1. Dit betekent dat bij Ech betrouwbaar meer doding plaats had gevonden dan bij de beide andere Erwinia-soorten. Tussen de beide stammen van Ecc was ook een betrouwbaar verschil aanwezig. Ecc 1996 was het moeilijkst te doden.

Behandelingstijd en UV

In tabel 7 is het percentage doding weergegeven zonder en met UV-licht en na verschillende behandelingstijden.

Tabel 7. **De gemiddelde doding na de verschillende behandelingstijden; met en zonder UV-licht en gemiddeld.**

| | 0 min | 1 min | 5 min | 10 min | 15 min | 1 uur | 4 uur | gemiddeld |
|-----------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-----------|
| zonder UV | 0.3 | 0.9 | 1.2 | 1.2 | 1.8 | 8.3 | 7.5 | 3,0 |
| met UV | 0.2 | 1.6 | 3.1 | 3.5 | 3.6 | 11.5 | 19.3 | 6,1 |
| Gemiddeld | 0,2 | 1,3 | 2,1 | 2,3 | 2,7 | 9,9 | 13,4 | 4,6 |

Gemiddeld was het percentage doding op de eerste dag zonder UV-licht 3,0% en de tweede dag met UV-licht 6,1%. Deze gemiddeld hogere doding zou door het UV-licht veroorzaakt kunnen zijn maar ook door verschillende omgevingsomstandigheden en dergelijke. Het percentage doding nam toe met de behandelingstijd. Voor de gemiddelden op de verschillende tijdstippen was de l.s.d. 1,2. Dit betekent dat de gemiddelden tussen 5, 10 en 15 minuten niet betrouwbaar verschilden. Ook is opvallend dat de eerste dag, de dag zonder aanvullend UV-licht, de doding tussen 1 en 4 uur niet toenam. Teleurstellend is dat de gemiddelde doding na 4 uur behandeling met ozon nog maar 13% was.

3.1.6 Bespreking resultaten Erwinia-bacteriën

Bij de eerste Erwinia-proef waarbij het pootgoed kunstmatig met Ech besmet was, gaven alle bemonsteringen een positieve reactie te zien. Achteraf is duidelijk geworden dat de door de NAK uitgevoerde Elisatoets met verrijking minder verrijkt (ongeveer 1000x) dan was aangenomen. Verrijking houdt in dat de nog levende bacteriën zich in het medium kunnen vermeerderen. Maar de Elisa-toets als zodanig maakt geen onderscheid tussen dode en levende bacteriën en omdat de opgebrachte dichtheid van bacteriën hoog was (100.000.000 per ml), waren uiteindelijk alle reacties positief.

Toepassing van ozon tijdens het inschuren zorgde voor een significante vermindering van de besmetting met Eca. Ook het aantal rotte knollen op 4 oktober was na behandeling met ozon betrouwbaar lager. De bemonstering op 31 januari liet een tendens zien dat ozon de Eca-besmetting beperkt had. Ook de praktijkproef van 16 januari liet na de gecombineerde behandeling op de band bij het vullen van de kisten en

in de bewaring van 16 januari tot 10 april bij Ech een tendens zien dat de besmetting lager was. In theorie zou het, wat betreft het aantal rotte knollen op 4 oktober, ook nog kunnen dat het verschil in aantal rotte knollen veroorzaakt is doordat de met ozon behandelde monsters in de 40 seconden dat ze tijdens de behandeling op 23 september uit de plastic zak zijn geweest, iets aangedroogd zijn waardoor een deel van de Ech-bacteriën is doodgegaan (het was een warme, zonnige droge dag). De niet met ozon behandelde knollen zijn op dat moment niet uit de plastic zakken geweest.

De doding van Erwinia's op de voedingsbodems viel tegen. Er was weliswaar een betrouwbaar effect maar slechts gemiddeld 13% na 4 uur 400 ppm ozon was weinig. De oorzaak van dit beperkte effect is niet duidelijk geworden.

Al met al is wel duidelijk dat toepassing van ozon Erwinia-bacteriën versneld doet afsterven. Niet duidelijk is geworden of een korte hoge dosering tot een beter resultaat leidt dan een langdurige lage dosering of dat de combinatie noodzakelijk is. Er is meer onderzoek nodig om de toepassing verder te optimaliseren.

3.2 Phytophthora

3.2.1 Inschuurbehandeling

Na de behandeling op 23 september zijn alle monsters bij 18 graden en een hoge luchtvochtigheid opgeslagen. Ideale omstandigheden dus voor de schimmel om zich snel van een geslaagde infectie tot een rotte knol te ontwikkelen.

Op 7 oktober zijn de door Phytophthora aangetaste knollen geteld en uit alle monsters verwijderd. In tabel 8 is het gemiddelde percentage aangetaste knollen per 750 knollen weergegeven.

Tabel 8. **Het percentage door Phytophthora aangetaste knollen op 7 oktober.**

| object | | % |
|------------|------------------------|------|
| A0 | Geen ozon | 34,2 |
| A1 | Ozon bij het inschuren | 30,3 |
| Lsd (0,05) | | 7,2 |

Na 7 oktober zijn de monsters deels (6 monsters) bij 18 graden blijven staan. Dit waren de monsters waar nog nagegaan moest worden in hoeverre er Phytophthorarot bij kwam. Op 31 januari zijn deze opnieuw beoordeeld en bleek dat er zowel bij A0 als A1 2% rotte knollen bij was gekomen.

