

KWR 2017.013 | Februari 2017

Structurele aanpak microbiologische waterkwaliteits- problemen bij teelt op water en substraat

Structurele aanpak microbiologische waterkwaliteitsproblemen bij teelt op water en substraat

KWR 2017.013 | Februari 2017

Opdrachtnummer

400993

Projectmanager

Luc Hornstra

Opdrachtgever

TKI

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteur

Luc Hornstra

Verzonden aan

TKI projectpartners

Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

Dr. Luc Hornstra

T 0306069628

E luc.hornstra@kwrwater.nl

Voorwoord

Binnen dit project heeft KWR samen met een aantal partners de chemische samenstelling en microbiologische eigenschappen van het gietwater in kaart gebracht om op basis hiervan te komen tot een eerste mogelijkheid om de kwaliteit van het gietwater te bepalen. Hierbij is gebruik gemaakt van state-of-the-art moleculair microbiologische methodes om de microbiologische samenstelling van het gietwater vast te stellen, en de biologische stabiliteit van het water te bepalen. Het einddoel is enerzijds het bepalen van de relevante waterkwaliteitsparameters bij teelt op water/substraat, en anderzijds het genereren van kennis om een beschermende microflora in deze systemen in de toekomst systematisch verder te kunnen verbeteren, waardoor groei van plantpathogene micro-organismen worden onderdrukt.

De projectpartners zijn:

LTO-Glaskracht. LTO-Glaskracht behartigt de belangen van de telers op alle aspecten die spelen rondom de teelt. Het beheersen van de waterstromen, en de waterkwaliteit die nodig is voor het telen onder optimale condities zijn belangrijk voor alle soorten teelten. LTO-Glaskracht stimuleert onderzoek waarmee de tuinbouwsector haar voorsprong kan behouden en verder uitbouwen.

Milispec International. Milispec heeft ervaring met het bepalen van de totale hoeveelheid aanwezige micro-organismen middels het bepalen van ATP. Milispec heeft een gevalideerde testkit voor ATP concentraties, waarmee ter plaatse de ATP concentratie van water en biofilm kan worden gemeten.

Eurofins/BLGG. Eurofins BLGG voert dagelijks voor veel (teelt)bedrijven in Nederland de bemonstering uit van het gietwater. Dit wordt gescreend op ziekteverwekkende micro-organismen en/of op nutriënten. Voor dit project voert BLGG een nutriënten analyse uit op het aangevoerde water van de teler, en heeft tevens gescreend op bekende plantpathogenen.

KWR. KWR heeft een scala aan technieken ontwikkeld waarmee microbiologische eigenschappen van het water kunnen worden bepaald. Voorbeelden zijn, het bepalen van het totaal bacterieaantal, het aantal ziekteverwekkende bacteriën, maar ook methoden waarmee de snelheid van biofilm vorming kan worden bepaald. Ook kan de microbiële samenstelling (de bacteriesoorten) van water of een biofilm worden bepaald.

Het monitoringsprogramma is uitgevoerd bij Dry Hydroponics te Schipluiden (slateelt op water) en bij paprikateeler Het Wilgenbos te Bleiswijk (paprikateelt op substraat).

De volgende personen zijn direct betrokken geweest bij dit onderzoek, en hebben een belangrijke bijdrage geleverd: Margreet Schoenmakers, Guus Meis en Madeline Daane van LTO-Glaskracht, John van der Hoeven, Julie Palmeleare en Andre van Spengen van Milispec International, Jan Hardeman en Lia Sibbel van Eurofins/BLGG, Maurice van der Knaap en Chris Noordam van Dry Hydroponics, Aad Sonneveld en Arno Bros van Het Wilgenbos, Meindert de graaf, Goffe Elsinga, en Anita van der Veen van het microbiologisch laboratorium van KWR. Ik wil iedereen heel hartelijk danken.

Managementsamenvatting

Structurele aanpak microbiologische waterkwaliteitsproblemen bij teelt op water en substraat

Auteur dr. Luc Hornstra

Bij glastuinbouw op substraat of op water speelt microbiologische kwaliteit van het gerecirculeerde water een belangrijke en wellicht cruciale rol. Vooral onder bepaalde condities, zoals een hoge temperatuur, blijkt teelt op water of substraat vaak vatbaar voor ziektes. In dit verkennende project is een uitgebreid monitoringsprogramma uitgevoerd bij slateelt op water en paprikateelt op substraat, om de microbiologische veranderingen in het water in een teeltsysteem gedurende het seizoen te bepalen. Daarbij bleek dat gedurende het teeltseizoen de hoeveelheid voedingsstoffen voor bacteriën in het water sterk toeneemt. Gecombineerd met een hoge temperatuur kan dat ertoe leiden dat bacteriën zeer snel groeien en veel zuurstof verbruiken. Daardoor kan zuurstoftekort ontstaan in het water en wordt de (delicate) balans in een teelt op water systeem volledig en onomkeerbaar verstoord, met ziektes en slechte teeltcondities tot gevolg. Voor een duurzaam producerende glastuinbouw is daarom meer kennis nodig over hoe in de kas een microbiologisch robuust systeem in stand kan worden gehouden, dat beter bestand is tegen ziektes.



Paprikateelt op substraat in de kas waar het monitoringsprogramma is uitgevoerd.

Belang: meer grip nodig op microbiologische waterkwaliteit bij teelt op water en substraat

Telers in de glastuinbouw stappen steeds vaker over van teelt op volle grond naar teelt op water of teelt op substraat omdat teelt op volle grond onder andere problemen kent met het gebruik en verspreiding van gewasbeschermingsmiddelen. Bij teelt op water of substraat wordt het water hergebruikt en daarbij is de microbiologische waterkwaliteit cruciaal voor succes. Die waterkwaliteit kan verslechteren, wat nu vaak aanleiding geeft tot maatregelen als permanente desinfectie, regelmatig met beperkt resultaat. Op dit moment is er nog geen duidelijk beeld van de oorzaken en gevolgen van veranderingen in de microbiologische waterkwaliteit en welke parameters belangrijk zijn om te monitoren zodat

kwaliteitsverslechtering van het water wordt vastgesteld. Het is belangrijk om hierin meer inzicht te krijgen, zodat telers de kans krijgen ziekten te voorkomen door de waterkwaliteit te monitoren en op tijd bij te sturen. Er zijn bijvoorbeeld zeer hardnekkige maar niet geheel begrepen problemen bij teelt op substraat met tomaat en aubergine, waar ziekten zoals *crazy roots* optreedt. Het is daarom belangrijk te verkennen welke microbiologische waterkwaliteitsparameters relevant zijn voor de microbiologische waterkwaliteit.

Aanpak: brede microbiologische monitoring in de praktijk

Als verkenning zijn gedurende een seizoen diverse chemische en microbiologische parameters gemonitord bij slateelt op water en bij paprikateelt

op substraat. Voor deze monitoring is het brede spectrum aan methoden ingezet dat KWR heeft ontwikkeld om drinkwaterkwaliteit te monitoren. Daarbij is ook gemeten in de biofilm, het dunne laagje bacteriën op de wanden van een teeltsysteem en op de wortels van de plant. De biofilm kan namelijk een reservoir zijn van ziekteverwekkende micro-organismen. Voor de microbiologische monitoring zijn alle technieken ingezet die nu in de praktijk worden gebruikt om de microbiologische kwaliteit van drinkwater te bepalen. Heel belangrijk voor de kwaliteit van drinkwater is bijvoorbeeld de groeipotentie: de concentratie verbindingen in het water die kunnen dienen als voeding voor bacteriën. Verder zijn de bacteriepopulaties geanalyseerd die zich bevinden in het water, in de biofilm op de wand van een bassin en in de biofilm op de wortels van een plant. Ook is specifiek gekeken naar bacteriën in het water versus bacteriën in de biofilm, omdat bekend is dat in deze twee omgevingen vaak bacteriepopulaties ontstaan die van elkaar kunnen verschillen. Ook is onderzocht in hoeverre de biofilm een reservoir kan zijn voor ziekteverwekkers. Naast microbiologische parameters zijn in beide teelten van mei tot november ook de concentraties van nutriënten en andere chemische parameters bepaald en gerelateerd aan de microbiologische waterkwaliteit.

Resultaten: veel voedingsstoffen voor bacteriegroei in het water

Zowel bij de teelt op water als bij de teelt op substraat is het belangrijkste resultaat dat gedurende het seizoen de hoeveelheid voedingsstoffen voor bacteriën in het water sterk toeneemt. Het gaat daarbij om oplosbare organische verbindingen. De organische verbindingen in het water bij de slateelt bestaan uit gemakkelijk afbreekbare verbindingen, wat betekent dat bacteriën deze kunnen gebruiken voor snelle groei. Vooral bij hoge temperatuur kan hier dus een zeer snelle vermeerdering van bacteriën plaatsvinden. Bij de teelt op substraat neemt de concentratie organische verbindingen ook toe: die is in het drainwater hoger dan in het toevoerwater. Micro-organismen in het steenwol rondom de wortel gebruiken deze organische verbindingen als energiebron om te groeien en zich te handhaven in het steenwol. De toename van het organisch-stofgehalte in het water bij zowel teelt op water als op substraat is waarschijnlijk het gevolg van de

secretie van organische verbindingen door de plantenwortels tijdens fotosynthese. De energiebronnen voor bacteriën nemen zowel bij teelt op water als teelt op substraat toe gedurende het teeltseizoen en vormen cruciale factoren in de respons van bacteriën op bepaalde omstandigheden. Als veel voedingsstoffen en een hoge temperatuur aanwezig zijn, bestaat het risico op een zeer snelle groei van bacteriën. Hierdoor kan zuurstoftekort ontstaan in het water, waardoor de normaal aanwezige aerobe bacteriën afsterven. Dit kan de (delicate) microbiologische balans bij teelt op water of substraat onomkeerbaar verstoren, met ziektes en slechte teeltcondities als gevolg. Voor een duurzaam producerende glastuinbouw is daarom meer kennis nodig over hoe in de kas een microbiologisch robuust systeem in stand kan worden gehouden, wat beter bestand is tegen ziektes.

Implementatie: de stap naar de praktijk

Dankzij deze verkenning bestaat nu meer duidelijkheid over hoe gericht kan worden gezocht naar oorzaken van een verslechterde microbiologische waterkwaliteit in de kas. Geadviseerd wordt een monitoringsprogramma op te zetten in een teelt onder gecontroleerde condities, waar planten ziek kunnen worden, om zo microbiologische veranderingen vlak voordat de planten ziek worden te registreren, waarmee de belangrijkste kwaliteitsmarkers voor de microbiologische waterkwaliteit worden geïdentificeerd. De inzichten uit dit onderzoek kunnen ook worden ingezet om bestaande teeltsystemen waar permanente desinfectie wordt gebruikt om te vormen tot systemen met meer robuuste teeltcondities zonder desinfectie. De gebruikte meetmethoden kunnen verder worden ingezet bij de bestrijding van de ziekte *crazy roots*.

Rapport

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen het TKI Watertechnologie, waarbij TKI staat voor Topconsortia Kennis en Innovatie. Partners in dit project waren **LTO-Glaskracht, Milispec International, Eurofins/BLGG en KWR**. Meer over dit onderzoek vindt u beschreven in het rapport *Structurele aanpak microbiologische waterkwaliteitsproblemen bij teelt op water en substraat* (KWR 2017.013).

Inhoud

1	Aanleiding/achtergrond	4
1.1	Aanleiding/Achtergrond	4
1.2	Waterkwaliteit	4
1.3	De rol van de biofilm	4
1.4	Goede versus ziekteverwekkende micro-organismen	5
1.5	Monitoring waterkwaliteit	6
1.6	Doelen en Projectopbrengsten	6
2	Materiaal en methoden	8
2.1	Opzet van het meetprogramma	8
2.2	Het meetprogramma	8
2.3	Analyses	10
3	Resultaten	16
3.1	Chemische parameters	16
3.2	Metingen microbiologische parameters.	21
3.3	Resultaten van de multiscan op plantpathogene schimmels.	28
3.4	Analyse van de monsters door middel van Next Generation Sequencing.	30
4	Discussie	40
4.1	Monitoringsprogramma	40
4.2	Het gedrag van plantpathogenen, de rol van de biofilm.	40
4.3	ATP metingen	40
4.4	De rol van organische verbindingen bij teelt op water en substraat	41
4.5	Analyse van de bacteriepopulaties door middel van NGS.	43
4.6	Impact van desinfectiemiddelen op de microbiologie bij teelt op water en substraat.	44
4.7	Markers voor kwaliteitsverslechtering van de microbiologische waterkwaliteit.	44
5	Conclusie en aanbevelingen	46
5.1	Conclusie's	46
5.2	Aanbevelingen	47

1 Aanleiding/achtergrond

1.1 Aanleiding/Achtergrond

In de (glas)tuinbouw wordt in toenemende mate geteeld op water (direct op water of op substraatteelt). Hoewel teelt op water voor sommige gewassen goed verloopt, zijn er bij andere gewassen veel problemen. Ook bij substraatteelt zijn er hardnekkige problemen, waarvan plantpathogene micro-organismen die bijvoorbeeld de ziekte 'crazy roots' (tomaat, aubergine) veroorzaken de bekendste zijn. Doordat het water in de kas wordt gerecycled en daardoor minder snel wordt ververs, is de verwachting dat het risico op groei van plantpathogene micro-organismen in de praktijk zal toenemen, wat een bedreiging vormt voor een robuuste en gezonde teelt. Wanneer microbiologische problemen zich voordoen, worden deze vaak tegengegaan met behulp van oxiderende biociden zoals chloor of waterstofperoxide. Het nadeel van oxiderende biociden is echter dat behalve de ziekteverwekkende bacteriën ook goede beschermende micro-organismen worden afgedood. Bovendien is permanente dosering van chemische desinfectiemiddelen vanuit milieuoogpunt en duurzaamheid minder gewenst.

1.2 Waterkwaliteit

Er is steeds meer consensus dat een goede microbiologische kwaliteit van het gietwater zorgt voor een robuuste groeiomgeving waarin ziekteverwekkende micro-organismen minder kans hebben om zich te kunnen vestigen en vermeerderen. Het is daarom belangrijk om een geschikte en beschermende microbiologische gemeenschap te creëren en te handhaven in het gietwater als basis voor een gezonde plantengroei tijdens de teelt. Naast het handhaven van een geschikt microbiologisch klimaat in het gietwater is het ook van belang om de nutriëntenconcentratie te beheersen, omdat een overmaat aan nutriënten kan zorgen voor verhoogde bacteriegroei en bijbehorende zuurstofconsumptie, waardoor het zuurstofgehalte in het gietwater zal afnemen. Ook zorgt een overmaat aan nutriënten voor een versnelling van de ontwikkeling van biofilms in het watersysteem van de kas, wat kan resulteren in andere problemen zoals het verstopten van de druppelaars. Structureel onderzoek naar microbiologische kwaliteit van het water in teeltsystemen ontbreekt grotendeels, terwijl dergelijk kennis essentieel is om de microbiologische kwaliteit van het gietwater stap voor stap te verbeteren. Met deze kennis kan teelt op water en substraat betrouwbaarder en gericht kan worden ingezet bij een breed scala aan gewassen. De samenhang tussen water en de biofilm, die als reservoir voor pathogene en "goede" bacteriën dient, zal in dit project met door KWR ontwikkelde methodiek specifiek onder de loep worden gelegd.

1.3 De rol van de biofilm

Overall waar water is, is een biofilm aanwezig. In een teeltsysteem betekent dit in het bassin, in leidingen, pompen, waterreservoirs, maar ook direct op de wortels van de planten. De biofilm speelt een cruciale rol bij de microbiële processen in het water. Zo is vanuit de drinkwater bemonstering bekend dat de meeste micro-organismen zich niet in het water bevinden, maar in de biofilm die zich bevindt aan de wand van bijvoorbeeld de leidingen van het distributiesysteem. We weten ook dat voedingsstoffen in het water vaak juist worden gebruikt door de bacteriën in de biofilm, en dat bij een toename van voedingsstoffen in het water de biofilm toeneemt in omvang. Het water en de biofilm zijn in een permanente interactie met elkaar. Het is nagenoeg onmogelijk om een biofilm volledig te verwijderen. Een desinfectiestap (bijvoorbeeld chloor toevoeging) zal een deel van de biofilm afbreken, maar uit praktijkexperimenten blijkt dat de biofilm vaak al na 1 tot 2 weken weer een gelijke

omvang heeft als voor de behandeling. Verder worden bacteriën die in een biofilm aanwezig zijn door de biofilm beschermd. Desinfectiemiddelen reageren met de buitenkant van de biofilm, en verliezen daar hun anti microbiële werking. Zelfs bij blootstelling aan extreem hoge doses zal een deel van de bacteriepopulatie in de biofilm overleven. Het is daarom in de praktijk onmogelijk om een teeltsysteem volledig te reinigen door middel van desinfectie. De verwachting is dat de biofilm een belangrijke rol kan spelen bij ziekteontwikkeling bij teelt op water en substraatteelt, omdat de biofilm kan dienen als een reservoir voor alle soorten micro-organismen, inclusief ziekteverwekkende. Deze ziekteverwekkers zijn vermoedelijk altijd in lage aantallen aanwezig, maar kunnen een gezonde plant in een robuust teeltsysteem vermoedelijk niet ziek maken. Pas als de omstandigheden voor de teelt ten gunste veranderen voor de ziekteverwekker, bijvoorbeeld doordat condities gunstig zijn voor vermeerdering van plantpathogene micro-organismen in het watersysteem of de plant zwak is, kunnen ze een plant infecteren. Mogelijke omstandigheden die hierbij een rol kunnen spelen zijn bijvoorbeeld; - een hoge temperatuur van het bassinwater en/of, -veel oplosbaar organisch materiaal in het water waardoor snelle groei van micro-organismen kan optreden, met als gevolg een overmatige zuurstofconsumptie waardoor het systeem op bepaalde plaatsten anaeroob kan worden.

De biofilm is een reservoir voor een grote variëteit aan micro-organismen waaronder ziekteverwekkende micro-organismen. Bacterie- en schimmelsoorten in de biofilm zijn niet gelijk aan de bacterie- en schimmelsoorten in het water, waardoor het karakteriseren van micro-organismen in watermonsters geen informatie geeft over micro-organismen in de biofilm. Hoewel de biofilm dus een belangrijke en wellicht cruciale rol speelt bij de gezondheid van teeltsystemen is deze voor over ons bekend niet onderzocht. Om een teeltsysteem microbiologisch volledig in kaart te brengen is het daarom belangrijk om micro-organismen in zowel het water als de biofilm te monitoren. Verder is de aanwezigheid van verschillende populaties micro-organismen een dynamisch proces en afhankelijk van een groot aantal factoren. Tijdens de opstart van de teelt zijn de populaties anders dan in het midden of aan het eind van de teelt. Het enten van een startende teelt met de goede micro-organismen kan daarom ook belangrijk zijn voor een stabiele start van een teelt

1.4 Goede versus ziekteverwekkende micro-organismen

Uit de praktijk blijkt dat teelt op water of substraat onder bepaalde condities gevoelig is voor ziekteverwekkende micro-organismen. De condities waaronder de problemen optreden zijn vaak niet bekend, en tevens is vaak onbekend welk(e) micro-organisme(n) de oorzaak is/zijn van de problemen tijdens de teelt. Indien bij zieke planten van een teelt ziekteverwekkende micro-organismen worden geïdentificeerd, dan worden vaak meerdere ziekteverwekkers gevonden. Dit komt doordat zieke planten na een eerste fase van verzwakking vatbaarder zijn geworden voor ziektes, waardoor vervolgens meerdere ziektes de verzwakte planten aantasten.