Uit het percentage rotte knollen blijkt dus dat de kunstmatige besmetting op 23 september goed is geslaagd. Na 14 dagen is één derde van de knollen aangetast. De spreiding in aantasting tussen de herhalingen was groot. Het liep uiteen van 18 tot 50%. Er lijkt een beperkt effect van de ozonbehandeling te zijn, maar dit is **niet** statistisch betrouwbaar.

3.2.2 Bewaring oktober - januari

Op 29 januari zijn de monsters uit de kuubskisten gekomen (object A0B1 en A1B1) en op 31 januari is de hoeveelheid aangetaste knollen geteld die er tussen 7 oktober en 31 januari is bijgekomen.

De resultaten van de wel als niet met ozon behandelde objecten staan in tabel 9. In tabel 9 is de bemiddelde besmetting van 4 objecten tot 7 oktober weergegeven en de toename tot 31 januari.

Tabel 9. **Het percentage Phytophthora-knollen op 7 oktober en de toename tot 31 januari.**

| Object | | 7 oktober | 31 januari |
|---------|---|-----------|------------|
| A0B0 | Geen ozon | 34 | 2,0 |
| A0B1 | Alleen ozon van oktober tot januari | 32 | 0,7 |
| A1B0 | Alleen ozon bij het inschuren | 29 | 1,1 |
| A1B1 | Ozon bij het inschuren en van oktober tot januari | 32 | 2,0 |
| A0 gem. | | 33 | 1,3 |
| A1 gem. | | 31 | 1,5 |
| B0 gem. | | 32 | 1,5 |
| B1 gem. | | 32 | 1,3 |

Uit de tabel blijkt dat het aantal door Phytophthora aangetaste knollen van 7 oktober tot 31 januari maar weinig meer is toegenomen. De toename varieerde per object van 0,7 tot 2,0%. De toename in aantal aangetaste knollen was bij behandeling met ozon in de bewaarplaats in de periode van oktober tot januari, object B1 gemiddeld, nauwelijks minder dan bij het object zonder ozon in de bewaarperiode van oktober tot januari, object B0 gem. (1,3 t.o.v. 1,5%). De schuurbehandeling van oktober tot januari heeft dus geen effect gehad op de uitbreiding van Phytophthora. Waarschijnlijk zat de aantasting op 7 oktober al in de knollen.

3.2.3 Bewaring januari - april

Op 10 april zijn de monsters weer uit de kuubskisten van de met ozon behandelde bewaarplaats gekomen. Op 11 april zijn alle monsters beoordeeld. Er bleek sinds 31 januari geen enkele rotte knol te zijn bijgekomen. De indrukken over het effect van ozon op Phytophthora zijn dus sinds 31 januari niet veranderd.

3.2.4 Bespreking resultaten Phytophthora infestans

De besmetting en infectie van de knollen met Phytophthora infestans kort (enkele uren) voor de eerste behandeling met ozon op de band is gelukt. Eenderde van de knollen was na 14 dagen rot. Later in de bewaring kwamen daar maar weinig rotte knollen meer bij. De behandeling met ozon had geen betrouwbaar effect. Er was een agressief isolaat gebruikt. Het resultaat kan betekenen dat ozon niet werkt tegen dit pathogeen. Het kan ook betekenen dat de schimmel 3 uur na het op de knol brengen al onbereikbaar was voor ozon.

3.3 Zilverschurft

3.3.1 Inschuurbehandeling

Op de zilverschurftmonsters (de objecten A0 en A1 voor beoordeling op het eerste behandelingstijdstip) die na de behandelingsdag op 23 september in de vochtige 18 gradencel waren geplaatst, bleek op 9 november nog nauwelijks zilverschurft zichtbaar te zijn. Deze zijn toen nog vochtiger gezet (te incuberen) en op 21 november beoordeeld. De resultaten staan in tabel 10.

Tabel 10. **De bedekking met zilverschurft op 21 november na de inschuurbehandeling op 23 september (gemiddelde van 3 herhalingen).**

| object | | % |
|------------|------------------------|-----|
| A0 | Geen ozon | 1,3 |
| A1 | Ozon bij het inschuren | 0,4 |
| Lsd (0,05) | | 3,7 |

De bedekking is erg laag. Ozon lijkt de bedekking met zilverschurft te hebben tegengegaan maar dit is **niet** statistisch betrouwbaar. De hogere bedekking komt bij het object "geen ozon" door een aanzienlijk hogere

bedekking in één van de 3 herhalingen (3,2% terwijl de andere 5 lager zijn dan 0,5%).

3.3.2 Bewaring oktober - januari

De 6 monsters die op 29 januari uit de kuubskisten kwamen (object A0B1 en A1B1) en de 6 op het PPO bewaarde monsters (object A0B0 en A1B0) zijn na incuberen op 13 februari op mate van bedekking met zilverschurft beoordeeld. De gemiddelde bedekking per object is in tabel 11 weergegeven.

Tabel 11. **Het percentage bedekking van het schiloppervlak met zilverschurft na de behandelingen met ozon tot 31 januari.**

| Object | | % bedekking |
|---|---|-------------|
| A0B0 | Geen ozon | 1,2 |
| A0B1 | Alleen ozon van oktober tot januari | 16,8 |
| A1B0 | Alleen ozon bij het inschuren | 1,2 |
| A1B1 | Ozon bij het inschuren en van oktober tot januari | 12,8 |
| Lsd (0,05) | | 12,3 |
| A0 gem. | | 9,0 |
| A1 gem. | | 7,0 |
| B0 gem. | | 1,2 |
| B1 gem. | | 14,8 |
| Lsd (0,05) tussen A0 en A1 gemiddeld en tussen B0 en B1 gemiddeld | | 8,7 |

Uit tabel 11 blijkt dat de knollen die met ozon behandeld zijn tijdens de bewaarperiode van oktober tot januari (object B1 gemiddeld), significant meer met zilverschurft bedekt waren dan de knollen die zonder ozon waren opgeslagen bij vergelijkbare temperatuur (Object B1 en B0 gemiddeld., 14,8 t.o.v. 1,2%). Tussen de beide objecten die op dezelfde plaats lagen, object A0B0 en A1B0, en A0B1 en A1 B1, waren de verschillen heel beperkt en niet significant.

Een verschil in luchtvochtigheid is waarschijnlijk de verklaring voor het verschil in bedekking met zilverschurft. In de cel op het PPO lagen de zakjes met ieder 50 knollen in poterbakjes los van elkaar, terwijl in de zakjes in de kuubskisten door product omsloten werden. De cel op het PPO werd wel op een hoge RV gehouden.

3.3.3 Bewaring januari - april

De 6 monsters die op 10 april uit de kuubskisten kwamen (object A0B1 en A1B1) en de 6 op het PPO bewaarde monsters (object A0B0 en A1B0) zijn na incuberen op 25 april op mate van bedekking met zilverschurft beoordeeld. De gemiddelde bedekking per knol per object is in tabel 12 weergegeven.

Tabel 12. **Het percentage bedekking van het schiloppervlak met zilverschurft na de behandelingen tot april.**

| Object | | % bedekking |
|---|---|-------------|
| A0B0 | Geen ozon | 1,3 |
| A0B1 | Alleen ozon van oktober tot april | 7,9 |
| A1B0 | Alleen ozon bij het inschuren | 1,9 |
| A1B1 | Ozon bij het inschuren en van oktober tot april | 6,7 |
| Lsd (0,05) | | 9,1 |
| A0 gem. | | 4,6 |
| A1 gem. | | 4,3 |
| B0 gem. | | 1,6 |
| B1 gem. | | 7,3 |
| Lsd (0,05) tussen A0 en A1 gemiddeld en tussen B0 en B1 gemiddeld | | 6,4 |

In tabel 12 zijn dezelfde tendensen te zien die ook al in tabel 11 te zien waren, namelijk dat de bewaring van monsters in kuubskisten de ontwikkeling van zilverschurft meer heeft bevorderd dan de bewaring van monsters in kunststofzakjes in poterbakjes in de geconditioneerde cel op het PPO. De geschatte bedekking van het schiloppervlak was na incubatie in april wel lager dan in januari. Deze keer waren de verschillen tussen B0 en B1 echter niet significant. Dit komt vooral door de grote spreiding in hoeveelheid zilverschurft

tussen de monsters die uit de verschillende kuubskisten kwamen. Tussen de beide objecten die op dezelfde plaats bewaard werden, object A0B0 en A1B0, en A0B1 en A1B1, waren de verschillen weer heel beperkt.

3.3.4 Uitschuurbehandeling

Deze behandeling heeft in aangepaste vorm op 18 juli plaatsgevonden. Daarna zijn de monsters teruggezet bij 3 graden tot de volgende behandeling. Op 20 juli zijn van 12 monsters van 10 knollen de zilverschurftsporen afgespoeld en onder de microscoop op mogelijke afwijkingen beoordeeld. Behalve normaal uitziende sporen waren er ook sporen bij die ingedeukt (beschadigd) leken en sporen die leeg leken (ontbrekende tussenschotjes). Maar duidelijke objectverschillen waren er niet. In tabel 13 zijn de resultaten van de beoordeling op de sporulatie (na incubatie) van 15 augustus weergegeven.

Tabel 13. **De sporulatie van de lesies op 15 augustus (0=geen, 4=maximale sporulatie).**

| Object | | Sporulatie gemiddeld |
|---------------------------------------|---|----------------------|
| A0B0, A0B1, A1B0, A1B1, Herhaling 1 | Niet behandeld op 18 juli | 1,9 |
| A0B0, A0B1, A1B0, A1B1, Herhaling 1 | Alleen met ozon behandeld op 18 juli | 1,9 |
| A0B0, A0B1, A1B0, A1B1, Herhaling 2+3 | Niet behandeld op 18 juli | 2,2 |
| A0B0, A0B1, A1B0, A1B1, Herhaling 2+3 | Met ozon en UV-licht behandeld op 18 juli | 2,2 |

Zowel de behandeling met ozon als de behandeling met ozon + UV-licht hebben de mate van sporulatie na 10 dagen incuberen van de knollen bij 18 graden **niet** kunnen beperken ten opzichte van de niet behandelde op 18 juli. Dat herhaling 1 gemiddeld een geringere sporulatie had dan herhaling 2 en 3 hing samen met de plaats van de monsters in de kisten in de praktijkbewaarcel.

3.3.5 Bespreking resultaten zilverschurft

De infectie van de knollen door zilverschurft is na besmetting met de sporen op 23 september niet goed gelukt. Het is niet duidelijk waarom niet. Er zijn geen duidelijke effecten van ozon op zilverschurft vastgesteld. Wel was de bedekking met zilverschurft na de bewaring in kuubskisten in de ruimte die continu met ozon werd behandeld groter dan in de niet met ozon behandelde ruimte. Dit is waarschijnlijk veroorzaakt door de vochtiger en mogelijk warmere omstandigheden van de monsterzakjes in de kuubskisten dan in de poterbakjes, waardoor de omstandigheden daar gunstiger waren voor de schimmel en zilverschurftontwikkeling.