In het gehele teeltsysteem bevindt zich een groot scala aan diverse soorten en aantallen micro-organismen. De micro-organismen horen daar thuis, en de verwachting is dat bij een gezonde teelt deze micro-organismen een bijdrage leveren aan een goede teelt door het creëren van een robuuste gezonde en stabiele populatie micro-organismen in het systeem. Hiermee wordt vermoedelijk ook tegengegaan dat ziekteverwekkende micro-organismen kunnen uitgroeien tot aantallen die de teelt kunnen aantasten. Micro-organismen in een teeltsysteem kunnen ruwweg worden onderverdeeld in micro-organismen in de waterfase en micro-organismen aanwezig in de biofilm, die aanwezig is in het gehele systeem. De biofilm is ook aanwezig rondom de wortels van de planten. Microbiële populaties in het water en in de biofilm zijn niet gelijk, en spelen beide een cruciale rol bij teelt op water en substraatteelt. Verder zullen uiteraard verschillende gewassen en teeltsystemen (bijv substraatteelt versus

teelt op water in een bassin) resulteren in verschillende bacteriepopulaties, maar de verwachting is dat er ook overeenkomsten in soorten zullen zijn. Bij teeltsystemen met permanente desinfectie geldt het bovenstaande ook, en zullen de aantallen bacteriën niet veel afwijken van een systeem zonder permanente desinfectie, maar de soorten zullen anders zijn dan bij systemen zonder desinfectie.

1.5 Monitoring waterkwaliteit

In de drinkwatersector zijn een scala aan methoden ontwikkeld waarmee micro-organismen in water en biofilm kunnen worden onderzocht op veranderingen in samenstelling en hoeveelheid. Tevens zijn er methoden ontwikkeld waarmee de microbiologische groeipotentie van het water kan worden bepaald. Dit is naar verwachting ook een belangrijke parameter voor mogelijke groei van bacteriën in het water bij teelt op water en substraat. In het in dit project toegepaste monitoringsprogramma wordt voor zover bekend voor de eerste keer de groeipotentie van het water bepaald alsook de microbiële biomassa en soortensamenstelling van het water en de biofilm in twee teeltsystemen (sla op water en paprika op substraat). Verder is niet alleen het water onderzocht, maar is ook de vormingssnelheid en de samenstelling van de biofilm bepaald. Om dit vast te kunnen stellen zijn in dit onderzoek voor de 1^e keer continue biofilm monitoren in een kas geïnstalleerd. Bepaalde waterkwaliteitsparameters zijn direct van invloed op de microbiologie van het systeem (bijvoorbeeld pH, zuurstof, aanwezigheid metaalionen) zodat naast microbiologische eigenschappen ook de chemische eigenschappen van het water zijn bepaald in het monitoringsprogramma.

1.6 Doelen en Projectopbrengsten

Binnen het project wordt onderzoek uitgevoerd om de volgende vragen te beantwoorden:

- Wat voor microbiologische en chemische samenstelling hebben het water en de biofilm van een gezond teeltsysteem op substraat/water en wat voor kwaliteitscriteria kunnen voor het water worden vastgesteld.
- Hoe kan de ontwikkeling van plantpathogene micro-organismen in de kas bij substraat- en/of waterteelt worden voorkomen of beperkt?

Het onderzoek zal de volgende opbrengsten genereren:

- Een concreet meetprogramma waarmee de microbiologische kwaliteit van het gietwater in de kas kan worden vastgesteld en gemonitord.
- Het meetprogramma zal fungeren als basis om tot een structurele en onderbouwde aanpak te komen ter verbetering van de microbiologische kwaliteit van het gietwater.
- Duidelijkheid of de biofilm in het watersysteem een reservoir is voor pathogenen.

Hierbij werken we toe naar de volgende einddoelen

- Hoe kunnen problemen in het watersysteem in een zo vroeg mogelijk stadium worden gedetecteerd zodat nog gerichte herstelmaatregelen nog kunnen worden uitgevoerd?
- Hoe kan teelt op water of substraat zo robuust mogelijk worden gemaakt zodat deze teeltwijzen duurzaam en betrouwbaar kunnen worden ingezet.

2 Materiaal en methoden

2.1 Opzet van het meetprogramma

Het meetprogramma is opgezet bij 2 bedrijven in de praktijk. Hiervoor is bewust gekozen, omdat onder kleine schaal condities bij onderzoeksfaciliteiten niet altijd problemen optreden die wel spelen bij een teelt in de praktijk. De verwachting is dat door monitoring in de praktijk de resultaten het snelst kunnen worden toegepast in de praktijk. Het uitvoeren van een meetprogramma onder praktijkcondities heeft ook nadelen. Zo wordt lopende het seizoen de teelt gestuurd waardoor de condities niet gelijk blijven. Daarnaast zal de teelt het gehele seizoen moeten produceren, en is de verwachting dat de teelt normaalgesproken niet in kwaliteit achteruit zal gaan als gevolg van ziektes. Daardoor heeft de monitoring zich vooral gericht op het in kaart brengen van de parameters onder gezonde teeltcondities. Omdat voor dit onderzoek tevens gezocht wordt naar indicators voor een verslechterende teelt, zal in een later stadium wellicht een deel van het onderzoek uitgevoerd moeten worden onder proefcondities, waarbij de planten kunnen worden blootgesteld aan verslechterende omstandigheden.

2.1.1 Bemonsteringslocaties

1 Dry Hydroponics Schipluiden. Dry Hydroponics teelt botersla op water met behulp van het dry hydroponics systeem. Dit systeem bestaat uit een bassin met water, waarin bakken van polystyreen zijn geplaatst. In de polystyreen bakken zijn openingen gemaakt, waar de slaplanten in worden geteeld. De planten hangen met de wortels in het bassinwater. Het bassinwater wordt normaalgesproken niet ververs, maar wel aangevuld. Tevens worden indien nodig nutriënten toegevoegd. Monsterlocaties bij Dry Hydroponics zijn: bassinwater, biofilm van polystyreen bakken, biofilm van de wortels van de slaplanten, monsters afkomstig van de CBM (continu biofouling monitor) die werd gevoed met bassinwater

2. Het Wilgenbos, Bleiswijk. Het Wilgenbos teelt paprika op steenwol. Water met nutriënten en een desinfectant (chloor) wordt aangevoerd en met druppelaars aan de steenwol toegevoegd. Overtollig water druppelt uit de steenwol en wordt opgevangen. Dit drainwater gaat retour en wordt opgeslagen. Na behandeling kan het weer opnieuw worden gebruikt. Monsterlocaties zijn het aanvoerwater, het drainwater, de biofilm in het steenwol, en monsters afkomstig van de CBM die werd gevoed door het drainwater.

2.2 Het meetprogramma

In maart 2016 is bij beide bedrijven een nul-meting uitgevoerd. Vanaf mei is het monitoringsprogramma gestart. Op de dag van bemonstering werd door een monsternemer van Eurofins het bassinwater bij de slateler en het aanvoer en drainwater bij de paprika teler bemonsterd, voor analyse op nutriënten door Eurofins. Voor het bepalen van het ATP gehalte op locatie, is de monstername van het bassinwater en de CBM door Milispec en KWR gezamenlijk uitgevoerd. Verder nam de monsternemer van KWR de monsters voor alle overige analyses.

2.2.1 Monitoring van chemische parameters

. Het chemisch/fysisch bemonsteringsprogramma bestaat uit het bepalen van:

- a. pH, zuurstof, geleidbaarheid (EC), temperatuur, en troebelheid ter plaatse

- b. Redoxpotential, zoutgehalte (Na^+), NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , totaal N, orthofosfaat, totaal fosfaat, TOC, DOC, SO_4^{2-} , Cl^- , ijzer, mangaan, bicarbonaat, metalen en sporenelementen in het laboratorium.
- c. Nutriënten

2.2.2 Monitoring van microbiologische parameters

Het microbiologische bemonsteringsprogramma is gericht op het karakteriseren van micro-organismen in het water en in de biofilm die aanwezig is in het teeltsysteem, in het substraat en rondom de wortels van de plant. Een directe maat voor de hoeveelheid actieve biomassa van micro-organismen wordt bepaald door de concentratie adenosinetriphosfaat (ATP) te meten middels een enzymatische reactie. Milispec bepaalt de ATP concentratie met een mobiele testkit op locatie, terwijl KWR een ATP bepaling doet op het lab. Daarnaast wordt binnen het microbiologische monitoringsprogramma ook de groeipotentie van het water bepaald, omdat dit een belangrijke factor is bij de voorspelling van bacteriegroei in het water en/of de biofilm van een teeltsysteem. De groeipotentie wordt bepaald door de biomassaproductiepotentie (BPP) en de biomassa-accumulatiesnelheid (BAS), met behulp van de continue biofilmmonitor (CBM), van het water te bepalen. Tevens zijn ook de bacteriepopulatie en ziekteverwekkers bepaald in het water, de biofilm van de bassinwand en de ontwikkelde biofilms in de CBMs. Om dergelijke bacteriepopulaties en aanwezigheid van ziekteverwekkers te bepalen, wordt DNA geïsoleerd van het water en uit biofilmmonsters afkomstig van de wand van het bassin van de teelt op water, de wortels van sla, het steenwol van de paprikateelt en van CBMs.

Het geïsoleerde DNA wordt gebruikt voor analyse op plantpathogenen met behulp van een multiscreen (door Eurofins) en voor Next Generation Sequencing (NGS) om inzicht te krijgen in de aanwezigheid van de verschillende bacteriepopulaties (door KWR).

De volgende microbiologische bemonstering is uitgevoerd:

Teelt op water (Dry Hydroponics):

- Bemonstering van het bassinwater
- Bemonstering van de biofilm onder aan de perspex bakken waar sla in groeit
- Bemonstering van de biofilm op de wortels van de sla
- Bemonstering van 2 CBMs

Teelt op substraat (Het Wilgenbos):

- Bemonstering van het toevoerwater
- Bemonstering van het afvoerwater (drainwater)
- Bemonstering van het substraat (steenwol)

Het monitoringsprogramma is gestart op 2 mei 2016. De CBMs werden twee wekelijks bemonsterd, de teelt op water werd maandelijks bemonsterd, en de teelt op substraat werd twee maandelijks bemonsterd. In tabel 2.1 staan de bemonsteringsdata weergegeven.

Tabel 2.1. Bemonstering van teelt op water en substraat.

Datum	Dag na start	Bemonst. CBM	Bemonst. Sla	Bemonst. Paprika
2 mei	0	X	X	X
20 mei	18	X		
30 mei	28	X	X	X

14 juni	43	X		
27 juni	56	X	X	
14 juli	73	X		
25 juli	84	X	X	X
11 augustus	101	X		
22 augustus	112	X	X	
8 september	129	X		
19 september	140	X	X	X
6 oktober	157	X		
17 oktober	168	X	X	X

2.3 Analyses

2.3.1 ATP analyse

ATP is een maat voor de hoeveelheid microbiële activiteit in een monster. Bij een ATP bepaling wordt de hoeveelheid ATP per ml (water) of cm² (biofilm) monster bepaald. De ATP concentratie wordt bepaald door ATP met behulp van het enzyme luciferase om te zetten naar licht en de vrijkomende lichtintensiteit te meten en te vergelijken met een ijklijn tussen bekende hoeveelheid ATP en de lichtintensiteit.

2.3.2 KG22

Het koloniegetal 22 (KG22) is een veel gebruikte parameter bij het bepalen van de microbiologische kwaliteit van drinkwater. De bacteriën die worden waargenomen bij een KG22 bepaling zijn bacteriën die organisch koolstof als enige koolstof en energiebron gebruiken en in staat zijn om op een gistextractmedium te groeien (NEN-EN-ISO 6222:1999). Normaliter is < 1% van de aanwezige bacteriën in water in staat om op dit medium te groeien, zodat slechts een deel van de aanwezige bacteriën worden geteld. In water met veel afbreekbaar organisch koolstof is het koloniegetal hoog, en dat is in de meeste gevallen niet gewenst.

2.3.3 Microbiologische groeipotentie: Biomassaproductiepotentie (BPP) van het water.

Water in het algemeen, en water in de kas in het bijzonder bevat een scala aan verbindingen die door bacteriën kunnen worden gebruikt als energiebron. De hoeveelheid en aard van deze verbindingen bepalen de microbiologische groeipotentie (MGP) van het water. De MGP van het water is lastig vast te stellen, omdat het een optelsom is van de verschillende verbindingen die in het water aanwezig zijn en die door de aanwezige bacteriën kunnen worden gebruikt. De totale MGP is afhankelijk van de samenstelling en concentraties van deze verbindingen, en de soorten bacteriën die aanwezig zijn. Daarnaast zijn ook omgevingsinvloeden (temp, zuurstof) van invloed op de MGP. In drinkwater wordt de MGP zo laag mogelijk gehouden om problematische groei van bacteriën in het drinkwaterleidingnet te voorkomen. Voor water in de tuinbouw gelden andere eisen dan voor drinkwater, maar desalniettemin is de MGP vermoedelijk een belangrijke voorspeller voor ongewenste bacteriegroei, ontwikkeling van ziekteverwekkers en biofilmvorming in het systeem.

De afbreekbare verbindingen voor micro-organismen in water bestaan uit een combinatie van gemakkelijk afbreekbare verbindingen, die snel worden afgebroken, en moeilijk afbreekbare verbindingen, die langzaam door micro-organismen worden afgebroken. Moeilijk afbreekbare stoffen worden traag door micro-organismen omgezet en vergen een bepaalde aanlooptijd voordat micro-organismen zich hebben aangepast om deze stoffen af te breken. Hierdoor hebben micro-organismen dan een langere tijd nodig (meer dan een week) om deze verbindingen te kunnen gebruiken voor energie dan gemakkelijk afbreekbare

verbindingen. De biomassaproductiepotentie (BPP) methode bepaald de mate van groei op in het water aanwezige verbindingen die door micro-organismen kunnen worden gebruikt voor groei. Het is daarmee een maat voor de MPG van het water. Tevens kan met de BPP bepaling inzicht worden verkregen of de aanwezige verbinding snel of langzaam door micro-organismen afbreekbaar zijn. Feitelijk wordt dus de voor bacteriën beschikbare groeisubstraten in het water bepaald. Dit zullen voor het grootste gedeelte (een deel van) de organisch koolstof verbindingen zijn. Deze kunnen al in het water aanwezig zijn (afhankelijk van herkomst en opslag), of worden door plantenwortels uitgescheiden in het water.

Bij het bepalen van de BPP wordt de groei van de in het water aanwezige bacteriën gevolgd gedurende 14 dagen. Indien het water veel verbindingen bevat die door de bacteriën kunnen worden gebruikt, dan zullen de bacteriën gaan groeien totdat deze verbindingen zijn verbruikt. Het maximum aantal bacteriën wordt bereikt op het moment dat de door de bacteriën te gebruiken verbindingen in het water net op zijn. Het verschil tussen deze piek en de beginsituatie is een maat voor de hoeveelheid door bacteriën te gebruiken verbindingen in het water. Door te bepalen wanneer bacteriën gaan groeien kan worden bepaald of de bacteriën groeien op snel of langzaam afbreekbare verbindingen. Treed groei op in de 1^e 7 dagen van de test, dan bevat het water gemakkelijk afbreekbare stoffen. Indien het groeimaximum juist in de 2^e week optreedt, dan bevat het water juist moeilijk afbreekbare stoffen. De bacteriepopulatie heeft dan meer tijd nodig om de stoffen af te breken en beschikbaar te maken als energiebron. De aanwezigheid van een desinfectiemiddel zoals bij de teelt op substraat heeft een nadelige effect op de BPP test. Om dit te ondervangen wordt Na_2SO_3 gedoseerd aan het bemonsterde water, voorafgaand aan de BPP analyse, waarmee het chloor wordt geneutraliseerd. De BPP is als volgt bepaald door een erlenmeyer te vullen met 600 ml van het te onderzoeken water, vervolgens werd fosfaat en nitraat toegevoegd. De kolven werden vervolgens 14 dagen geïncubeerd bij 25°C. Tijdens de incubatieperiode werd op dag 0, 1, 2, 4, 7, 9, 11 en 14 monsters genomen van de kolven en werd het ATP-gehalte gemeten als maat voor actieve biomassa. De maximale groeiopbrengst gedurende de eerste zeven dagen (BP7) en de cumulatieve groeiopbrengst in 14 dagen (BPC14) werden vervolgens met de gegevens berekend.

2.3.4 Microbiologische groeipotentie: Continue Biofilm Monitor (CBM)

Door middel van de Continue biofilm monitor (CBM) kan worden bepaald in welk mate en hoe snel een biofilm ontstaat door de verbindingen die in een bepaald watertype (bv drinkwater, teeltwater, oppervlaktewater, koeltorenwater) aanwezig zijn. Het principe van de bepaling is dat een cuvet met glasplaatjes continu wordt doorstroomd met het te onderzoeken water. Tweewekelijks worden twee van de vier cuvetten met glasplaatjes bemonsterd en vervangen voor twee nieuwe cuvetten met glasplaatjes. De uitgehaalde cuvetten met glasplaatjes worden in glazen buizen met 10 ml steriel drinkwater geplaatst en vervolgens op het laboratorium gedurende 2 minuten ultrasoon behandeld om de biofilm te verwijderen. Deze ultrasonische behandeling wordt vervolgens nog twee keer herhaald met 10 ml nieuw steriel drinkwater. De 3 suspensies van 10 ml per cuvet worden bij elkaar gevoegd en daarna geanalyseerd op het ATP-gehalte. Met behulp van de gegevens van de suspensies en de glasplaatjes (oppervlak) wordt de biofilmvormingssnelheid (BVS) berekend. De plaatjes zijn een maand aanwezig in de biofilmmonitor, en gedurende deze periode vindt op de plaatjes de opbouw van een biofilm plaats. Door een CBM gedurende een langere perioden (kan zelfs jaren) in te zetten kan gedurende een langere periode van een bepaald type water de biofilmvormingssnelheid per dag worden bepaald. Voor drinkwater worden CBM's permanent ingezet om de biofilmvormingssnelheid vast te stellen, en zo biologische activiteit in het distributienet te monitoren.

Naast het meten van de hoeveelheid biofilm kan de van de plaatjes afkomstige biofilm ook worden onderzocht op samenstelling van de bacteriepopulatie. Dit is in dit onderzoek ook gedaan door het isoleren van het DNA uit de micro-organismen die op de plaatjes aanwezig waren. Op dit DNA is door middel van NGS bepaald welke bacteriën aanwezig waren in de biofilm. Verder zijn de DNA monsters gebruikt om door middel van Q-PCR te bepalen of er ziekteverwekkers aanwezig waren in de biofilm.



Figuur: Een continu biofilm monitor die in dit onderzoek is ingezet om de biofilmvormingssnelheid te bepalen en de microbiologische samenstelling in de biofilm te onderzoeken.