Ook de behandeling op 18 juli waarbij de knollen met ozon behandeld zijn gevolgd door een behandeling met UV-licht had geen effect op zilverschurft.

3.4 Vitaliteit pootgoed

Het gewicht aan kiemen op 11 april, het percentage gewichtsverlies van de knollen tussen 11 april en 11 mei, het aantal grotere kiemen per knol op 11 mei, het aantal kiemen met zwarte punten op 11 mei zijn in tabel 14 weergegeven. De getelde kiemen op 11 mei waren veelal groter dan 10 mm en kleurden blauw. De kleinere waren veelal nog wit. De langste kiemen waren 50 mm lang. De kleinere kiemen zijn niet geteld. Dit waren er 2 tot 6 per knol, het aantal was nogal variabel. Bij de grotere kiemen kwamen soms meerdere kiemen uit een topog. Dit was waarschijnlijk veroorzaakt doordat de topspruit verdwenen was.

Tabel 14. **Kiem- en knolwaarnemingen op 11 april en 11 mei. De gewichten zijn in grammen versgewicht per knol; de aantallen kiemen zijn per knol.**

| Object | | Gewicht kiemen 11 april | % gewichtsverlies knol 11 mei | Gewicht kiemen 11 mei | Aantal kiemen 11 mei | Aantal kiemen met zwarte punten, 11 mei |
|---|---|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------|---|
| A0B0 | Geen ozon | 0,0 | 4,7 | 1,3 | 4,0 | 0,6 |
| A0B1 | Alleen ozon van oktober tot april | 0,4 | 5,9 | 1,6 | 3,7 | 0,7 |
| A1B0 | Alleen ozon bij het inschuren | 0,0 | 4,6 | 1,5 | 4,8 | 0,7 |
| A1B1 | Ozon bij het inschuren en van oktober tot april | 0,2 | 5,6 | 1,5 | 3,9 | 0,5 |
| Lsd (0,05) | | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 1,0 | 0,3 |
| A0 gem. | | 0,2 | 5,3 | 1,5 | 3,8 | 0,7 |
| A1 gem. | | 0,2 | 5,1 | 1,5 | 4,4 | 0,6 |
| B0 gem. | | 0,0 | 4,7 | 1,4 | 4,4 | 0,7 |
| B1 gem. | | 0,3 | 5,7 | 1,6 | 3,8 | 0,6 |
| Lsd (0,05) tussen A0 en A1 gemiddeld en tussen B0 en B1 gemiddeld | | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,7 | 0,2 |

Uit tabel 14 blijkt dat het gemiddelde kiemgewicht van B1 op 11 april, dit zijn de knollen die op 10 april uit de kuubskisten kwamen, 0,3 gram per knol was. Dit is het versgewicht van de kiemen. Deze kiemen waren daags nadat de monsters uit de kisten waren gekomen, als gevolg van afbreken en beschadiging, al voor een belangrijk deel ingedroogd. Het gewichtsverlies van de knollen was in de 30 dagen daarna, bij de knollen die al eerder gekiemd waren, significant groter (5,7% gewichtsverlies ten opzichte van 4,7%) dan bij de knollen die nog nauwelijks gekiemd waren op 10 april.

In aantal kiemen en gewicht van de kiemen waren op 11 mei in beperkte mate betrouwbare verschillen tussen de objecten aanwezig. Object B1 dat op 11 april meer gekiemd was, ontwikkelde in de volgende 4 weken opnieuw meer kiemmassa dan object B0. De ozonbehandelingen leidden niet tot een significant verschil in aantal kiemen met zwarte punten op 11 mei.

Na de waarnemingen op 11 mei zijn de knollen opnieuw bij 18 graden geplaatst. Op 31 mei bleek dat de nieuwgevormde grotere kiemen, 3 tot 5 per knol, gemiddeld 6 cm lang waren en dat circa 10% zwarte punten had. Op het oog was er toen geen verschil tussen de verschillende objecten waarneembaar. Ozon heeft de vitaliteit van de knollen dus in ieder geval niet negatief beïnvloed.

3.4.1 Bespreking vitaliteit pootgoed

De vitaliteit van het pootgoed is vastgesteld door een aantal aspecten van de kieming te beoordelen. De conclusie hieruit is dat ozon hierop geen negatief effect heeft gehad. Als gevolg van de inschuurbehandeling op de band zijn geen verschillen geconstateerd in aantal kiemen en mate van kieming in vergelijking met niet met ozon behandelen. De behandeling met ozon tijdens de bewaring leidde wel tot verschillen, maar deze zijn waarschijnlijk door verschillen in bewaaromstandigheden veroorzaakt tussen de bewaarplaatsen en niet door ozon.

4 Conclusies

Erwinia-bacteriën

1. De behandeling van met *Erwinia chrysanthemi* (Ech) besmette knollen met ozon - een behandeling van monsters in wijdmazige zakjes op een lopende band 4 uur na de besmetting – leidde tot betrouwbaar minder rotte knollen.
2. De behandeling van met *Erwinia chrysanthemi* besmette knollen met ozon - een behandeling van monsters in wijdmazige zakjes op een lopende band 4 uur na de besmetting – leidde volgens de kort na de behandeling uitgevoerde toetsing bij de NAK met behulp van hun standaard Elisa-toets, tot betrouwbaar minder positieve reacties op *Erwinia carotovora*, subsp. *atroseptica* (Eca).
3. Alle toetsingen die bij de NAK zijn uitgevoerd op *Erwinia chrysanthemi* waren positief. De aangebrachte besmetting met deze bacterie was achteraf te hoog. Hiervoor was deze toetsmethode niet geschikt. Voldoende onderscheid tussen levende en dode bacteriën is van groot belang. Het blijkt dat de gebruikte toets dit onderscheid onvoldoende toelaat bij de toegediende hoeveelheden bacteriën.
4. De behandeling van 3 “probleem”partijen pootgoed met ozon op 16 januari op de band en volgende 3 maanden in de bewaarplaats heeft tot de volgende conclusies geleid:
 - a. Eca kwam te weinig voor om iets over het effect van ozon op deze bacterie te kunnen zeggen.
 - b. De behandeling op de band heeft de besmetting met Ech niet kunnen terugdringen en
 - c. de gecombineerde behandeling (inschuren + bewaring) leek de besmetting met Ech terug te dringen. Het effect was echter statistisch net niet significant.
5. De behandelingen van de petrischalen met *Erwinia*-bacteriën in een proefopstelling met ozon en met ozon gevolgd door UV-licht, leidden tot verrassend weinig bacteriedoding. Zelfs na 4 uur behandeling met 400 ppm ozon was de doding gemiddeld over 6 bacteriestammen en wel en niet-UV-licht nog maar 13%. Wel was er
 - a. een betrouwbaar verschil in doding tussen de verschillende *Erwiniastammen*.
 - b. Nam de doding toe met de behandelingstijd en
 - c. Leek 30 seconden aanvullend UV-licht de doding te doen toenemen.

Phytophthora infestans

6. De behandeling met ozon heeft de infectie met *Phytophthora infestans* niet betrouwbaar kunnen verminderen. De besmetting met een agressief isolaat heeft 3 uur voor de inschuurbehandeling plaatsgehad en twee weken voordat de monsters de “ozon”bewaarplaats in gingen.

Zilverschurft

7. De kunstmatige besmetting en infectie van de knollen met zilverschurftsporen is niet goed gelukt. Op de wel aanwezige zilverschurft zijn geen schimmeldodende effecten van ozon op zilverschurft vastgesteld.
8. Ook de behandeling op 18 juli waarbij de knollen met ozon zijn behandeld, gevolgd door een behandeling met UV-licht, had geen duidelijk beschadigend effect op de sporen en geen schimmeldodend effect op zilverschurft in de schil.

Vitaliteit pootgoed

9. De vitaliteit van het pootgoed is beoordeeld door een aantal aspecten van de kieming waar te nemen aan het einde van de bewaarperiode; in april/ mei. Hieruit komt naar voren dat toepassing van ozon zowel tijdens het inschuren als tijdens de bewaring, in dit experiment geen negatief effect heeft gehad op de kieming.

Bijlage 1. Ozon-onderzoek 2004-2005

Resultaten van PPO-onderzoek en onderzoek in samenwerking met Excellent Systems BV en Tolsma BV naar het effect van ozon op aardappelpathogenen.

PPO-onderzoek

Proef 1.

Door PPO werden op elf november 2004 aardappelmonsters in viervoud geplaatst bij 0,7 ppm ozon. Het betrof monsters om de werkzaamheid van ozon tegen Erwinia (bacterie), tegen zilverschorft en Rhizoctonia (beide schimmels) te toetsen. De monsters werden begin februari 2005 uit de cel verwijderd en getoetst. De verblijfsduur was dus bijna drie maanden.

- Erwinia
Alle monsters werden voor het inzetten van de behandeling gelijkelijk zwaar besmet. Na afloop werden alle controlemonsters als 100 % ziek getoetst. Hierbij waren alle reacties per monster zonder uitzondering positief. De behandelde monsters werden gemiddeld op 21 % positief getoetst. Per monster werd slechts een beperkt aantal positieve reacties vastgesteld. De bewaarduur in aanmerking genomen is het reëel om met aanpassingen van het systeem een vrijwel volledige reductie van deze ziekte te bewerkstelligen.
NB. Er is hier gewerkt aan de uitwendige aanwezigheid van de ziekte. Er mag niet worden aangenomen dat de ook voorkomende inwendige aanwezigheid wordt bestreden. Deze maakte dan ook geen onderdeel uit van het experiment. Een (vrijwel) volledige uitwendige bestrijding betekent dan ook geen volledig einde van het probleem, maar wel een enorme stap voorwaarts.
- Zilverschorft
De ontwikkeling van bestaande zilverschorftlesies werd door de behandeling niet verminderd.
- Rhizoctonia
De vitaliteit van op de knollen aanwezige sclerotiën werd met bijna 70 % gereduceerd. De bewaarduur in aanmerking genomen, is het reëel om met aanpassingen in het systeem een vrijwel volledige reductie te bewerkstelligen.

Proef 2.

In het voorjaar werd nog een kortdurend experiment gedaan naar de sporulatie van zilverschorft onder ozonbehandeling.

- In vijfvoud werden monsters met zilverschorftlesies geïncubeerd bij hoge temperatuur en RV. De monsters werden tevoren gewassen, zodat eventuele sporulatie met zekerheid tijdens – en niet voor – het experiment is gevormd. Het bleek dat de semikwantitatief bepaalde sporulatie na de ozonbehandeling zo'n 50% lager was dan bij de controlemonsters. De kwaliteit/vitaliteit van de sporen werd niet bepaald. Het experiment geeft een duidelijke indicatie dat de sporulatie niet volledig wordt geremd, maar toch minder uitbundig lijkt. Vooral wanneer dit ook gepaard zou gaan met een verminderde kwaliteit/vitaliteit van de sporen, zou het effect een wezenlijke reductie van de ziektedruk tijdens bewaring kunnen opleveren.