2.3.5 Multiscan op plantpathogenen.

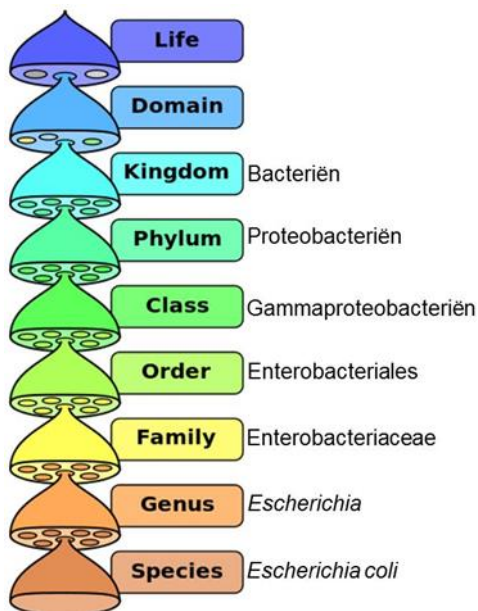
Eurofins Agro heeft de beschikking over een scala aan testen voor plantpathogenen (zie tabel 2.2). De monsters zijn onderzocht op de schimmels die worden gevonden bij teelt op glasgroenten (pakket 162). De analyses zijn uitgevoerd op water en biofilm monsters van zowel de teelt op water als de teelt op substraat. De detectie van plantpathogen gaat door middel van een multiscan. Hierbij worden specifieke DNA fragmenten van plantpathogenen op een membraan gebracht, waarna wordt bepaald of het DNA uit een aangeleverd monster hybridiseert met fragmenten op het membraan. De mate van hybridisatie wordt aangeduid met een getal van 0 (geen hybridisatie) tot 6 (veel hybridisatie).

Tabel 2.2. De lijst van schimmels die met een multiscan worden gedetecteerd. Voor dit project is pakket 162 gebruikt.

Pakketcode	159	155	162
DNA Multiscan® schimmels	Aardbei	Genoten	Glasgroenten
SCHIMMELS			
ALTERNARIA SPP.	•	•	•
ALHELIA ROLFII	•	•	•
APHANOMYCES EUITEICHES	•	•	•
BIPOLARIS SPP.	•	•	•
BOTRYOSPHERIA SPP.	•	•	•
BOTRYTIS SPP.	•	•	•
BOTRYTIS CINEREA	•	•	•
BOTRYTIS TULIPAE	•	•	•
COLLETOTRICHUM SPP.	•	•	•
COLLETOTRICHUM ACUTATUM	•	•	•
COLLETOTRICHUM COCCODES	•	•	•
COLLETOTRICHUM FRAGARIAE	•	•	•
COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES	•	•	•
COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA	•	•	•
COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM	•	•	•
CONIOTHYRIUM FUCHELLI	•	•	•
CORYNESPORA CLASSICOLA	•	•	•
CYLINDROCARPON DESTRUCTANS	•	•	•
CYLINDROCLADIUM SPP.	•	•	•
DIDYMELLA SPP.	•	•	•
DIPLOCARPON ROSAE	•	•	•
DRECHSLERIA SPP.	•	•	•
EUTYPA LATA	•	•	•
FUSARIUM SPP.	•	•	•
FUSARIUM CULMORUM	•	•	•
FUSARIUM LACTIS	•	•	•
FUSARIUM OXYSPORUM	•	•	•
F. OXYSPORUM F.SP. CUCUMERINUM	•	•	•
F. OXYSPORUM F.SP. LYCOPERSICI	•	•	•
F. OXYSPORUM F.SP. RADICIS-CUCUMERINUM	•	•	•
F. OXYSPORUM F.SP. RADICIS-LYCOPERSICI	•	•	•
FUSARIUM SACCHARI	•	•	•
FUSARIUM SOLANI	•	•	•
GAEUMANNOMYCES GRAMINIS	•	•	•
GEOTRICHUM CANDIDUM	•	•	•
GNOMONIA COMARI	•	•	•
LAETISARIA FUCIFORMIS	•	•	•
LEPTOSPHERA KORRAE	•	•	•
LEPTOSPHERULINA SPP.	•	•	•
LIMONOMYCES ROSEIFELLIS	•	•	•
MACROPHOMINA PHASEOLINA	•	•	•
MICRODOCHIUM NIVALE (F. NIVALE)	•	•	•
MYROTHECIUM RORIDUM	•	•	•
OLPIDIUM BORNIVANUS	•	•	•
OLPIDIUM BRASSICAE	•	•	•
OLPIDIUM VIRULENTUS	•	•	•
PASSALORA FULVA	•	•	•
PENICILLIUM SPP.	•	•	•
PENICILLIUM EXPANSUM	•	•	•
PHOMA DESTRUCTIVA	•	•	•
PHOMOPSIS OBSCURANS	•	•	•
PHOMOPSIS SCLEROTIODES	•	•	•
PHYTOPHTHORA SPP.	•	•	•
PHYTOPHTHORA CACTORUM	•	•	•
PHYTOPHTHORA CAPSICI	•	•	•
PHYTOPHTHORA CINNAMOMI	•	•	•
PHYTOPHTHORA CITRICOLA	•	•	•
PHYTOPHTHORA CRYPTOGEA	•	•	•
PHYTOPHTHORA DRECHSLERI	•	•	•
PHYTOPHTHORA IDAEI	•	•	•
PHYTOPHTHORA INFESTANS	•	•	•
PHYTOPHTHORA NICOTIANAE	•	•	•
PLASMIDIOPHORA BRASSICAE	•	•	•
PLECTOSPHERELLA CUCUMERINA	•	•	•
PODOSPORA LEUCOTRICHA	•	•	•
PUCCINIA SPP.	•	•	•
PYRENOCHEATA LYCOPERSICI	•	•	•
PYTHIUM SPP.	•	•	•
PYTHIUM APHANIDERMATUM	•	•	•
PYTHIUM DISSOTOCUM	•	•	•
PYTHIUM GRAMINICOLA	•	•	•
PYTHIUM IRREGULARE	•	•	•
PYTHIUM POLYMASTUM	•	•	•
PYTHIUM SYLVATICUM	•	•	•
PYTHIUM TRACHEIPHYLLUM	•	•	•
PYTHIUM ULTIMUM	•	•	•
PYTHIUM UNCINULATUM	•	•	•
RHIZOCTONIA FRAGARIAE	•	•	•
RHIZOCTONIA SOLANI	•	•	•
RYNCHOSPORIUM ORTHOSPORUM	•	•	•
RYNCHOSPORIUM SECALIS	•	•	•
SCLEROTINIA SPP.	•	•	•
SCLEROTINIA HOMEOCARPA	•	•	•
SCLEROTINIA MINOR	•	•	•
SCLEROTINIA SCLEROTIURUM	•	•	•
SCLEROTINIA TRIFOLIORUM	•	•	•
SCLEROTIUM CEPIVORUM	•	•	•
SEPTORIA LYCOPERSICI	•	•	•
SPONGOSPORA SUBTERRANEA F.SP. SUBTERRANEA	•	•	•
STEMPHYLLIUM SPP.	•	•	•
THIELAVOPSIS BASICOLA	•	•	•
TRICHODERMA SPP.	•	•	•
TRICHODERMA ASPERELLUM	•	•	•
TRICHODERMA HAMATUM	•	•	•
TRICHODERMA HARZIANUM	•	•	•
TYPHULA SPP.	•	•	•
VENTURIA INAEQUALIS	•	•	•
VERTICILLIUM SPP.	•	•	•
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM	•	•	•
VERTICILLIUM DAHLIAE	•	•	•

2.3.6 Next Generation Sequencing

Bij de NGS analyses is in dit onderzoek de MiSeq sequencer van de firma Illumina gebruikt voor het bepalen van DNA-sequenties van een deel van het 16S rRNA gen. Het 16S rRNA gen is aanwezig in alle bacteriën en delen van de sequentie van dit gen zijn bij alle bacteriën gelijk (geconserveerde regio's) en de DNA sequenties van andere delen van dit gen varieert sterk tussen verschillende bacteriegroepen (variabele regio's). De DNA-sequentie van deze variabele regio's wordt gebruikt voor het identificeren (welke bacteriegroep?) van de aanwezige bacteriën. Door gebruik te maken van synthetische DNA-moleculen (primers) welke specifiek binden aan een geconserveerde regio is het mogelijk om m.b.v. PCR (Polymerase Chain Reaction) een fragment te vermeerderen dat voorkomt bij alle bacteriesoorten. En, het gebruik van primers die binden aan een geconserveerde regio maar flankeren aan een variabele regio maakt het mogelijk om PCR-fragmenten te genereren die, tussen de primers, een variabel gebied bevatten. Met NGS is het vervolgens mogelijk om de DNA-sequentie te bepalen van een mengsel van een groot aantal (15.000.000 in één MiSeq run) individuele PCR-fragmenten (amplicon). De DNA-sequenties van de individuele PCR fragmenten wordt m.b.v. software vergeleken met sequenties uit databases en op basis van deze vergelijking ingedeeld in bacteriële groepen op verschillende taxonomische niveaus. Een voorbeeld van de taxonomische indeling voor de bacteriesoort *Escherichia coli* is weergegeven in figuur 3.16. Doordat met deze aanpak een deel van de DNA-sequentie van het 16S rRNA gen wordt bepaald is het niet mogelijk om de sequenties tot op het niveau van "species" (soort) te identificeren. Identificatie van een groot deel van de sequenties is mogelijk tot op het niveau van familie en een kleiner deel tot op het niveau van genus (geslacht).



Figuur 3.16 Taxonomische indeling van organismen met *E. coli* als voorbeeld

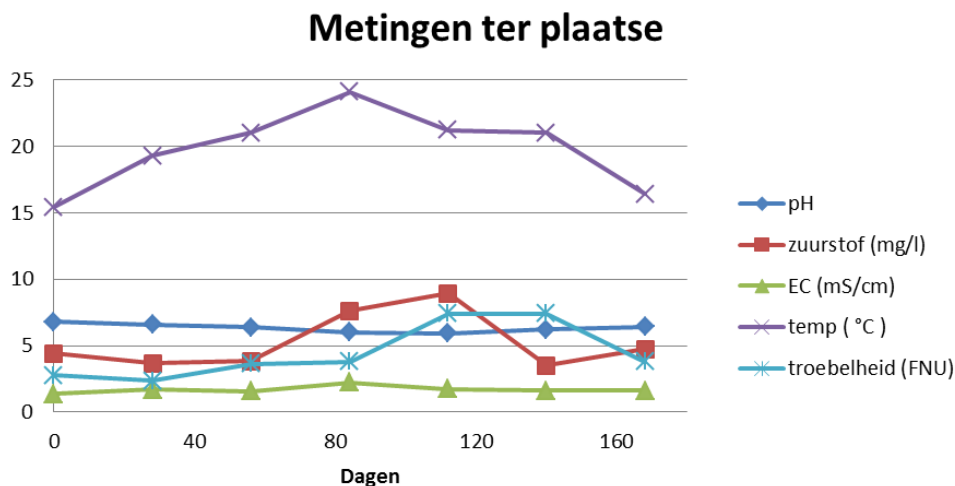
3 Resultaten

3.1 Chemische parameters

3.1.1 Metingen bij teelt op water; slateelt bij Dry Hydroponics

Bij Dry Hydroponics is op 25 maart een nul-meting uitgevoerd om de chemische en microbiologische samenstelling van het water en de biofilm te bepalen. De daadwerkelijke meetcampagne is gestart op 2 mei.

In figuur 3.1 zijn de meetgegevens van de metingen van het bassin ter plaatse weergegeven.

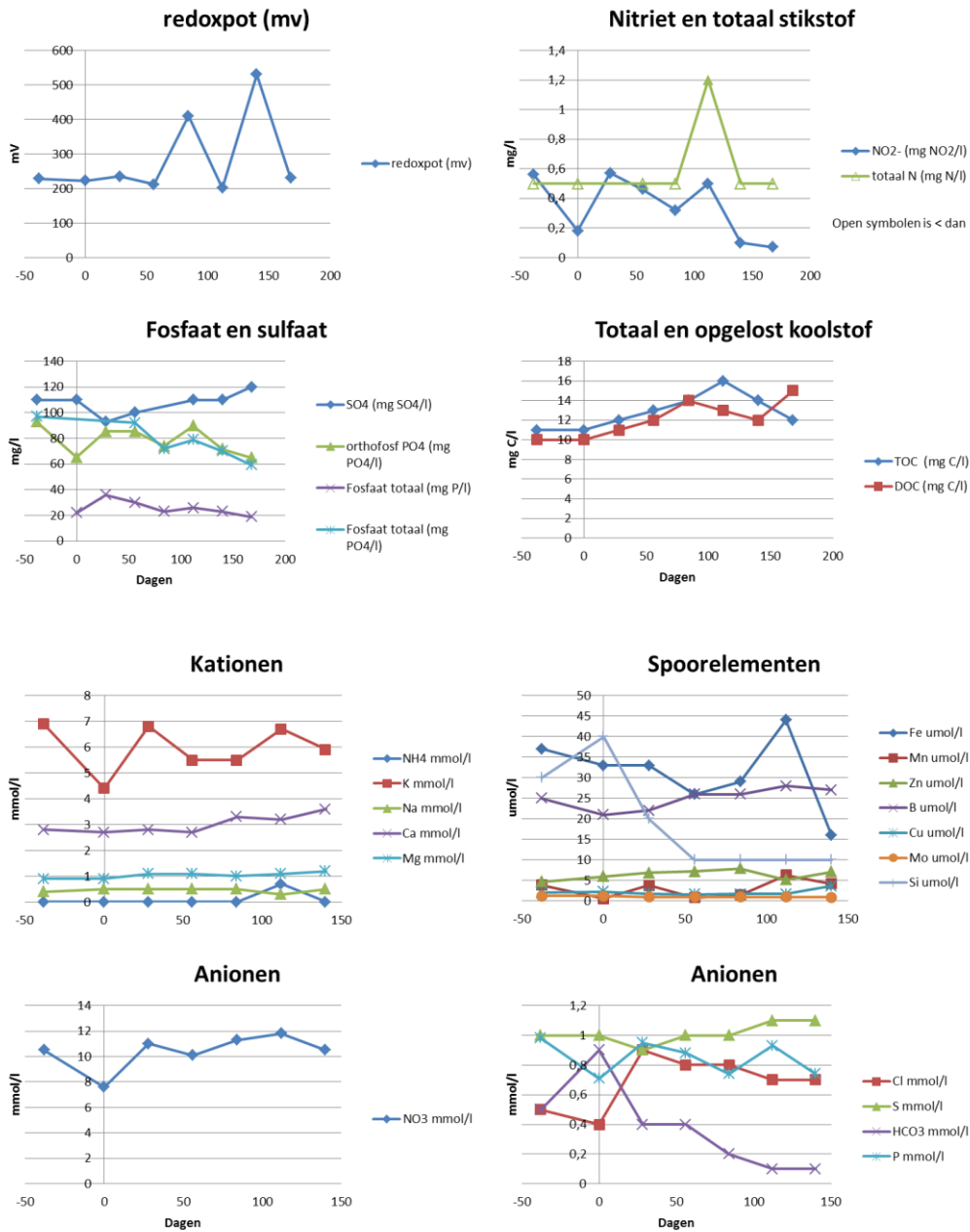


Figuur 3.1 Metingen die ter plaatse in de kas zijn uitgevoerd. Dit betreft pH, zuurstofconcentratie, de geleidbaarheid, temperatuur en troebelheid van het bassinwater.

Dag 0 is 2 mei, de eerste dag van de monitoring. Er zijn zeven metingen geweest. De EC waarde en de pH blijven tijdens het seizoen constant. De temperatuur volgt de seizoens temperatuur, en stijgt tot 24°C op 15 juli. Het zuurstofgehalte laat wel variatie zien, en de troebelheid neemt vanaf juli toe, en neemt vanaf half september weer af.

Metingen van chemische parameters

Van het bassinwater zijn gedurende het gehele seizoen ook watermonsters genomen en deze zijn in het lab onderzocht. In de volgende figuren zijn de resultaten van deze metingen weergegeven. Het eerste meetpunt is de nul-meting op 38 dagen voor 2 mei, aangegeven als - 38 dagen. Punt 0 (2 mei) is de start van de monitoring.



Figuur 3.2. De resultaten van de binnen het monitoringsprogramma uitgevoerde chemische analyses van het bassinwater bij de slateelt op water.

De meeste van de binnen het chemische monitoringsprogramma bepaalde parameters laten gedurende het groeiseizoen geen grote verschillen zien. Opvallend is de grote variatie in redoxpotentiaal, wat wellicht het gevolg is van ingrijpen door middel van schoonmaken of desinfectie. Er is niet precies bijgehouden wanneer een ingreep heeft plaatsgevonden, maar er hebben wel verschillende ingrepen gedurende meetperiode plaatsgevonden. Parameters die wel duidelijk toenemen zijn het totaal (TOC) en opgelost koolstof (DOC). Een deel van het DOC is voor micro-organismen een belangrijke energiebron, en kan daarmee een oorzaak zijn van het toenemen van micro-organismen in het bassin, en het toenemen van de groeisnelheid van de biofilm. De toename van TOC en DOC is vermoedelijk het gevolg van

het uitscheiden van koolstofverbindingen door plantenwortels. Verder laat het sporenelement silicium een duidelijke afname zien.

3.1.2 Metingen bij teelt op substraat; Paprikateler Het Wilgenbos

Bij het Wilgenbos zijn het toegevoerde water en het drainwater onderzocht. Ter plaatse is de EC, pH, temp, zuurstof en troebelheid bepaald. De overige parameters zijn bepaald in het laboratorium.

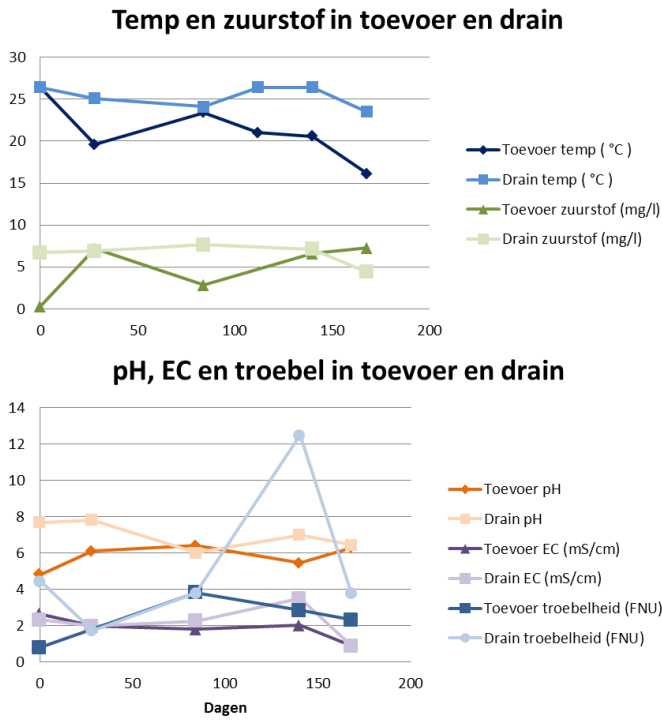


Fig 3.3. De resultaten van de ter plaatse in de kas gemeten parameters temperatuur, zuurstof, pH, geleidbaarheid en troebelheid van het toevoerwater en drainwater bij teelt van paprika op substraat.

De ter plaatse bepaalde parameters blijven in de meetperiode van 2 mei tot 17 oktober behoorlijk constant. Op dag 140 is er een piek waar te nemen in de troebelheid.

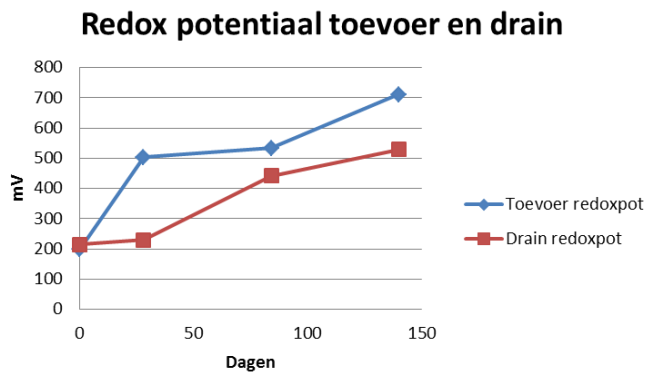


Fig 3.4. De gemeten redoxpotentiaal van het toevoerwater en het drainwater.

De redoxpotentiala laat een duidelijke stijging zien gedurende het seizoen, zowel in het toevoerwater als in het drainwater. Dit is een indicatie voor een toenemende desinfectie gedurende het seizoen. Aan het toevoerwater is chloor toegevoegd, en vermoedelijk wordt de gedoseerde chloorconcentratie gedurende het seizoen verhoogd.

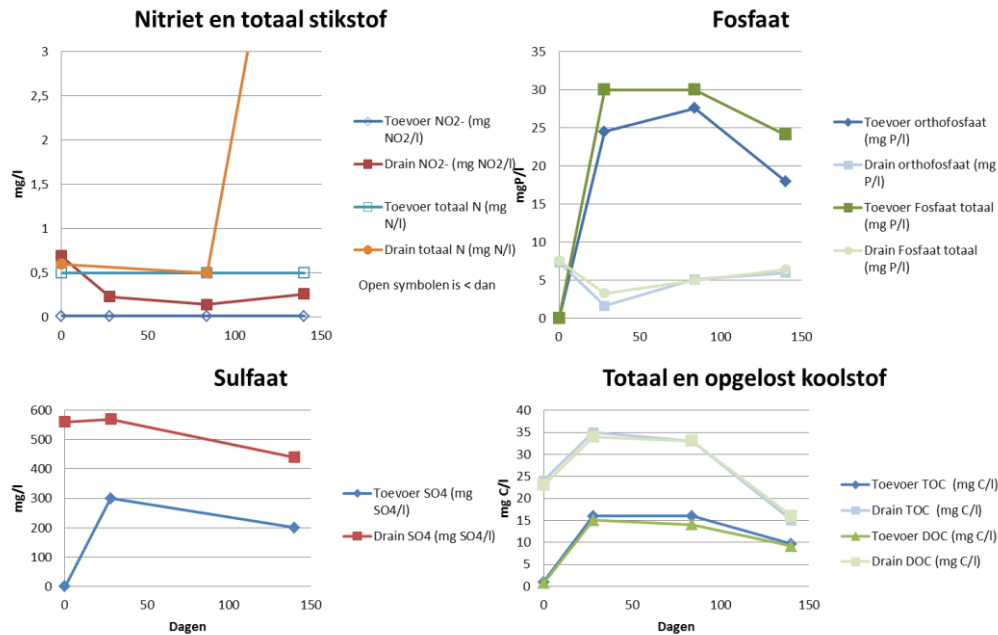
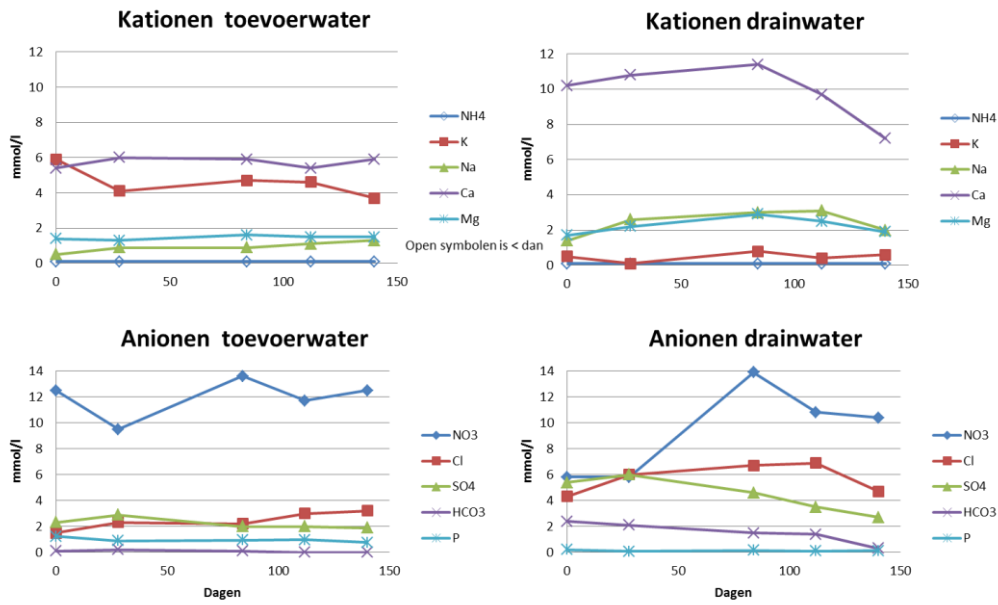
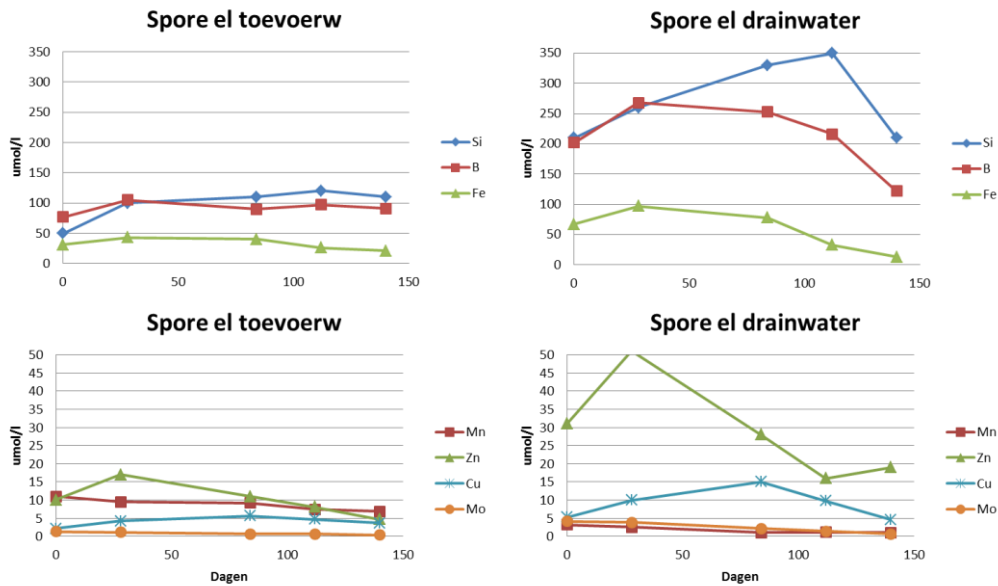


Fig. 3.5. Stikstof, fosfaat, sulfaat en organisch koolstofwaarden in het toevoer en het drainwater.

Het totaal stikstof in het toevoerwater blijft gelijk, maar laat in het drainwater een piek zien van 6,5 mg/l (waarde valt buiten de grafiek). Uit de nitrietwaarden wordt waargenomen dat deze in het drainwater iets hoger zijn dan in het toevoerwater, waar de nitrietconcentratie onder de detectiegrens ligt. Er wordt tijdens passage van het water langs de plant blijkbaar een geringe hoeveelheid nitriet geproduceerd. Fosfaat is aanwezig in het toevoerwater, en in lagere concentratie in het drainwater, en wordt dus tijdens passage opgenomen door de planten. Sulfaat is gedurende het gehele seizoen hoger in het drainwater. Ook organisch stof (TOC en DOC) is bijna 2,5 keer hoger in het drainwater. Dit kan verklaart worden doordat planten tijdens de fotosynthese een grote variëteit aan organische verbindingen uitscheiden via de wortels. Deze organische verbindingen zijn een goede voedingsstof voor micro-organismen, en spelen daarmee een belangrijke rol in de microbiologische processen die zich afspelen tijdens de teelt.



Figuur 3.6. De concentraties kationen en anionen in het toevoerwater en het drainwater.



Figuur 3.7. De concentraties spore elementen in het toevoerwater en het drainwater.

Uit figuur 3.6 en 3.7 kan worden geconcludeerd dat in het toevoerwater de kationen, anionen en sporen-elementen in het toevoerwater ongeveer gelijk blijven. In het drainwater zijn er ten opzichte van het toevoerwater wel een aantal veranderingen waar te nemen. Zo neemt van de kationen Ca toe en K af. Bij de anionen nemen Cl, SO₄ en HCO₃ toe, en neemt P iets af. Bij de sporen-elementen worden ook verschillen waargenomen tussen toevoerwater en drainwater, waarbij de concentraties van Si, B, Fe, Zn en Cu aanmerkelijk hoger zijn in het drainwater dan in het toevoerwater. De concentratie mangaan daarentegen neemt juist iets af tijdens transport in het watersysteem.

3.2 Metingen microbiologische parameters.

3.2.1 Metingen bij teelt op water, slateelt (Dry Hydroponics)

3.2.1.1 KG22 en ATP

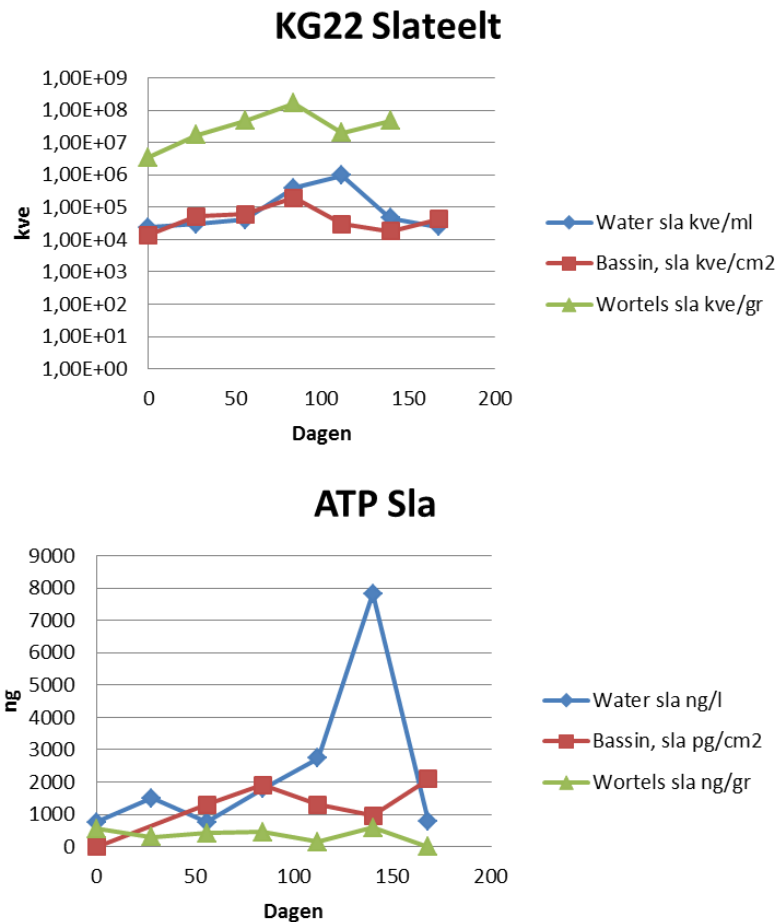


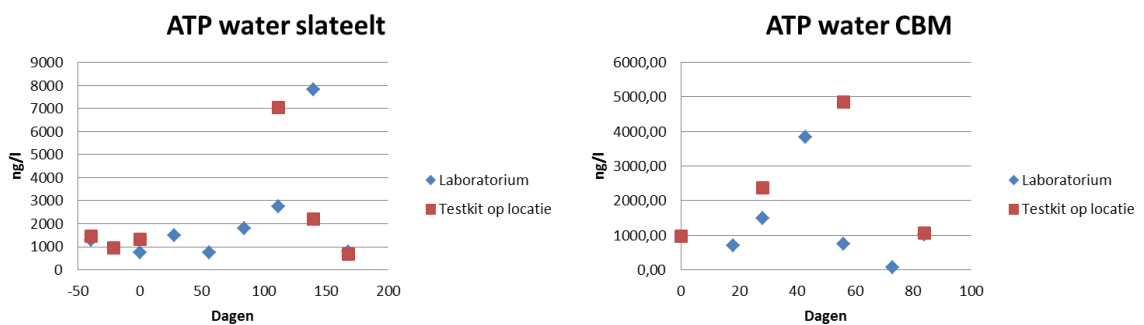
Fig. 3.8. Het KG22 en de ATP waarden van het bassinwater, van de biofilm op het bassin, en van de biofilm afkomstig van de wortels van de slaplanten gedurende het seizoen.

Bij de teelt op water neemt het KG22 tot ongeveer 100 dagen na monitoring toe in zowel het water, in de biofilm van het bassin en op de wortels van de plant. Op dag 110 is er een ingreep geweest in het bassin, waarbij het water is verversd. De monsters in het bassin en van de wortels laten zien dat het KG22 vanaf dat moment tijdelijk afneemt, terwijl het KG22 in het water de rest van de periode afneemt. Ook de TOC/DOC waarden zijn na het verversen lager (fig. 3.2). Omdat KG22 bacteriën waarschijnlijk groeien op een deel van het aanwezige organische koolstof in het water is het in de lijn der verwachting dat deze aantallen afnemen als het DOC afneemt. Er is immers minder van de energiebron voor deze bacteriën aanwezig. De ATP waarden van het water en de biofilm op het bassin laat een globaal toenemende trend zien voor de eerste 100 dagen, maar de getallen vertonen wel een fluctuatie. De ATP getallen van de biofilm van de wortels laten een minder grote spreiding zien. De biofilm van de wortels wordt in het lab door middel van sonificatie stapsgewijs van de wortels verwijderd, en opgenomen in steriel water. Het vermoeden bestaat dat juist de aanwezigheid van algen

in het bassinwater een storend effect heeft op de ATP analyse. Deze zijn niet of minder aanwezig in de op het lab gemaakte biofilm suspensie van de wortels, en geven daardoor vermoedelijk een beter beeld.

3.2.1.2 Vergelijk van ATP metingen: mobiele testkit versus laboratorium metingen.

Op een aantal momenten tijdens het monitoringsprogramma zijn gelijktijdig monsters geanalyseerd met de mobiele testkit van Milispec op locatie en met een testkit die wordt uitgevoerd op het laboratorium van KWR, nadat deze monsters naar het laboratorium van KWR waren vervoerd (Fig 3.9).



Figuur 3.9. Een vergelijking van de ATP getallen die zijn bepaald met de mobiele testkit versus de getallen zijn vastgesteld op het laboratorium.

Er zijn 5 tijdstippen geweest waarop het water in het bassin gelijktijdig is gemeten. Op dag -39, 0 en 168 liggen de getallen van de 2 verschillende methoden redelijk goed bij elkaar. Op dag 112 en 140 daarentegen zijn er duidelijke verschillen, maar de absolute waarden waren op die momenten ook erg hoog. Ook de waarden van het water uit de CBM laat af en toe tussen beide methoden duidelijke verschillen zien. In de discussie worden de gevonden resultaten en de verschillen verder besproken.

3.2.1.3 Metingen met de CBM

De CBMs zijn oorspronkelijk ontwikkeld om de biofilmvormingssnelheid te bepalen van drinkwater, maar worden tegenwoordig veel breder toegepast. Echter tot nu toe zijn deze niet gebruikt voor het bepalen van de biofilmvormingssnelheid van water in de tuinbouw. Water in de tuinbouw (in dit geval bassinwater en drainwater) is veel rijker aan nutriënten en oplosbaar organisch materiaal. De gehalten zijn in vergelijking met drinkwater, waar normaalgesproken een TOC van 2 tot 3 mg/L wordt, vele malen hoger. Vanwege dit verschil in nutriënten was voor aanvang van dit onderzoek niet bekend of de CBMs zonder aanpassingen kunnen worden ingezet om de biofilmvormingssnelheid vast te kunnen stellen. Als uitgangspunt is uitgegaan van het normale protocol waarmee normaalgesproken de BAS (biofilmaccumulatiesnelheid) van water wordt bepaald door het water door glasparsels te laten stromen.

Bij de slateler zijn twee CBMs geplaatst die beide in serie werden gevoed door water uit het bassin. Beide CBMs waren lichtdicht afgedekt om algengroei in de CBM te voorkomen. Het water werd continu door de CBM gepompt door een dompelpomp in het bassin. Bij aanvang van de metingen moesten er een aantal problemen worden verholpen. Het grootste probleem was de aanwezigheid van grote deeltjes, vooral draadalg. Deze verstopten de regelventielen van de CBM waardoor de watertoevoer niet gelijk bleef, en soms stopte. Door het plaatsen van kaarsfilters en water door deze kaarsfilters te laten lopen voordat het door

de CBM loopt, is dit probleem opgelost. Daarna bleken de glasparels echter nog steeds te verstopen met algen. Daarom is overgeschakeld van glasparels op glasplaatjes (die minder gevoelig zijn voor verstopping) met een bekend oppervlakte, waarmee dit probleem was verholpen.

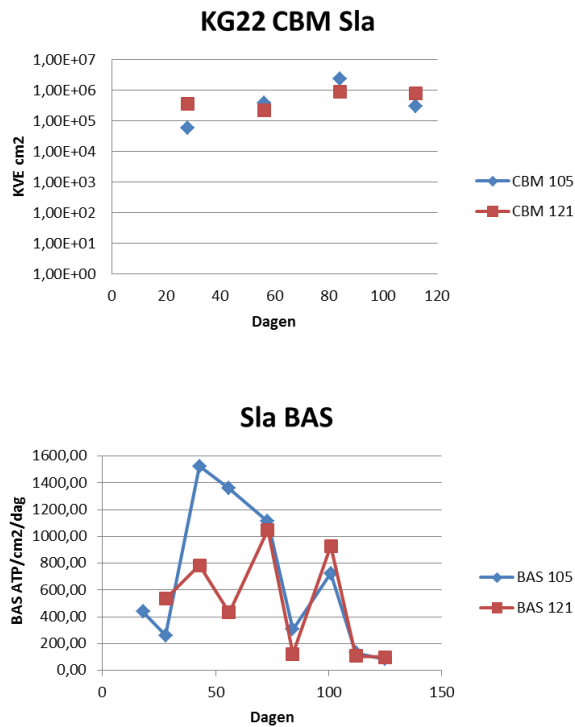


Fig. 3.10 Het KG22 en de biofilm accumulatiesnelheid (BAS) gemeten in de beide biofilm monitoren gevoed met het water uit het sla bassin.