Gezamenlijk onderzoek Excellent systems BV, Tolsma BV en PPO

Proef 3.

Dit experiment werd van 7 tot 22 april 2005 uitgevoerd in een praktijkbewaarploaats van de heer J. de Zeeuw in Espel.

- Erwinia
Op gelijke wijze als hierboven beschreven (maar met een andere stam) werden 8 monsters besmet met Erwinia. Vier monsters stonden van 7 tot 22 april in de cel onder ozon, 4 controlemonsters werden bij PPO in Lelystad bewaard. Alle monsters werden getoetst en alle reacties van alle monsters waren positief. Dit betekent niet dat er geen enkel effect op Erwinia geweest kan zijn, maar wel dat in ieder geval de tijd te kort is geweest om de populaties – al was het maar in een deel van de gevallen – onder de detectiegrens van de toetsing te brengen.
- Zilverschorft
Er zijn knollen met sporulatie (die dus dateert van voor de behandeling) geplaatst in de ozoncel en bij PPO in de controlecel. Onder het binoculair (tot 40 maal vergroting) is er na de behandeling geen verschil waarneembaar tussen de sporen op de behandelde en onbehandelde knollen. Echter, onder de microscoop leken de sporen op de ozonbehandelde knollen toch enigszins aangedaan: de sporen waren kleiner, minder vol en vaker gedeukt dan de sporen van onbehandelde knollen en misten vaker septae (scheidingswandjes). Het is de moeite waard (zie ook hierboven het PPO-onderzoek) te onderzoeken of deze verschijnselen nog te versterken zijn door aanpassingen in de methodiek en of zij betekenis hebben voor de vitaliteit van de sporen.

Proef 4.

Dit experiment werd van 9 tot 10 mei 2005 uitgevoerd in een praktijkbewaarploaats van de heer J. de Zeeuw in Espel.

- Erwinia
Erwinia werd geënt op hout, beton, een voedingsbodem en als druppel in suspensie. Op beton werd met deze kortdurende behandeling een veel duidelijker reductie van Erwinia verkregen dan op hout. Op hout was het resultaat variabel, maar ook op beton was het resultaat nog onvolledig. De afdoding op de voedingsbodem en in suspensie was eveneens onvolledig. Een eventuele reductie in deze laatste twee werd niet vastgesteld (kwantificering te bewerkelijk).
De waargenomen reducties maken het de moeite waard onderzoek naar de verdere optimalisatie van de toepassing te doen. Zo is het in de praktijk heel wel haalbaar om de behandeling langer te laten voortduren.
- Zilverschorft
Ook in deze proef werd vastgesteld dat onder ozon de sporen worden aangetast en wel zodanig dat er weinig sporen waren die uiterlijk nog volwaardig waren in vergelijking met die op de onbehandelde monsters. Dezelfde verschijnselen als in proef 1 werden waargenomen. Zie voor wat betreft de vitaliteit onder zilverschorft proef 3.

PPO, Arjan Veerman

Lelystad, 14 juni 2005

Bijlage 2. Werkwijze in detail

Erwinia

Inschuur- en bewaarbehandeling

Algemeen

De proef is uitgevoerd met pootgoed, ras Agria, maat 40-50 mm. Het pootgoed was schilvast en is voor de behandelingen gewassen en gedroogd.

De met ozon behandelde monsters zijn bij een pootgoedteler bewaard in een grote ruimtelijk gekoelde opslagplaats in wijdmazige kunststof zakjes in houten kuubskisten, de herhalingen in verschillende kisten en deze kisten op verschillende hoogtes in de bewaarplaats. In de kisten lagen de monsters in het midden omdat daar de minst gunstige omstandigheden voor de werking van ozon verwacht werden (worst case-scenario).

Nadat op 23 september de helft van de monsters op de band met ozon (de A1-objecten) behandeld was, zijn alle zakjes met monsters op het PPO te Lelystad opgeslagen in een cel bij 18 graden en een hoge RV. Vervolgens zijn op 7 oktober alle 54 B1-monsters naar de ozon-bewaarplaats gegaan, in de kisten. De B0-monsters zijn in een PPO-cel bewaard die op een gelijke temperatuur werd gehouden als de ozon-bewaarplaats; op dat moment 13 graden, en bij een hoge luchtvochtigheid. Deze temperatuur is, overeenkomstig de temperatuur in ozon-bewaarplaats, langzaam naar 7 graden verlaagd. Tussen 30 januari en 2 februari zijn alle monsters in de PPO-cel bewaard omdat het pootgoed in de ozon-bewaarplaats gesorteerd werd. Een deel van de B1-monsters is vervolgens beoordeeld en een deel (36 monsters) opnieuw in de kuubskisten gelegd tot 10 april. Vanaf 10 april zijn de monsters op het PPO bewaard bij 8,5 graden. Op 11 mei is de temperatuur teruggebracht naar 3 graden.

Ozonconcentraties

De concentratie ozon bedroeg tijdens de inschuurbehandeling op 23 september op de band 400-600 ppm en de monsters werden hieraan maximaal 15 seconden blootgesteld. Tijdens de bewaring was het de bedoeling om de ozonconcentratie steeds op minimaal 1 ppm te houden. Toen uit metingen bleek dat dit niet lukte, is op 15 december het ozonopwekkende apparaat vervangen. In feite was de concentratie tot 15 december ongeveer 0,5 ppm en daarna 1 ppm. Tijdens de uitschuurbehandeling op 18 juli was de ozonconcentratie op de band eveneens 400-600 ppm bij maximaal 15 seconden blootstelling. Daarnaast zijn toen bepaalde monsters (de herhalingen 2 en 3) aansluitend aan de ozonbehandeling aan UV-licht blootgesteld.

Besmettingen en metingen

30 Monsters van 30 knollen zijn voor de inschuren behandeld met een suspensie van 10^8 bacteriën per ml van *Erwinia chrysanthemi* (Ech).

Op 27 september zijn de eerste 6 monsters naar de NAK gebracht om via ELISA / verrijking getoetst te worden op *Erwinia chrysanthemi* (Ech) en *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* (Eca). Bij een toetsing betekent een positieve reactie dat de bacterie in het medium is aangetoond. Bij een monster van 30 knollen is steeds het schilweefsel van 3 knollen samengevoegd zodat er maximaal 10 positieve reacties kunnen zijn.

Uit de overige 24 monsters zijn op 4 oktober de geheel en gedeeltelijk bacterierotte knollen verwijderd; de resterende knollen zijn vervolgens teruggeplaatst in de cel van 18 graden. Op 7 oktober is een deel van de monsters (object B1) naar de ozon-bewaarplaats gegaan voor (verdere) behandeling en de rest naar de PPO-cel.

Tijdens de bewaring zijn twee keer monsters uit de kisten gehaald, op 31 januari en op 10 april en naar de NAK gebracht.

Praktijkproef

Op 16 januari is een extra proef uitgevoerd met 3 praktijkpartijen.

De drie partijen zijn op de band maximaal 15 seconden met 400 tot 600 ppm ozon behandeld en vervolgens in de ozon-bewaarplaats bij 1 ppm ozon continu gezet. Controlemonsters zijn naar de PPO-cel gegaan. Er zijn in tweevoud monsters van 30 knollen genomen en in kuststofzakjes gedaan. De monsters in de ozon-bewaarplaats zijn midden in de kuubskisten gelegd. De controle-monsters zijn in de PPO-cel in poterbakjes gelegd. De helft van de monsters is direct na de behandeling op de band naar de NAK gegaan voor verder onderzoek op Eca en Ech en de andere helft op 13 april.

Het totaal aantal monsters betrof 3 rassen x 4 objecten x 2 herhalingen.

Toetsing direct effect ozon+UV straling op Erwiniabacteriën in petrischalen

Op 28 en 29 november 2006 is een extra proef uitgevoerd bij Excellent te Eerbeek waarbij de rechtstreekse doding van ozon en ozon+UV op Erwinia-bacteriën op voedingsbodems in glazen petrischalen is vastgesteld. Hierbij zijn 7 verschillende inwerk tijden van ozon onderzocht op 3 verschillende Erwiniasoorten en per soort op 2 verschillende stammen. De behandeling op 28 november vond plaats alleen met ozon en op 29 november met ozon plus UV-licht. UV-licht betekende dat de laatste 30 seconden van de ozonbehandeling ook de UV-lampen boven de Petrischalen werden aangezet.

De proef is uitgevoerd in 3-voud. De bacteriën waren door Plant Research International geënt op agar-voedingsbodems in glazen petrischalen en deze schalen stonden open in een experimentele proefopstelling waar ozon door werd geleid. De proefopstelling was een afgesloten bak van 115 bij 35 cm en 15 cm hoog waar 400 ppm ozon doorheen geleid werd. In de kap zaten UV-lampen. De afstand tussen UV-lampen en de glazen petrischalen was 15 tot 20 cm.

De behandelingstijden

Dit liep anders dan gepland was. Het bleek dat het 2 minuten duurde voordat de ozonconcentratie in het behandelingscompartiment was opgebouwd. Daarom moesten de kortste geplande behandelingstijden ook aangepast worden. Deze 2 minuten zijn niet bij de behandelingstijd geteld.

Behandelingstijden:

geen ozon en UV; de schalen met Erwinia-bacteriën zijn alleen meegereisd

1 minuut ozon

5 minuten ozon

10 minuten ozon

15 minuten ozon

1 uur ozon en

4 uur ozon

De 6 Erwiniastammen x 3 herhalingen x 2 UV-objecten x 7 behandelingstijden leverden 252 cijfers op.

Deze cijfers zijn min of meer de percentages gedode bacteriën per schaal zoals ze de dag na de behandeling bij Plant Research International (PRI) zijn vastgesteld. De cijferreeks was bijna compleet. Er ontbraken slechts 12 waarnemingen.

Phytophthora infestans

De gewassen en gedroogde Agria-knollen zijn op 23 september, om 12 uur, met een sporensuspensie van Phytophthora infestans bespoten. De monstergrootte was 50 knollen. Voor de besmetting van de knollen is een agressief isolaat gebruikt. De monsters zijn omstreeks 15 uur op de band met ozon behandeld.

Na de inschuurbehandeling zijn alle monsters op het PPO opgeslagen. Op 7 oktober zijn in de monsters de door Phytophthora aangetaste knollen geteld en verwijderd. Vervolgens zijn de B1-monsters in de kisten in de ozon-bewaarplaats gegaan. Op 31 januari en 11 april zijn alle Phytophthoramonsters weer op rotte knollen beoordeeld.