In figuur 3.10 staan de KG22 aantallen van de biofilm (in kve/cm^2) op de glasplaatjes in de biofilmmonitoren en de BAS van de biofilm monitoren. Het KG22 in de CBM neemt toe, wat in lijn is met de eerdere waarnemingen van het KG22 in water, en op de biofilm van het bassin en de wortels.

De BAS van beide CBMs liepen in de beginfase van het monitoringsprogramma tussen dag (28 en dag 73) erg uiteen, maar komen vanaf dag 73 wel overeen. Omdat in de eerste fase van de monitoring in het teken heeft gestaan van het oplossen van problemen (verstopping door algen) en inregelen van de CBM, kunnen verschillen daardoor worden verklaard. Nadat de problemen met de CBMs waren opgelost, lieten ze allebei een gelijke BAS waarde zien, maar was de variatie in de BAS tussen de verschillende meetdagen nog steeds groot. Zo is de BAS op dag 101 rond de 800 tot 1000 $\text{ATP/cm}^2/\text{dag}$, terwijl dit daarvoor en daarna met een BAS van rond de 100 $\text{ATP/cm}^2/\text{dag}$ aanmerkelijk lager ligt. Omdat dit de eerste keer is dat een biofilm in bassinwater op deze wijze wordt bepaald, zijn er geen historische gegevens om de getallen aan te relateren. Het is daarom niet bekend welke BAS waarden normaal zijn, en hoeveel fluctuatie kan optreden in een bassin tijdens een teelt. Wel zijn de BAS waarden van het bassinwater hoog vergeleken met BAS waarden in het drinkwater (BAS van drinkwater is normaal tussen de 10 a 15 $\text{ATP/cm}^2/\text{dag}$). Verder heeft het water vanaf dag 110 (dag van ingreep door teler in het bassin) tot aan dag 112 dag van monsternamen, niet door de CBM gestroomd, waardoor de CBM waarde van dag 112 niet betrouwbaar is.

3.2.1.4 Microbiologische groeipotentie (BPP)

De microbiologische groeipotentie is een maat voor de in het water aanwezige verbindingen die kunnen dienen als voedingsbron voor bacteriën.

In het bassin van de slateler zijn gedurende het gehele groeiseizoen watermonsters genomen om de BPP te bepalen. Als voorbeeld staat hieronder de BPP grafiek van het bassinwater van 30 mei 2016 (is 28 dagen na de start van de meetcampagne) (Figuur 3.11).

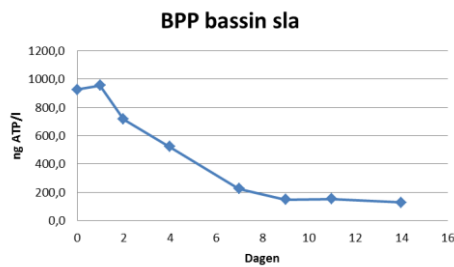


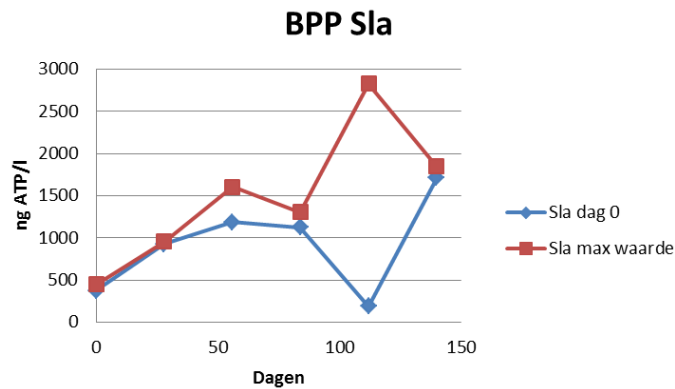
Fig. 3.11 De biomassaproductiepotentie van het bassinwater van de slateler op 30 mei 2016.

Deze grafiek laat het basisniveau zien van de aanwezige bacteriepopulatie op dag 0, en volgt vervolgens de groei van de bacteriën op de in dit water aanwezige verbindingen. Uit de grafiek blijkt dat in de eerste dag een duidelijk groei waar te nemen is, waarna de ATP-concentratie afneemt tot dag 9, waarna de actieve biomassa constant blijft.

De initiële groei betekent dat in dit water nog verbindingen aanwezig zijn die door bacteriën relatief snel kunnen worden omgezet. De piek wordt bereikt na 1 dag groei, wat betekent dat de aanwezige verbindingen gemakkelijk afbreekbaar zijn, en door de aanwezige bacteriepopulatie snel kunnen worden gebruikt voor groei. De afname van dag 1 tot 8 betekent dat er onvoldoende voedingsstoffen in het water zijn om de relatief hoge biomassa in stand te houden, terwijl de constante biomassa van dag 8 tot 14 laat zien dat er voldoende voedingsstoffen in het water achterblijven om deze actieve biomassa in stand te houden. Doordat deze verbindingen vanaf dag 8 tot 14 nog worden omgezet, worden deze verbindingen als moeilijk afbreekbaar gedefinieerd.

In figuur 3.12 is de actieve biomassa van dag 0 (is de dag van monsternamen) uitgezet voor alle genomen monsters van deze monstercampagne. Deze figuur laat zien dat de actieve bacteriepopulatie toeneemt tot ongeveer dag 84 (15 juli). Het volgende punt (dag 112) laat een sterke daling zien, wat verklaarbaar is omdat het bassinwater op dag 110 is verversd. In dit verse water zijn de bacterieaantallen naar verwachting laag. Bij het volgende meetpunt (dag 140) is de actieve biomassa het hoogst van dit meetseizoen. De rode lijn in deze grafiek geeft de BPP aan, en is daarmee een maat voor de hoeveelheid voor bacteriën beschikbare verbindingen in het water. De punten van deze lijn zijn dus de piekwaarden die zijn vastgesteld na de BPP-groei-curve, en geven daarmee de groeipotentie weer van het water. Bij alle BPP-testen van het bassinwater werd het maximum van de groei-curve na 1 tot 2 dagen bereikt, wat wijst op snel afbreekbare verbindingen in het water. De rode lijn laat een toename zien, en stijgt harder dan de blauwe lijn in de eerste 56 dagen. Dit betekent dat de concentratie door bacteriën afbreekbare verbindingen in het water toenemen gedurende de meetperiode. Ook op dag 84 zijn de afbreekbare verbindingen nog ruim aanwezig. Op dag 112 is een monsternamen uitgevoerd direct na het verversen van het bassin. De BPP van dit water is zeer hoog, het bevat dus zeer veel voor bacteriën beschikbare verbindingen, en de verwachting is dat in dit water zeer snelle groei zal plaatsvinden. Bij de laatste meting is BPP

afgenomen, en is de groeipotentie van het water weer kleiner. De hoge BPP waarde van het verse water op dag 112 is opvallend.



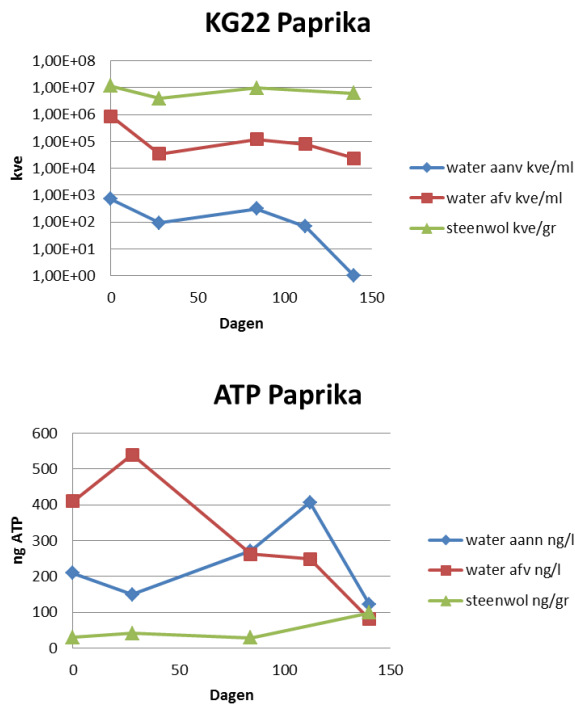
Figuur 3.12. De biomassaproductiepotentie van het bassinwater van de slateler gedurende het seizoen.

3.2.2 Metingen bij teelt op substraat, Paprikateelt Het Wilgenbos

De microbiologische metingen bij de teelt op substraat bestaan uit het analyseren van het toevoerwater en het afvoerwater (drainwater) op KG22 en ATP waarden. Daarnaast is het substraat bemonsterd door een stukje ter grootte van ongeveer een cm^3 uit het steenwol te snijden, om de biofilm in het substraat te onderzoeken. Een belangrijk verschil met de slateelt op water is dat bij deze teelt een permanente desinfectie wordt toegepast door middel van het toevoegen van chloor aan het toevoerwater. In het drainwater is nog een residu van het chloor aanwezig. Bij de paprika teelt is voor zover bekend tijdens het seizoen niet extra ingegrepen door additionele desinfectie, naast de reguliere chloordosering in het ingaande water.

3.2.2.1 KG22 en ATP

De KG22 en ATP waarden zijn weergegeven in Figuur 3.13. Het KG22 in het toevoer water is zeer laag. Dit is het gevolg van de chloordosering aan dit water. In het drainwater zijn de KG22 waarden gedurende het gehele seizoen rond de 1×10^5 kve/ml. Het steenwol geeft een beeld van de KG22 bacteriën in de biofilm van het steenwol, en deze blijft gedurende het seizoen ongeveer gelijk. De ATP waarden laten ook hier een fluctuatie zien, maar minder groot dan bij de slateelt, en verder liggen de ATP concentraties duidelijk lager dan bij de slateelt. Als gevolg van desinfectie en dus de aanwezigheid van chloor is de totale hoeveelheid KG22 en de concentratie bacteriën lager dan bij de slateelt.



Figuur 3.13. Het KG22 en de ATP waarde van het toevoer en het drainwater, en van de bacteriën in het substraat.

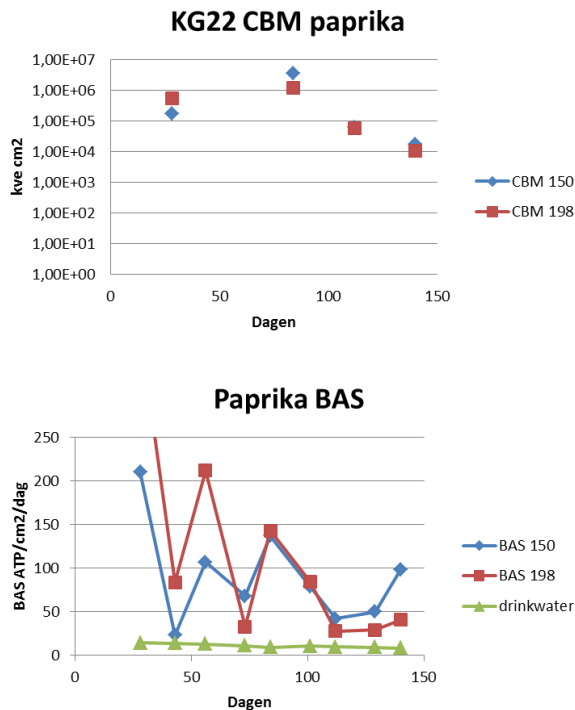


Fig. 3.14. Het KG22 op de plaatjes in de CBM en de BAS waarden van de CBMs die waren aangesloten op het drainwater.

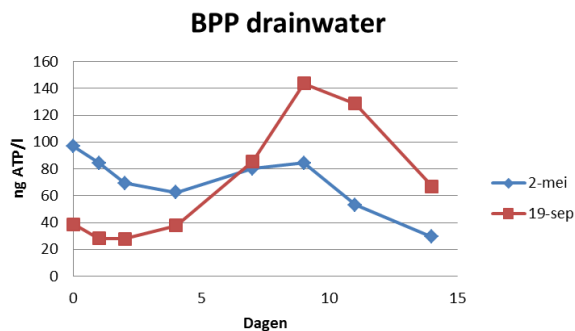
3.2.2.2 Metingen met de CBM

De CBMs zijn aangesloten op het drainwater, en worden gevoed met water dat in de drainkelder is verzameld. Ook hier is het water door middel van een pomp door de CBMs geleid, en vanwege verstoppingsproblemen zijn de leidingen van het ingaande water voorzien van 2 kaarsfilters van 150µm en 20µm als voorfilters. De deeltjes in het drainwater die de problemen met de CBMs veroorzaakten zijn vermoedelijk deeltjes die afkomstig zijn uit het substraat.

Hoewel het aantal monsters in het monitoringsprogramma lager is, is ook hier waargenomen dat het KG 22 in de biofilms op de plaatjes van de CBM een toename laat zien in de eerste 100 dagen, waarna het afneemt. Dit is in lijn met de bepaalde TOC/DOC gehalten, die een gelijke trend laten zien. Idem aan de waarneming bij de slateler laten ook hier de BAS waarden een groot verschil zien tussen de CBMs in de eerste fase van het monitoringsprogramma. Vanaf dag 73 lopen de BAS waarden van beide CBMs meer gelijk, en geven daarmee naar verwachting een goed beeld van de BAS. De BAS waarden bevinden zich vanaf dag 73 in de range van 40 tot 150 ATP/cm²/dag. Dit is aanmerkelijk lager dan de waarden in het bassinwater bij de slateler.

3.2.2.3 Microbiologische groeipotentie (BPP)

Bij de paprikateelt is de BPP bepaald van het water naar de planten, en het drainwater afkomstig van de planten. Het water naar de planten wordt bij deze teelt gedesinfecteerd door de dosering van chloor. Ondanks de neutralisatie van chloor voorafgaand aan de BPP analyse, bleek er in het toevoerwater nog teveel groeiremming te zijn van (restproducten van) chloor om een betrouwbare BPP bepaling te kunnen uitvoeren. De BPP van drainwater is twee keer bepaald op 2 mei en op 19 september.



Figuur 3.15. De BPP van het drainwater op 2 mei en 19 september.

In figuur 3.15 is de groeicurve van de bacteriën in het drainwater weergegeven. De startwaarden (actieve biomassa in het water) op dag 0 zijn veel lager dan bij de waarden in het bassin van de slateelt. Daarnaast is een initiële afname van ATP waargenomen gedurende de eerste drie tot vijf dagen, waarna de ATP concentratie toeneemt tot dag 9 in de BPP test. Van dag 9 t/m 14 neemt de ATP concentratie weer af. De initiële afname betekent dat er te weinig gemakkelijk afbreekbare voedingsstoffen in het water aanwezig zijn om de hoeveelheid actieve biomassa die in het drainwater aanwezig is (t=0) in stand te houden, waardoor de ATP-concentratie afneemt.

De ATP piek die volgt op dag 9 geeft aan dat het drainwater wel organisch afbreekbare verbindingen bevat waar de bacteriën op kunnen groeien, maar deze verbindingen zijn moeilijk afbreekbaar, waardoor het enige tijd duurt voordat bacteriën deze verbindingen hebben omgezet. De biomassaproductiepotentie van het water voor snelle directe groei op gemakkelijk afbreekbare verbindingen is daarom in dit water laag. Wanneer de moeilijk afbreekbare stoffen langdurig aanwezig zijn in het water (door bijvoorbeeld recirculatie of adsorptie aan oppervlakten), zullen deze stoffen echter ook tot groei leiden

3.3 Resultaten van de multiscan op plantpathogene schimmels.

24 monsters van de sla teelt op water en 21 monsters van de paprika teelt op substraat zijn onderzocht op het voorkomen van 59 plantpathogene schimmels in de monsters. Alleen schimmels die een positief signaal geven in één of meerdere van de monsters, zijn weergegeven in tabel 3.1.

SLA	Datum	Dag	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23		
Bassinwater	3-5-2016	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0		
Bassinwater	31-5-2016	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0		
Bassinwater	28-6-2016	56	0	0	0	2	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0		
Bassinwater	26-7-2016	84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Bassinwater	22-8-2016	112	1	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
Bassinwater	19-9-2016	140	2	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	2		
Bassinwater	17-10-2016	168	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0		
Biofilm bassin	3-5-2016	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0		
Biofilm bassin	31-5-2016	28	3	0	0	2	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0		
Biofilm bassin	28-6-2016	56	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0		
Biofilm bassin	26-7-2016	84	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0		
Biofilm bassin	22-8-2016	112	0	0	0	2	0	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0		
Biofilm bassin	19-9-2016	140	3	1	0	0	0	4	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	3	2	0		
Biofilm bassin	17-10-2016	168	1	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	0		
CBM	31-5-2016	28	1	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	3	0	0		
CBM	28-6-2016	56	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0		
CBM	26-7-2016	84	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
CBM	22-8-2016	112	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0		
Biofilm wortels	3-5-2016	0	1	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	3	0	0		
Biofilm wortels	31-5-2016	28	3	0	0	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3	0	0		
Biofilm wortels	28-6-2016	56	1	0	0	2	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1	0	0		
Biofilm wortels	26-7-2016	84	0	0	0	2	0	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	3	2	0		
Biofilm wortels	22-8-2016	112	1	0	0	3	3	4	2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	1	4	0	0		
Biofilm wortels	19-9-2016	140	0	0	2	4	4	5	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	2	0		
PAPRIKA			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23		
Aanvoerwater	3-5-2016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
Aanvoerwater	31-5-2016	28	0	2	0	2	0	3	0	0	0	1	1	1	1	6	1	1	0	0	0	3	0	3	0		
Aanvoerwater	26-7-2016	84	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6	2	3	1	0	2	3	0	3	0		
Aanvoerwater	22-8-2016	112	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0		
Aanvoerwater	19-9-2016	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Aanvoerwater	17-10-2016	168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Drainwater	3-5-2016	0	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	2	1	0	0		
Drainwater	31-5-2016	28	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	2	1	0	0		
Drainwater	26-7-2016	84	0	4	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	4	2	3	3	0	0	2	3	2	0		
Drainwater	22-8-2016	112	1	6	1	1	0	5	1	0	0	0	0	0	0	6	2	4	5	0	0	6	2	0	0		
Drainwater	19-9-2016	140	0	3	1	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	5	1	1	4	0	0	2	4	0	0		
Drainwater	17-10-2016	168	0	2	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	2	3	0	0	0	0	3	0	0		
CBM	31-5-2016	28	1	3	2	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	5	1	0	0	1	0	2	1	1	0		
CBM	26-7-2016	84	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	1	3	0	0	0	2	2	1	0		
CBM	22-8-2016	112	2	3	1	0	0	3	2	0	0	0	0	1	0	6	2	3	2	0	0	3	3	2	0		
CBM	19-9-2016	140	0	3	0	0	0	4	1	1	0	0	0	0	0	6	1	2	0	0	0	2	4	0	0		
CBM	17-10-2016	168	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	2	2	0	0	0	2	0	0	0		
Steenwol	3-5-2016	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Steenwol	31-5-2016	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0		
Steenwol	26-7-2016	84	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0		
Steenwol	19-9-2016	140	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5	3	0	0	2	0	0	0		
P1	Botrytis_cinerea																										
P2	Fusarium_oxysporum																										
P3	Fus_solani																										
P4	Phytophthora_spp																										
P5	Phytoph_cryptogea																										
P6	Pythium_spp																										
P7	Pythium_aphaniderm																										
P8	Pythium_irregulare																										
P9	Rhizoctonia_solani																										
P10	Trichoderma_spp																										
P11	Verticillium_spp																										
P12	Alternaria_spp																										
P13	Didymella_spp																										
P14	Fusarium_spp																										
P15	Fusarium_lactis																										
P16	Fusarium_sacchari																										
P17	Olpidium_virulentus																										
P18	Phoma_destructiva																										
P19	Phytoph_cinnamomi																										
P20	Plectosph_cucumerina																										
P21	Pythium_dissotocum																										
P22	Pythium_sylvaticum																										
P23	Stemphylium_spp																										

Tabel 3.1. De resultaten van de multiscan pakket 162 voor kwantificatie van 59 verschillende plantpathogene schimmels van de monsters van de slateelt en de paprikateelt.

Resultaten teelt op water; slateelt: *Botrytis cinerea* wordt aan het begin van het seizoen in beperkte mate gevonden in de biofilm van de wand van het systeem, en de biofilm op de wortels. Vanaf dag 112 wordt het ook in lichte mate gevonden in het bassinwater. *Phytophthora* wordt geregeld gedetecteerd in alle monstertypen, en neemt vanaf dag 112 toe in de biofilm van de wortels. Dit is dan vooral *Phytophthora cryptogea* (P5). P6 *Pythium* spp en P21 *Pythium dissotocum* laten een bijna gelijk patroon zien, waardoor vooral *Pythium*

dissotocum soort aanwezig is. Deze schimmel wordt in hoogste aantallen gedetecteerd in de biofilm van de wand van het bassin, en in de biofilm van de wortels. *Olpidium virulentis* wordt alleen gedetecteerd op de wortels van de slaplanten, en is vanaf de eerste dag van het bemonsteringsprogramma aanwezig, maar neemt af in intensiteit. Hij lijkt onder deze condities de slaplanten niet te infecteren. *Plectosph cucumerina* (P20) wordt regelmatig gevonden, maar neemt niet duidelijk toe of af gedurende het seizoen. Resumerend is *Pythium* de meest gedetecteerde schimmel van deze multiscan op de slateelt, en deze neemt toe in aantal gedurende het seizoen.

Resultaten teelt op substraat; paprika: Bij de bemonstering van de paprika teelt valt op dat op dag 28 en 84 het aanvoerwater al een relatief grote hoeveelheid soorten aan ziekteverwekkers bevat, waarvan *Fusarium* in een hoge concentratie. Verder worden de meeste soorten ziekteverwekkers gevonden in het drainwater, en in de biofilm die wordt gevormd in de CBM die wordt gevoed door het drainwater. Op het substraat worden minder pathogenen gevonden, maar worden dag 140 aan het eind van het seizoen een aantal *Fusarium* soorten gevonden. In het drainwater worden de hoogste infectiedruk gevonden op dag 112, in augustus, en deze neemt daarna weer iets af. *Fusarium* (P2, P14, P15, P16) is altijd aanwezig in het drainwater en wordt ook gevonden in de biofilm die wordt gevormd in de CBM (die wordt gevoed met het drainwater). Ook *Pythium* (P6 en P22) wordt altijd gedetecteerd in het drainwater en in de biofilm van de CBM. *Olpidium virulentis* (P17) is voornamelijk aanwezig in het drainwater, terwijl *Plectosph cucumerina* (P20) net al bij teelt op water regelmatig in alle monsters wordt gedetecteerd, maar laat verder geen regelmatig patroon zien. In de paprika teelt zijn *Fusarium* en in mindere mate *Pythium* de meest gedetecteerde pathogenen, en deze worden vooral in het drainwater en in de biofilm van de CBM gedetecteerd.

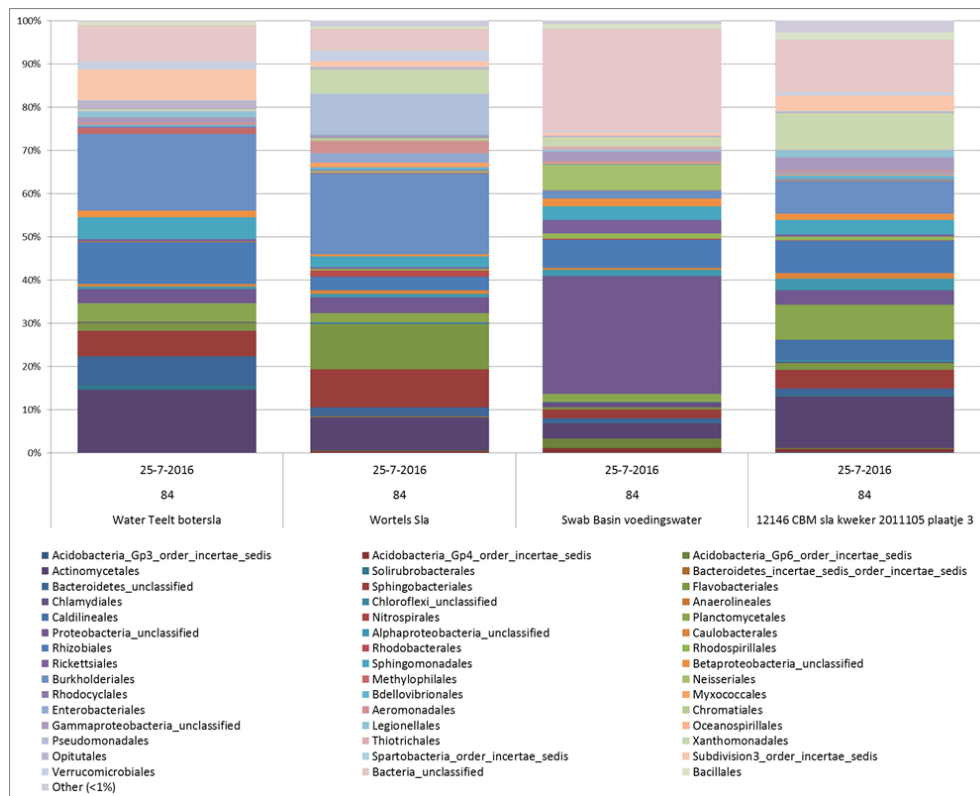
3.4 Analyse van de monsters door middel van Next Generation Sequencing.

3.4.1 NGS analyse teelt op water

Tabel 3.2. Monsters van teelt op water die zijn geanalyseerd door middel van NGS

Monster	Dag	Datum
Water teelt botersla	28	30-05-2016
Water teelt botersla	84	25-07-2016
Water teelt botersla	140	19-09-2016
Wortels Sla	28	30-05-2016
Wortels Sla	84	25-07-2016
Biofilm Bassin	84	25-07-2016
CBM 2011105 pl 3	84	25-07-2016

In figuur 3.16 worden grafisch de bacteriepopulaties op taxonomisch Orde niveau weergegeven van bassinwater, biofilm van het bassin, biofilm van de wortels van een slaplant en de biofilm van de CBM op dag 84.



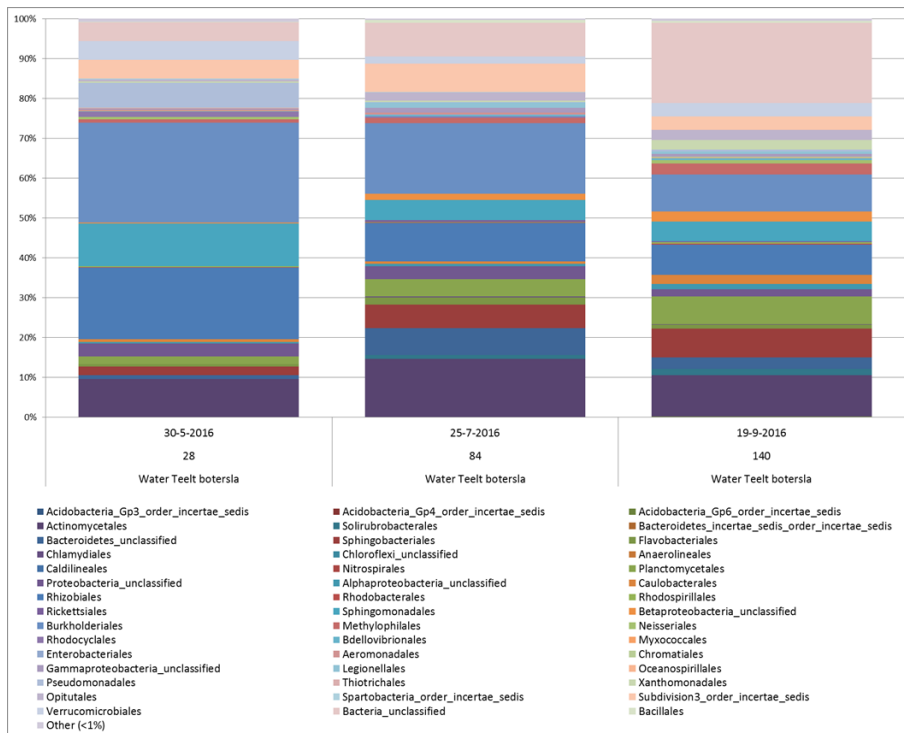
Figuur 3.16. Analyse van de bacteriepopulatie op Orde niveau van het bassinwater, de biofilm van de bassinwand, de biofilm op de wortels van de plant en de biofilm uit de CBM.

Uit deze figuur blijkt dat met name het monster dat afkomstig is van de wand van het bassin duidelijk anders is van bacteriële samenstelling dan de drie andere monsters. Ook de andere drie monsters hebben elk een eigen bacteriepopulatie, maar deze verschillen minder van elkaar. Wel hebben alle monsters eigen specifieke bacteriepopulaties. Zo komen bijvoorbeeld bacterie-Orden Rhodobacterales, Aeromonadales en Pseudomonadales uitsluitend voor in de biofilm van de wortels.

Tabel 3.3. De bacterie-Orden in de monsters die meer dan 1% van de totale bacteriepopulatie uitmaken (groen gemarkeerd).

Dag>	Water Teelt la 84	Wortels Sla 84	Biofilm Basin 84	CBM sla 84
Datum monster>	25-7-2016	25-7-2016	25-7-2016	25-7-2016
Acidobacteria_Gp4_order_incertae_sedis	0,02	0,31	1,03	0,81
Acidobacteria_Gp6_order_incertae_sedis	0,04	0,17	2,17	0,20
Actinomycetales	14,55	7,53	3,49	11,99
Bacteroidetes_unclassified	6,76	2,06	1,11	1,37
Sphingobacteriales	5,89	8,70	2,13	4,43
Flavobacteriales	1,84	10,48	0,39	1,51
Chlamydiales	0,15	0,10	1,16	0,24
Caldilineales	0,06	0,31	0,06	4,67
Planctomycetales	4,36	2,14	1,91	7,98
Proteobacteria_unclassified	3,19	3,59	27,29	3,45
Alphaproteobacteria_unclassified	0,62	0,87	1,43	2,61
Caulobacteriales	0,66	0,90	0,49	1,34
Rhizobiales	9,57	3,06	6,52	7,47
Rhodobacterales	0,18	1,41	0,19	0,14
Rhodospirillales	0,13	0,46	1,20	0,80
Rickettsiales	0,43	0,26	3,17	0,55
Sphingomonadales	5,08	2,64	3,14	3,34
Betaproteobacteria_unclassified	1,51	0,38	1,82	1,42
Burkholderiales	17,76	18,68	1,81	7,53
Methylophilales	1,25	0,26	0,03	0,05
Neisseriales	0,11	0,37	5,92	0,09
Myxococcales	0,04	1,04	0,20	0,20
Enterobacteriales	0,03	2,15	0,02	0,53
Aeromonadales	0,51	2,88	0,31	0,38
Gammaproteobacteria_unclassified	1,21	0,74	2,24	2,97
Legionellales	1,30	0,32	0,33	1,58
Pseudomonadales	0,10	9,18	0,17	0,20
Xanthomonadales	0,34	5,67	2,12	8,49
Opitutales	2,15	0,52	0,35	0,36
Subdivision3_order_incertae_sedis	7,15	1,33	0,75	3,60
Verrucomicrobiales	1,85	2,37	0,30	0,71
Bacteria_unclassified	8,42	5,16	23,63	12,23
Bacillales	0,71	0,58	1,08	1,63
Other (<1%)	0,33	1,27	0,86	2,79

Bij teelt op water zijn de watermonsters van dag 28, 84 en 140 met elkaar vergeleken. Deze omvatten een groot deel van het seizoen (Fig 3.17).



Figuur 3.17. Een vergelijk van de bacteriepopulaties in het bassinwater op dag 28, dag 84 en dag 140.

Tabel 3.4. De bacterie-Orden in de watermonsters die meer dan 1% van de totale bacteriepopulatie uitmaken (groen gemarkeerd). Toenemende bacteriepopulaties zijn oranje weergegeven, afnemende populaties zijn paars weergegeven.

Dag>	Water Teelt botersla 28	Water Teelt botersla 84	Water Teelt botersla 140
Datum monster>	30-5-2016	25-7-2016	19-9-2016
Actinomycetales	9,47	14,55	10,36
Solirubrobacterales	0,01	0,95	1,58
Bacteroidetes_unclassified	0,97	6,76	2,95
Sphingobacteriales	2,12	5,89	7,25
Flavobacteriales	0,64	1,84	0,87
Planctomycetales	1,85	4,36	7,05
Proteobacteria_unclassified	3,32	3,19	1,76
Alphaproteobacteria_unclassified	0,32	0,62	1,36
Caulobacterales	0,79	0,66	2,24
Rhizobiales	17,88	9,57	7,64
Sphingomonadales	10,71	5,08	4,94
Betaproteobacteria_unclassified	0,21	1,51	2,58
Burkholderiales	25,05	17,76	9,23
Methylophilales	0,83	1,25	2,77
Rhodocyclales	1,32	0,33	0,02
Gammaproteobacteria_unclassified	0,30	1,21	0,77
Legionellales	0,10	1,30	0,55
Pseudomonadales	6,32	0,10	0,43
Xanthomonadales	0,31	0,34	2,44
Opitutales	0,55	2,15	2,53
Subdivision3_order_incertae_sedis	4,66	7,15	3,40
Verrucomicrobiales	4,77	1,85	3,30
Bacteria_unclassified	4,64	8,42	20,12

Door de brede opzet van het bemonsteringsprogramma liggen de bemonsterde dagen ver uit elkaar. Dat betekent dat het water in de tijd tussen de monsternamen behoorlijk kan veranderen. Het is daardoor wel mogelijk trends te zien in de vorm van toenemende of afnemende bacteriepopulaties (in de tabel in oranje en paars weergegeven). Een sterke toename wordt waargenomen in de nog niet geclassificeerde bacteriën. Dit zijn bacteriën waar niet van bekend is tot welke Orde ze behoren. Deze bacteriën, die op dag 140 20% van de bacteriën in het bassinwater uitmaken, zijn dus niet eerder geclassificeerd, en tot op heden onbekend. In andere watertypen (bv drinkwater, oppervlaktewater) worden overigens met NGS ook vaak niet eerder beschreven bacteriegroepen waargenomen. Een sterk afnemende bacterie-Orde is Rhizobiales. Bacteriën die behoren tot de Orde Rhizobiales zijn veelal betrokken bij de stikstofopname van de plant. Ook de Orde Burkholderiales neemt sterk af. Een deel van de populatieverandering zal het gevolg zijn van het beschikbaar komen van meer organische stof in het bassinwater.

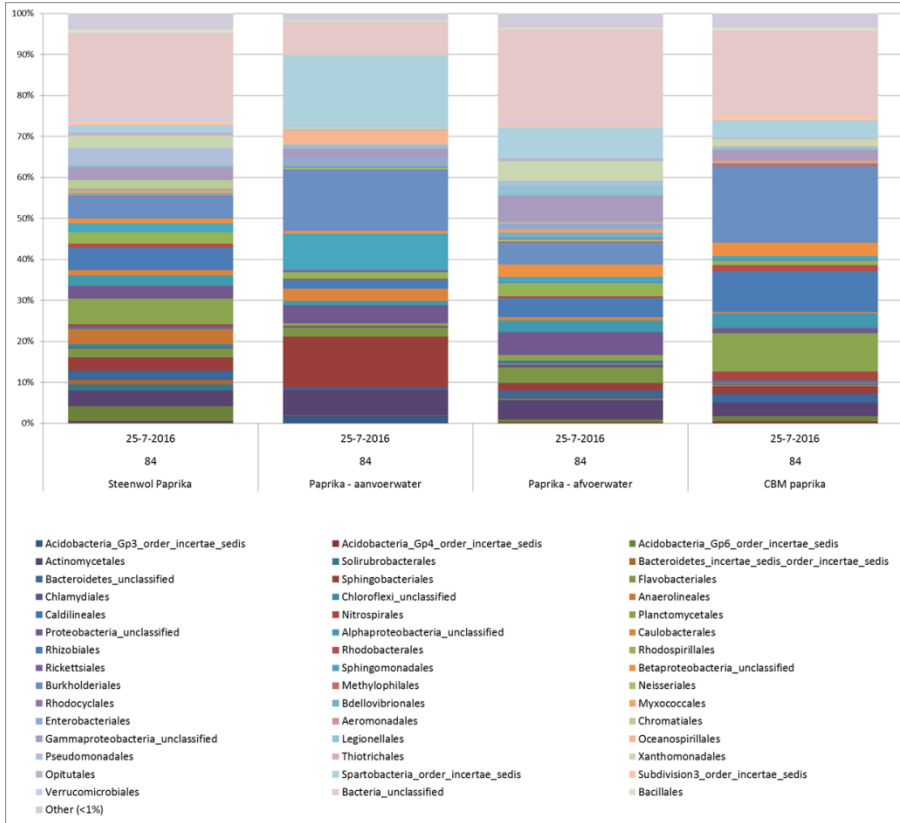
3.4.2 NGS analyse teelt op substraat.

Ook bij de paprikateelt op substraat zijn een aantal monsters geanalyseerd door middel van NGS. Hierbij zijn op dag 84 aan aanvoerwater en drainwater, het substraat en de CBM onderzocht. Verder is het substraat, drainwater en CBM nog een keer onderzocht op dag 140.