Zilverschurft

Ook voor deze ziekte zijn op 23 september 's morgens monsters van 50 knollen geïncubeerd met een sporensuspensie van *Helminthosporium solani* en om 15 uur behandeld (object A) met ozon.

Voor de beoordeling op mate van bedekking met zilverschurft worden de knollen eerst 10 dagen bij 18 graden warm en vochtig gelegd (geïncubeerd) zodat de aangetaste plekken beter waar te nemen zijn.

Het object A1 dat op 23 september met ozon behandeld is en het ermee vergelijkbare niet behandelde object A0 zijn op 21 november beoordeeld op bedekking met zilverschurft. De beoordeling na de bewaring tot 29 januari vond op 13 februari plaats en na de volgende periode tot 10 april op 4 mei. Op 18 juli vond de "uitschuurbehandeling" plaats. Naast een behandeling met ozon is toen ook een behandeling uitgevoerd met ozon gevolgd door UV-licht, waarbij voor de laatste behandeling de knollen van bovenaf met UV-licht werden beschenen en over een rollenband rolden. Bij deze behandeling zijn de knollen, anders dan bij de eerste behandeling, los over de banden gegaan. Omdat met deze extra behandeling bij het opzetten van de proef geen rekening was gehouden, is besloten van de 4 te behandelen objecten de eerste herhaling alleen met ozon te behandelen en de 2^e en 3^e herhaling met ozon gevolgd door UV-licht.

Het effect op zilverschurft is op deze monsters vastgesteld

- door bij monsters van 10 knollen de zilverschurftsporen af te wassen en deze sporen vervolgens onder de microscoop op mogelijke afwijkingen te beoordelen en
- door de monsters te incuberen te zetten en de mate van sporulatie van de zilverschurftvlekken vast te stellen.

De beoordeling van de sporulatie na de behandeling op 18 juli vond op 15 augustus plaats. Tussen 10 april en het te incuberen zetten op 5 augustus zijn de knollen eerst bij 8,5 graad en vanaf 11 mei bij 3 graden bewaard. Het effect van een ozonbehandeling bij het uitschuren is alleen voor zilverschurft nagegaan.

Vitaliteit pootgoed

Voor het bepalen van de kiemkracht zijn monsters genomen van 30 knollen. Dit is gebeurd bij de objecten AOB0, AOB1, A1B0 en A1B1. Dus 4 behandelingen x 3 herhalingen x 30 knollen. Object A1 is op 23 september met ozon behandeld en object B1 is van 7 oktober tot 10 april.

De kiemkracht van het pootgoed is bepaald door de knollen in april-mei 30 dagen bij 18 graden in het donker te laten kiemen. Toen de monsters op 10 april uit de kuubskisten kwamen, waren de knollen in de kisten al gekiemd met kiemen tot 5 cm lang. Op 11 april zijn deze kiemresten van de knollen verwijderd en gewogen. Ook de knolmonsters in de PPO-cel waren iets gekiemd, maar te kort om te kunnen afkiemen. De knollen zijn bij 18 graden in het donker gezet en na 30 dagen afgekiemd en kiemen en knollen gewogen. Ook zijn apart de kiemen met zwarte punten geteld.

Bijlage 3. Doding Erwinia's in petrischalen

Toetsing direct effect ozon+UV straling op Erwiniabacteriën in petrischalen

In tabel 15 is het percentage doding weergegeven gemiddeld over de 3 herhalingen per behandelingsduur, zonder en met UV en per bacteriestam.

Tabel 15. **Het percentage doding als gevolg van ozon en ozon +UV, bij de 6 bacteriestammen en de verschillende behandelingsduren. Gem. is het gemiddelde van de 7 behandelingsduren.**

| tijd | Eca 1601 | | Eca 1987 | | Ecc 1990 | | Ecc 1996 | | Ech 1991 | | Ech 2019 | |
|--------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | -uv | +uv | -uv | +uv | -uv | +uv | -uv | +uv | -uv | +uv | -uv | +uv |
| 0 min | 0.02 | 0.05 | 0.03 | 0.27 | 0.03 | 0.12 | 0.49 | -1.5 | 1.1 | 0.9 | 0.21 | 1.0 |
| 1 min | 0.3 | 1.2 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 1.3 | 0.42 | 1.0 | 2.0 | 4.1 | 1.6 | 1.7 |
| 5 min | 0.7 | 1.6 | 0.8 | 1.4 | 1.4 | 2.8 | 0.41 | 1.8 | 1.7 | 6.4 | 2.1 | 4.6 |
| 10 min | 0.9 | 2.7 | 0.6 | 1.7 | 0.9 | 3.9 | 0.60 | 1.5 | 1.8 | 4.3 | 2.4 | 6.8 |
| 15 min | 1.0 | 2.0 | 0.6 | 2.2 | 1.5 | 6.4 | 0.38 | 1.3 | 4.0 | 5.7 | 3.3 | 4.2 |
| 1 uur | 1.7 | 1.0 | 4.4 | 1.4 | 4.8 | 8.1 | 0.61 | 2.0 | 24.2 | 36.6 | 13.9 | 20.2 |
| 4 uur | 5.6 | 18.0 | 9.7 | 18.2 | 5.8 | 14.7 | 1.23 | 5.9 | 9.6 | 19.9 | 13.3 | 38.8 |
| Gem. | 1.5 | 3.8 | 2.4 | 3.7 | 2.1 | 5.3 | 0.6 | 1.7 | 6.3 | 11.1 | 5.3 | 11.0 |