Tabel 3.5. De monsters voor analyse door middel van NGS

Monster	Dag	Datum
Steenwol paprika	28	30-05-2016
Steenwol paprika	84	25-07-2016
Steenwol paprika	140	19-09-2016
Aanvoerwater	84	25-07-2016
Drainwater	84	25-07-2016

Drainwater	140	19-09-2016
CBM	84	25-07-2016
CBM	140	19-09-2016

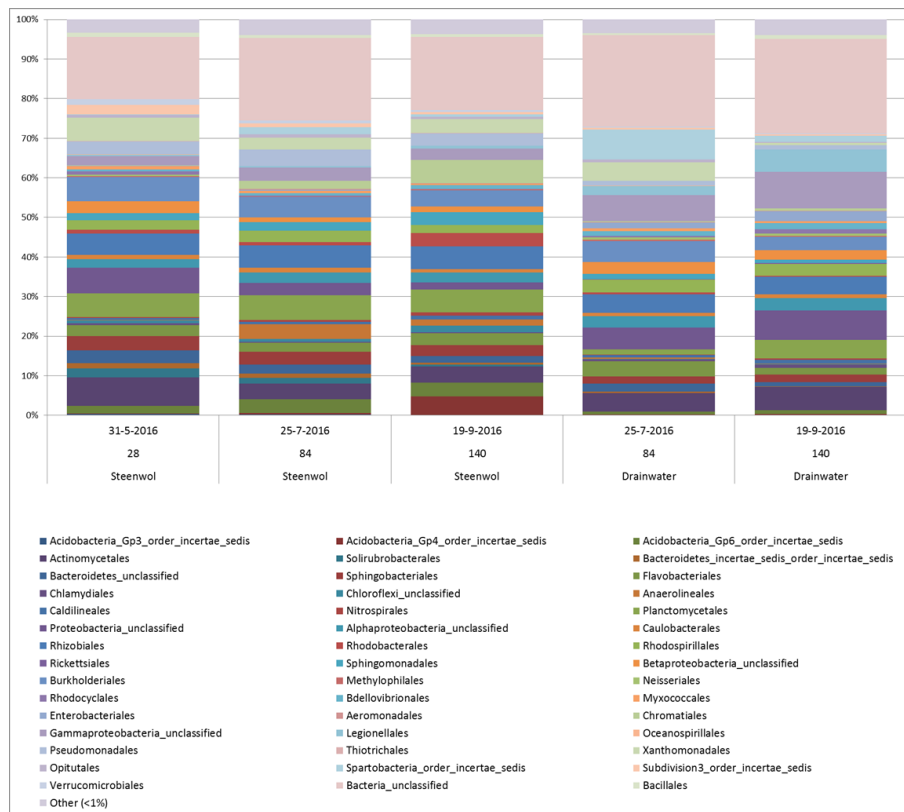


Figuur 3.18. Een vergelijking van de bacteriepopulaties in het aanvoerwater, drainwater steenwol en CBM op dag 84.

Figuur 3.18 laat zien dat de bacteriën in het substraat geen grote subpopulaties bevatten, maar bestaat uit een grote diversiteit van verschillende orden. Een groot deel van de bacteriën (21%) behoort tot bacteriën die nog niet zijn geassocieerd, en dus onbekend zijn. Het aantal bacterie-Orden in het toevoerwater is beduidend lager, wat wordt veroorzaakt door de desinfecterende werking van het aanwezige chloor in dit water. Het totaal aantal Orden neemt af, en er zijn een aantal subgroepen die dominant aanwezig zijn. De CBM is gekoppeld aan het drainwater, en de biofilm die wordt gevormd op de plaatjes in de CBM is gevormd door de samenstelling van het drainwater. Het derde en het vierde monster vergelijken de bacteriepopulatie van het drainwater met de populatie die aanwezig is in de biofilm op de plaatjes van de CBM. Tabel 3.6 laat zien dat 16 bacterie-Orden gemeenschappelijk voorkomen in beide monsters. 4 bacterie-Orden komen meer voor in de biofilm van de CBM dan in het drainwater, terwijl 5 bacterie-orden juist meer voorkomen in het drainwater. Dit heeft als achtergrond dat bepaalde bacterie-Orden zich goed kunnen handhaven in een biofilm, terwijl andere Orden beter gedijen in water. Hierdoor zal de samenstelling van de bacteriële populatie van water altijd verschillen van die in een biofilm.

Tabel 3.6. De bacteriesoorten op dag 84 (25 juli) die meer dan 1% van de totale bacteriepopulatie uitmaken (groen gemarkeerd) in aanvoerwater, drainwater steenwol en de CBM.

	Steenwol Paprika	Paprika - aanvoerwater	Paprika - drainwater	CBM paprika
Dag>	84	84	84	84
Datum monster>	25-7-2016	25-7-2016	25-7-2016	25-7-2016
Acidobacteria_Gp3_order_incertae_se	0,27	1,80	0,03	0,02
Acidobacteria_Gp6_order_incertae_se	3,53	0,16	0,67	1,25
Actinomycetales	3,91	6,08	4,69	3,18
Solirubrobacterales	1,47	0,04	0,05	0,05
Bacteroidetes_incertae_sedis_order_	1,06	0,02	0,35	0,02
Bacteroidetes_unclassified	2,28	0,58	1,97	2,16
Sphingobacterales	3,20	12,46	1,84	1,81
Flavobacterales	2,26	2,24	3,77	0,34
Anaerolineales	3,74	0,08	0,29	0,19
Nitrospirales	0,51	0,02	0,10	2,05
Planctomycetales	6,25	0,61	1,37	9,40
Proteobacteria_unclassified	3,12	4,40	5,49	1,23
Alphaproteobacteria_unclassified	2,55	1,03	2,87	3,56
Caulobacterales	1,28	2,91	0,83	0,38
Rhizobiales	5,57	2,26	4,71	9,93
Rhodobacterales	0,88	0,20	0,42	1,49
Rhodospirillales	2,84	1,69	3,26	1,04
Sphingomonadales	2,18	8,96	1,36	1,04
Betaproteobacteria_unclassified	1,16	0,71	2,97	3,17
Burkholderiales	5,11	14,89	5,34	18,65
Bdellovibrionales	0,60	0,54	1,19	0,20
Enterobacterales	0,22	1,86	1,44	0,01
Chromatiales	2,06	0,05	0,22	0,04
Gammaaproteobacteria_unclassified	3,31	1,95	6,61	2,65
Legionellales	0,42	1,03	2,35	0,72
Oceanospirillales	0,00	3,40	0,03	0,00
Pseudomonadales	4,19	0,40	1,25	0,21
Xanthomonadales	2,99	0,40	4,65	1,69
Spartobacteria_order_incertae_sedis	1,83	17,47	7,57	4,33
Subdivision3_order_incertae_sedis	0,94	0,22	0,45	1,33
Bacteria_unclassified	20,88	7,93	23,17	20,49
Other (<1%)	3,96	1,64	3,42	3,42



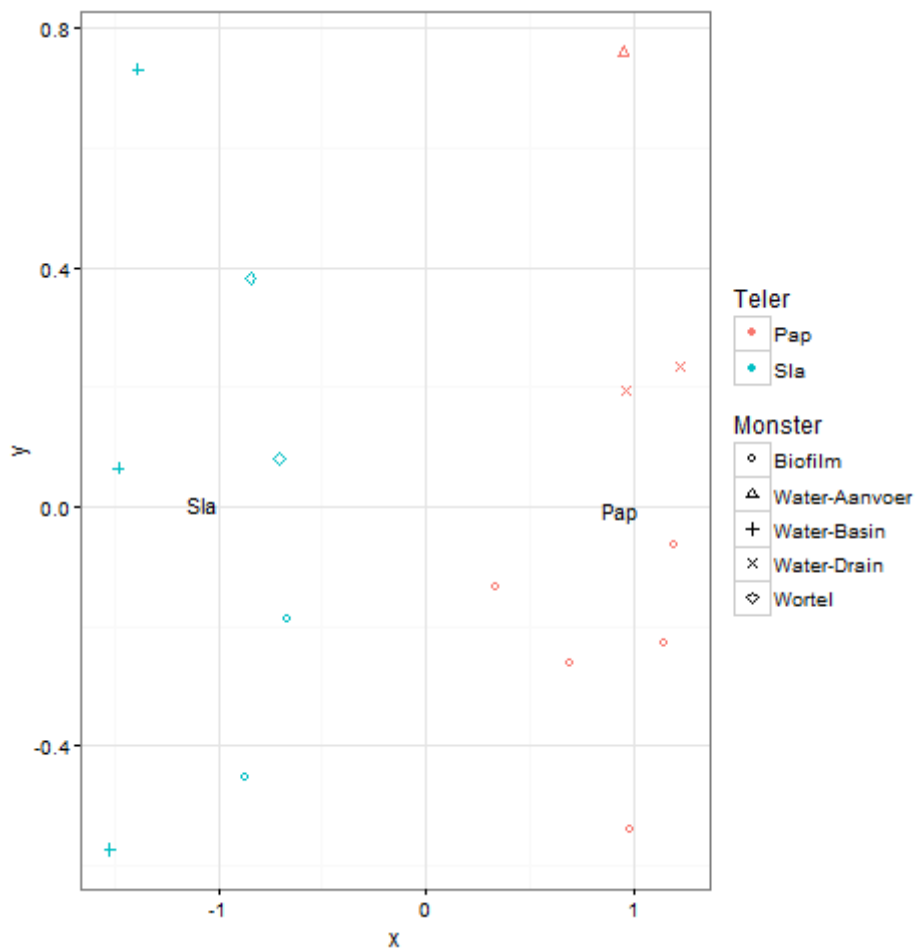
Figuur 3.19. De bacteriepopulaties in het paprika substraat steenwol op dag 28, 84 en 140 en het drainwater op dag 84 en 140.

In figuur 3.19 zijn de bacteriepopulaties vergeleken in het steenwol gedurende het seizoen. Tevens zijn hierbij de NGS resultaten van het drainwater vergeleken, omdat het drainwater direct afkomstig is uit het steenwol, en daardoor een deel van de in het steenwol aanwezige bacteriesoorten zal bevatten. Uit figuur 3.19 is af te leiden dat in de tijd veranderingen optreden in de bacteriepopulatie in steenwol, maar dat deze veranderingen relatief klein zijn. (zie hiervoor ook tabel 3.7). Ook de populatie in het drainwater vertoont in redelijk mate overeenkomsten. In geen van de monsters is een bacterie-orde dominant (>10%) aanwezig.

Table 3.7. De belangrijkste bacterie-Orden in steenwol en in drainwater. Toenemende bacterie-Orden gedurende het seizoen zijn oranje gemarkeerd, afnemende populaties zijn paars gemarkeerd.

Dag> Datum monster>	Steenwol	Steenwol	Steenwol	Drainwater	Drainwater
	28 31-5-2016	84 25-7-2016	140 19-9-2016	84 25-7-2016	140 19-9-2016
Acidobacteria_Gp4_order_incertae_sedis	0,04	0,31	4,73	0,22	0,29
Acidobacteria_Gp6_order_incertae_sedis	1,91	3,53	3,47	0,67	1,02
Actinomycetales	7,26	3,91	4,06	4,69	5,79
Solirubrobacterales	2,30	1,47	0,47	0,05	0,11
Bacteroidetes_incertae_sedis_order_ince	1,24	1,06	0,49	0,35	0,01
Bacteroidetes_unclassified	3,31	2,28	1,64	1,97	1,12
Sphingobacterales	3,57	3,20	2,79	1,84	1,92
Flavobacterales	2,78	2,26	3,00	3,77	1,70
Chloroflexi_unclassified	0,70	0,76	1,72	0,23	0,11
Anaerolineales	0,11	3,74	1,47	0,29	0,14
Planctomycetales	6,00	6,25	5,80	1,37	4,66
Proteobacteria_unclassified	6,53	3,12	1,81	5,49	7,45
Alphaproteobacteria_unclassified	2,08	2,55	2,56	2,87	3,17
Caulobacterales	1,17	1,28	0,81	0,83	0,85
Rhizobiales	5,29	5,57	5,77	4,71	4,50
Rhodobacterales	1,05	0,88	3,30	0,42	0,20
Rhodospirillales	2,34	2,84	2,08	3,26	2,98
Sphingomonadales	1,79	2,18	3,20	1,36	0,88
Betaproteobacteria_unclassified	3,04	1,16	1,43	2,97	2,41
Burkholderiales	6,06	5,11	4,13	5,34	3,38
Rhodocyclales	0,84	0,24	0,22	0,35	1,06
Bdellovibrionales	0,47	0,60	0,91	1,19	1,55
Enterobacterales	0,01	0,22	0,03	1,44	2,52
Chromatiales	0,13	2,06	5,86	0,22	0,64
Gammaproteobacteria_unclassified	2,30	3,31	2,96	6,61	9,19
Legionellales	0,37	0,42	0,71	2,35	5,63
Pseudomonadales	3,26	4,19	3,13	1,25	1,03
Xanthomonadales	5,84	2,99	3,42	4,65	0,60
Spartobacteria_order_incertae_sedis	0,16	1,83	0,55	7,57	1,48
Subdivision3_order_incertae_sedis	2,39	0,94	0,58	0,45	0,46
Verrucomicrobiales	1,50	0,70	0,47	0,22	0,15
Bacteria_unclassified	15,61	20,88	18,47	23,17	23,89
Bacillales	1,12	0,73	0,80	0,54	0,98
Other (<1%)	3,36	3,96	3,67	3,42	3,96

Uit de bovenstaande NGS resultaten blijkt dat het met NGS heel goed mogelijk is om de bacteriepopulatie van een water of biofilm monster te bepalen. Door middel van een OTU (operational taxonomic unit) figuur kan inzicht worden verkregen in hoeverre bepaalde bacteriepopulaties in monsters op elkaar lijken. In figuur 3.20 is te zien dat alle monsters uit de teelt op water aan de linkerkant van de figuur clusteren, terwijl de punten van de paprika teelt voornamelijk rechts clusteren. Naast verschillen in gewas en methode van teelt speelt hier ook de aanwezigheid van chloor bij de teelt op substraat een grote rol. Wat verder te zien is, is dat biofilm monsters ook een eigen bacteriële samenstelling hebben, en daarmee vooral aan de onderkant van de figuur clusteren. Opvallend is dat de drie monsters (dag 28, 84 en 140) van water van de slateelt aan de linkerkant van de figuur clusteren, maar de monsters van verder behoorlijk veel van elkaar verschillen, omdat ze zowel boven, midden als onder in de otu figuur clusteren.



Figuur 3.20. De resultaten van een OTU analyse grafisch weergegeven. De door middel van NGS geanalyseerde monsterpunten zijn weergegeven in de bovenstaande figuur. Punten met een op elkaar gelijkende bacteriële populatie liggen dicht bij elkaar.

Voor een eventueel vervolgproject is het advies om vaker te monitoren, dicht rondom een omslagpunt van de teelt. Dan kan met behulp van NGS een zeer gedetailleerd beeld worden verkregen van de veranderingen in bacteriepopulaties die direct kunnen worden gekoppeld aan de teeltcondities en de fitness van de plant. Dit geeft in combinatie met het monitoren van organische verbindingen directe informatie over welke bacteriegroepen de grootste veranderingen vertonen direct voor het ziek worden van een teelt. Dit is de basis om tot een handelingsperspectief te komen voor het aanpakken van microbiologische problemen bij teelt op water en substraat.

4 Discussie

4.1 Monitoringsprogramma

De onderzoeksvraag binnen dit project was of er factoren zijn in de kas die in de loop van het seizoen veranderen, en daarmee de aanzet kunnen zijn tot een verslechterde microbiologische waterkwaliteit. Omdat op voorhand niet kon worden voorspeld welke factoren belangrijk kunnen zijn voor de microbiologische waterkwaliteit, is een breed monitoringsprogramma opgesteld waarin zowel chemische als microbiologische parameters werden vastgesteld. Dit is gedaan omdat eventuele chemische veranderingen ook van invloed kunnen zijn op de groei van bepaalde micro-organismen of deze juist remmen. Door zowel chemisch als microbiologisch te monitoren kunnen deze mogelijke verbanden worden opgehelderd. Daarnaast moest het monitoringsprogramma het gehele groeiseizoen omvatten, omdat eventuele problemen vaak optreden tijdens warme zomerdagen, of aan het eind van het groeiseizoen. Vanwege de grote omvang (aantal gemeten parameters) van het monitoringsprogramma, en de lengte van het seizoen, is er voor gekozen om bij de teelt op water (slateelt) maandelijks te bemonsteren, en bij de teelt op substraat twee maandelijks, beginnende in mei en eindigend in november 2016.

4.2 Het gedrag van plantpathogenen, de rol van de biofilm.

Bij regulier onderzoek van het water in de kas wordt de biofilm zelden onderzocht, en uitsluitend naar de micro-organismen gekeken die aanwezig zijn in het water. De biofilm en water zijn echter niet los van elkaar te zien. De watersamenstelling beïnvloedt de grootte en microbiële populatie van de biofilm. Verder verschillen water en biofilm onderling in microbiële samenstelling, en gaan micro-organismen vanuit de biofilm naar de waterfase en andersom. Plantpathogene micro-organismen die zich in de biofilm bevinden, kunnen zich van daaruit verder verspreiden. Mochten plantpathogene micro-organismen in de biofilm aanwezig zijn, dan zijn ze daar moeilijk te bestrijden omdat desinfectiemiddelen niet goed doordringen in de matrix van de biofilm. Om deze redenen is het belangrijk om niet alleen het water te onderzoeken maar ook de samenhang tussen het water en de biofilm. In dit onderzoek is bij de teelt op water en substraat zowel het water als de biofilm bemonsterd en geanalyseerd op de microbiologische kwaliteit. Daarnaast zijn CBM's en BPP's ingezet om te bepalen wat de biofilmvormingssnelheid en microbiologische groeipotentie is van het water, en of het mogelijk is om met DNA technieken in meer detail te kijken naar de micro-organismen in de biofilm. De NGS resultaten laten bij de teelt op water duidelijk zien dat de biofilm op de wand van het bassin voor wat betreft bacteriesamenstelling sterk afwijkt van die in het water. Het is goed mogelijk om met de biofilm monitor de snelheid van biofilmvorming te bepalen van het water, en tevens met behulp van DNA technieken te kijken naar de aanwezigheid van ziekteverwekkers in de biofilm. Binnen dit onderzoek is de biofilm onderzocht op de aanwezigheid van schimmels door middel van de multiscan, maar dat kan ook worden gedaan voor andere bekende plantpathogenen.

4.3 ATP metingen

In dit onderzoek is naar voren gekomen dat gedurende het seizoen oplosbare organische verbindingen toenemen in het bassinwater bij teelt op water en in het drainwater bij teelt op substraat. Oplosbare organische verbindingen zijn goede energiebronnen voor bacteriën, en stimuleren daarom bacteriegroei. Door middel van ATP kan de hoeveelheid bacteriën snel en gemakkelijk worden gekwantificeerd. ATP is de energiedrager in een bacterie, en de totale hoeveelheid ATP in een monster is een maat voor de totale hoeveelheid micro-organismen in

een monster. Binnen dit programma is het ATP gehalte bepaald in het laboratorium van KWR volgens een gestandaardiseerde methode, en met een gevalideerde mobiele testkit van Milispec Int. De mobiele testkit kan zeer snel het ATP gehalte op locatie bepalen. In drinkwater is het ATP gehalte een zeer precieze en betrouwbare maat voor het aantal bacteriën in een monster. De aanname was dat dit ook bij metingen van bassin water, ingaand water en drainwater het geval zou zijn. In het bassinwater bij de teelt op water worden waarden vastgesteld die liggen tussen de 800 en 3000 ng/l ATP. Deze waarden zijn zeer hoog, maar het is niet bekend wat normale waarden zijn in het bassinwater omdat deze metingen niet eerder zijn uitgevoerd, en er geen referentiewaarden zijn. De gemeten ATP waarden vertonen ook grote schommelingen. Ook hiervoor geldt dat het lastig is om te bepalen binnen welke range de schommelingen van dit water kunnen vallen, omdat niet bekend is hoeveel variatie de ATP waarde vertoont per dag of per week. Een wellicht storende factor bij teelt op water is de aanwezigheid van algen. Deze zijn niet aanwezig in drinkwater, maar wel in het bassinwater bij teelt op water. Soms zijn de algenaantallen zeer hoog, en omdat algen ook ATP bevatten kunnen ze de ATP concentraties beïnvloeden. Hiermee interfereren ze met de bacteriën, en is ATP in dat geval geen goede maat meer voor de hoeveelheid actieve bacteriële biomassa. Overigens is het mogelijk dat ook groei van algen voorspellend is voor eventuele microbiologische waterkwaliteitsproblemen in het water, aangezien bacteriën en schimmels ook kunnen groeien op de producten die algen uitscheiden of wanneer de algen afsterven in het water. In een eventueel vervolg monitoringsprogramma zal in meer detail naar de ATP waarden en mogelijke versturende factoren van bijvoorbeeld algen in een bassin moeten worden gekeken. Opvallend was verder dat de metingen met de mobiele test unit van Milispec over het algemeen hoger waren dan de metingen van KWR. Het is bekend dat de lysisbuffer van de mobiele testkit in staat is om de celmembraan van bacteriën kapot te maken. Dit is de stap in het protocol die nodig is om het ATP vrij te maken uit de bacteriële cellen. Algen hebben naast een celmembraan ook een sterke celwand en het is mogelijk dat de lysisbuffer van de laboratoriumtest minder goed in staat is om algencellen open te breken dan de mobiele testkit. In dat geval zal de mobiele testkit van Milispec hogere ATP concentraties meten dan de laboratoriumanalyses bij KWR. Ook dit is iets wat beter zal moeten worden onderzocht. Hoewel ATP in drinkwater erg nauwkeurig een beeld kan geven van de hoeveelheid actieve bacteriële biomassa, lijkt dit bij monsters afkomstig van het bassin bij teelt op water toch lastiger te zijn. Omdat ATP de bacterie aantallen wel goed kan weergeven, en er in het bassin bij teelt op water een relatie is tussen de hoeveelheid organische stof en KG bacteriën, blijft ATP, na een optimalisatiestap toch een belangrijke en veelbelovende parameter, waarbij het belangrijkste voordeel zal zijn dat de meting snel en op locatie kan plaatsvinden.

4.4 De rol van organische verbindingen bij teelt op water en substraat

TOC (total organic carbon) en DOC (dissolved organic carbon) zijn gedurende het monitorings programma bij zowel de slateler als bij de paprika teler bepaald, en nemen vanaf het begin van het groeiseizoen toe. Organische stof is een zeer belangrijke energiebron voor een groot deel van de bacteriën in het water en de biofilm. In drinkwater wordt de concentratie organische stof zo laag mogelijk gehouden, om groei van micro-organismen zo veel mogelijk te beperken. Bassinwater of toevoerwater bij een substraatteelt is vaak regenwater of gerecycled water, opgeslagen in een bassin of soms in de ondergrond, en kan verschillen in de concentratie organische stof. Hoewel er weinig bekend is over de van oorsprong aanwezige hoeveelheid organische stof in dit voorraadwater, speelt het waarschijnlijk maar een kleine rol bij de concentratie organische verbindingen in bassin of voedings en drainwater. Planten zijn zelf de belangrijkste bron van organische verbindingen. Tijdens fotosynthese neemt de plant CO₂ op uit de lucht, en zet dit om in organische verbindingen, en die worden voor een deel door de wortels uitgescheiden. Planten doen dat om de bacteriepopulatie direct rondom hun wortels te voorzien van voedingsstoffen, en

hiermee in symbiose met de bacteriën de omgeving direct rondom de wortels geschikter te maken voor het opnemen van nutriënten en voedingsstoffen. Bij teelt op water en substraat komen deze verbindingen in het water of in de substraatmat terecht, en zijn daarmee een uitermate geschikte energiebron voor de in het water en de biofilm levende bacteriën. De toename van organische verbindingen is in dit monitoringsprogramma bij zowel de teelt op water als bij de teelt op substraat waargenomen. Uit de BPP test blijkt ook dat deze organische verbindingen in de loop van het seizoen niet direct volledig worden gebruikt door de in het bassin aanwezige bacteriën, maar er meer wordt geproduceerd dan de bacteriën in het bassin kunnen verbruiken. Er vindt dus een geleidelijke opbouw van organische verbindingen plaats.

Het is niet bekend of de plant de mate van productie van organische verbindingen kan controleren. In dat geval kan de response van de plant op volle grond anders zijn bij een teelt op water. Bij teelt op water zal de hoeveelheid bacteriën in de directe omgeving van de plantenwortel laag zijn ten opzicht van teelt op volle grond. De plant kan dit wellicht merken aan de (beperkte) hoeveelheid nutriënten die hij kan opnemen, en zal als response daarop meer organische verbindingen gaan produceren, om de hoeveelheid bacteriën rondom de wortels te verhogen. Hiermee zal de hoeveelheid organische verbindingen alleen verder toenemen in het water, en besteedt de plant energie aan de onnodige productie van deze organische verbindingen. Het is daarom belangrijk om te kijken of er een relatie bestaat tussen de omstandigheden waaronder de productie van organische verbindingen plaatsvindt, en de groeiomstandigheden van de plant.

De organische stof gehalten in het bassin bij de slateler zijn met waarden tussen de 12 en 16 mg/l niet extreem hoog voor water in een kas, maar uit de BPP waarden blijkt dat het water in het bassin wel een hoge microbiologische groeipotentie heeft. Dit betekent dat er veel afbreekbare stoffen door de slaplanten worden geproduceerd waar bacteriën goed op kunnen groeien. Het KG22 (bestaande uit bacteriën die snel kunnen groeien op organische verbindingen) laat in de eerste 84 dagen van het groeiseizoen dan ook een stijging zien, die daar aan kan worden gerelateerd. Uit de BPP kan verder worden geconcludeerd dat vanaf ongeveer dag 50 door de slaplanten meer organische stof geproduceerd wordt dan de bacteriën in het bassin kunnen verbruiken. Er ontstaat vanaf dat moment een overschot aan organische verbindingen, en die zijn direct beschikbaar voor bacteriën om te groeien. Ook blijkt uit de BPP test dat deze organische verbindingen gemakkelijk door bacteriën afbreekbaar zijn, en dus een onmiddellijk beschikbare voedingsbron zijn voor bacteriën. Dit is in potentie een situatie waarin de waterkwaliteit negatief kan veranderen, en dit wordt in deze studie ook waargenomen door de toename van KG22 en plant pathogene schimmels gedurende het seizoen. Bij veel teelten op water of substraat worden problemen gesignaleerd bij een reeks lange zonnige warme dagen. Voor planten zijn dit dagen met maximale fotosynthese en veel productie van organische verbindingen. Daarnaast wordt de temperatuur van het bassinwater hoog, wat door de al aanwezige hoeveelheid organische verbindingen kan resulteren in een zeer snelle vermeerdering van bacteriën. Een hypothese die hieruit volgt is dat snelle zuurstofconsumptie door snelle bacteriegroei, zorgt voor een vermindering van zuurstof in een teeltsysteem. Mogelijk wordt het water korte tijd zuurstofloos en hierdoor sterft de normale aerobe bacteriële populatie (de "goede" microbiologie) af, en krijgen de opportunistische ziekteverwekkers de kans toe te slaan en het systeem definitief te destabiliseren.

In deze studie is ook een substraatteelt onderzocht in het monitoringprogramma, omdat daar ook problemen optreden die vermoedelijk gerelateerd zijn aan een slechte microbiologische waterkwaliteit. Opvallend is dat de organische stof gehalten in het toevoerwater rond de 15 mg C/l zijn, terwijl in het drainwater met 35 mg C/L een ongeveer

2 keer zo hoge waarde wordt waargenomen. De paprikaplanten produceren organische stof in de wortels, en een deel van de organische stof wordt gebruikt door de bacteriën in de steenwol tijdens de passage van het water door het steenwol. Niet alle geproduceerde organische stof wordt afgebroken, want de concentratie organische verbindingen in het drainwater is hoger dan in het toevoerwater. Verder blijkt uit de BPP dat de bacteriën in het steenwol de gemakkelijk afbreekbare verbindingen gebruiken, en de resterende organische verbindingen van een minder gemakkelijk afbreekbaar type zijn. Dat betekent dat de organische verbindingen in het drainwater niet direct resulteren in bacteriële groei, maar wel in het water blijven en indien dit water wordt gerecirculeerd, de hoeveelheid steeds verder gaat toenemen. Uiteindelijk zullen zich bacteriën ontwikkelen die deze organische verbindingen wel kunnen gebruiken voor vermeerdering en groei, en dan kunnen deze bacteriën explosief vermeerderen.

4.5 Analyse van de bacteriepopulaties door middel van NGS.

Tijdens dit onderzoek zijn de bacteriepopulaties van een aantal monsters onderzocht door middel van NGS, om een beeld te krijgen van de bacteriesoorten in de verschillende water en biofilm monsters. NGS geeft een aantal belangrijke inzichten. Uit de watermonsters van het slabassin blijkt dat de bacteriepopulaties op ordeniveau van de drie watermonsters van dag 28, 84 en 140 duidelijk veranderen, en dat is ook de verwachting, omdat deze drie tijdstippen ver van elkaar liggen in het groeiseizoen. Desondanks worden dezelfde dominante bacterie-Orden wel in deze drie monsters waargenomen, en zijn vooral de hoeveelheden van iedere bacterie-Orde verschillend tussen de drie watermonsters in de tijd. Dit geeft aan dat door middel van NGS heel precies kan worden gekeken naar veranderingen in de bacteriepopulatie op Orde-niveau. Indien bijvoorbeeld monsters worden genomen op tijdstippen die veel dicht bij elkaar liggen, dan zijn de te verwachten veranderingen in populaties kleiner, waardoor beter kan worden ingezoomd op de precieze veranderingen in de populatie. Door vervolgens de monsternamen uit te voeren rondom het moment dat er problemen worden geconstateerd bij de teelt, kan dus ook heel precies worden bepaald welke bacteriepopulaties juist toe of afnemen. Een andere belangrijke waarneming is dat op Orde-niveau de bacteriepopulaties van het bassinwater duidelijk verschillen van de populaties die worden waargenomen in de biofilm van het bassin. De biofilm heeft dus zijn eigen microbiële samenstelling, en deze is niet vergelijkbaar met de samenstelling van het water. Het is daarom belangrijk om ook de biofilm bij de vraagstukken rondom microbiële waterkwaliteit te betrekken, omdat er uitwisseling is tussen micro-organismen van de waterfase en de biofilm. Micro-organismen uit beide fasen zijn daarom van invloed op de microbiële waterkwaliteit. Voor de ziekteverwekkers voor de planten is niet bekend of deze zich in de waterfase of in de biofilm bevinden. Sommige humaanpathogene micro-organismen (bacteriën en schimmels) zijn bijvoorbeeld heel goed in staat om zich in de biofilms van waterige milieus te vermeerderen en de verwachting is dat dit ook voor sommige plantpathogene micro-organismen zal gelden. Het is echter belangrijk om dit vast te stellen, om zo het gedrag van deze ziekteverwekkers beter te kunnen bepalen tijdens reguliere teeltcondities en verslechterde microbiële condities. Dat zijn juist condities waar opportunistische bacteriën gemakkelijk kunnen vermeerderen en dus toeslaan in een teelt.

Door middel van NGS kan op detailniveau inzicht worden verkregen in de bacteriële veranderingen in het water, in de biofilm op de wortel, en in de biofilm op de wand van een systeem of ontstaan in een biofilm monitor. Dit geeft tezamen met de andere microbiologische methoden, zoals de bepaling van de groeipotentie van het water een goed beeld van de microbiologische toestand van het water op verschillende tijdstippen. Zeker bij veranderingen (zoals snelle groei bij een overschot aan organische verbindingen), kan NGS informatie geven over welke bacteriesoorten onder deze condities het beste groeien. Dit zijn ook in potentie de bacteriesoorten die kunnen dienen om te waarschuwen voor verslechterde

microbiologische kwaliteit van het (giet, bassin) water, en kunnen daarom dienen als marker voor een verslechterende waterkwaliteit.

4.6 Impact van desinfectiemiddelen op de microbiologie bij teelt op water en substraat.

Het bestuderen van het effect van het gebruik van desinfectiemiddelen zoals chloor of peroxide is niet het directe onderwerp van deze studie, maar omdat bij de teelt op substraat permanent chloor wordt gedoseerd, kunnen de gegevens van deze studie toch bijdragen aan inzichten als gevolg van het gebruik van permanente desinfectie tijdens de teelt. Vanuit gebruik van desinfectiemiddelen in drinkwater is bekend dat deze middelen een groot deel van de micro-organismen kunnen afdoden, maar niet alle micro-organismen zijn gevoelig voor desinfectiemiddelen. Er zijn ook juist micro-organismen die wel kunnen overleven onder deze condities, en deze kunnen, vanwege minder concurrentie van andere micro-organismen, zich daardoor beter vermeerderen dan wanneer er geen desinfectiemiddel aanwezig is. Daarnaast dringt chloor of peroxide minder goed door in biofilms, waardoor micro-organismen in biofilms over het algemeen beter beschermd zijn tegen het desinfectiemiddel. Onderzoek aan drinkwater heeft laten zien dat drinkwater wat is blootgesteld aan chloor een andere bacteriepopulatie bevat dan drinkwater wat niet is gedesinfecteerd. Tijdens het doseren en het verblijf van water met chloor in de steenwolmat met daarin planten nemen de aantallen bacteriën toe, en hoewel er in deze studie geen vergelijk is gemaakt met een steenwolmat waaraan water zonder chloor is gedoseerd, is de verwachting dat het aantal bacteriën niet veel zal afwijken van een situatie zonder chloor. Wel zullen, afhankelijk van de chloordosering de bacteriesoorten anders zijn in een situatie waar chloor wordt gedoseerd. Deze bacteriesoorten zullen de processen overnemen die normaalgesproken door andere soorten worden uitgevoerd.

Het gebruik van een desinfectiemiddel heeft een aantal bijeffecten. Desinfectiemiddelen zijn sterk oxiderende stoffen, en deze reageren met organische verbindingen in het water, en kunnen grotere moleculen in kleinere stukken breken. Hierdoor kunnen complexe organische verbindingen die lastig door bacteriën zijn te gebruiken als voedingsbron, door oxidatie juist afbreken in kleinere organische verbindingen die door bacteriën gemakkelijk kunnen worden gebruikt voor groei. Door gebruik van oxiderende stoffen neemt de hoeveelheid voor bacteriën beschikbare "voeding" toe, en het gebruik van oxiderende stoffen kan in dat geval een snelle groei laten zien van bacteriën op plaatsen in het systeem waar het desinfectant niet (meer) aanwezig is (bijv al is weg gereageerd). Een tweede bijeffect is dat de bacterie populatie in een systeem met permanente desinfectie fundamenteel anders zal zijn dan een populatie in een systeem zonder desinfectie. Indien zich onder de conditie van permanente desinfectie een micro-organisme kan ontwikkelen dat ziekteverwekkend is voor de plant, dan wordt de groei van dit micro-organisme niet gestopt door de aanwezigheid van een desinfectiemiddel. Dit micro-organisme kan daardoor niet bestreden worden door het toepassen van een desinfectiemiddel, waardoor beheersmaatregelen om dergelijke micro-organismen af te doden beperkt worden. Door te telen onder permanente desinfectie valt mogelijkheid weg om bij problemen te kunnen ingrijpen door middel van het toevoegen van een desinfectiemiddel. Dit is een serieus scenario voor de toekomst bij permanente desinfectie bij teelt op water en substraat. Als laatste heeft het gebruik van permanente desinfectie soms nadelige gevolgen voor de kwaliteit van de teelt, omdat restproducten van het desinfectiemiddel zich kunnen ophopen in het product (paprika, tomaat).

4.7 Markers voor kwaliteitsverslechtering van de microbiologische waterkwaliteit.

Het vaststellen van de microbiologische waterkwaliteit wordt op dit moment niet gedaan omdat onduidelijk is of er een microbiologische indicator is die de kwaliteit van het water

kan voorspellen, zodat kan worden ingegrepen voordat de waterkwaliteit dusdanig is verslechterd dat daarmee ziekteverwekkende micro-organismen een kans krijgen. De resultaten van dit onderzoek propageren een structurele monitoringsaanpak waarbij de inzichten in de verschillende gemeten parameters stap voor stap bijdragen aan een beter begrip van de microbiële waterkwaliteit. Het huidige onderzoek laat zien dat de groeipotentie van het water voor micro-organismen sterk kan fluctueren, waardoor micro-organismen mogelijk onder bepaalde condities zeer snel kunnen groeien. Dergelijke snelle groei kan resulteren in kwaliteitsverlies bijvoorbeeld door ontstaan van anaerobe condities of opkomst van ziekteverwekkende micro-organismen, waardoor de teelt overgaat van een stabiele naar een labiele situatie. Om microbiologische indicatoren te kunnen vinden die waarschuwen voor deze overgang naar slechte teeltomstandigheden is het noodzakelijk om juist vlak voor de overgang van een stabiele teelt naar een labiele teeltsituatie monsters te nemen, en te analyseren op de microbiologische parameters die ook in deze studie zijn bepaald. Omdat dit onder praktijkcondities vaak niet voorkomt, omdat een teler uiteraard een teelt niet kan laten mislukken, zou het voor het onderzoek naar verslechterende waterkwaliteit en de impact daarvan op de teelt belangrijk zijn om het monitoringsprogramma uit te voeren onder gecontroleerde condities waarbij de condities zo worden aangepast dat de planten ziek zullen worden. Door voorafgaand aan het ziek worden van de planten te monitoren op een aantal chemische en microbiologische parameters (organische stof, temperatuur, zuurstof, pH, ATP en groeipotentie) kunnen parameters voorafgaand aan een verslechterende waterkwaliteit worden opgespoord. Een eventueel vervolg zal daarom moeten plaatsvinden op een proefstation, of op kleine schaal bij een teler, waar de mogelijkheid bestaat een teelt ziek te laten worden. Het monitoringsprogramma binnen dit onderzoek had als doel om veranderingen in de teelt gedurende een seizoen te bepalen, en met een kleinschalige teelt kan in een veel kleiner tijdsbestek rondom het ziek worden van een teelt de exacte relatie tussen microbiologische samenstelling van het water en de biofilm, het gedrag van de ziekteverwekkers, en de respons van de teelt aan elkaar worden gekoppeld. Dit zal in meer detail aanknopingspunten geven over veranderingen in microbiologische waterkwaliteit tijdens de teelt op water en substraat.

5 Conclusie en aanbevelingen

Dit project heeft als doel om microbiologische problemen bij teelt op water en substraat beter in kaart te brengen, te zoeken naar achterliggende oorzaken, en van daaruit op een gestructureerde wijze te zoeken naar oplossingen voor een verslechterende waterkwaliteit. Deze oplossingen moeten daadwerkelijk kunnen worden geïmplementeerd in de sector bij teelt op substraat en water. Hiertoe is gekozen voor het inzetten van microbiologische technieken die in de drinkwaterwereld gemeengoed zijn om nagroei te voorspellen, maar nog niet bij het monitoren van de waterkwaliteit in de kas. De verwachting is dat deze methoden nieuwe inzichten kunnen geven over de microbiologische waterkwaliteit. Daarnaast is gebruik gemaakt van de nieuwste moleculaire biologische technieken, zoals Next Generation Sequencing, om meer inzicht te krijgen in het gedrag van de micro-organismen.

5.1 Conclusie's

- Gedurende het seizoen neemt de concentratie aan oplosbare organische verbindingen in het circulerende water toe. Dit zijn verbindingen waar heel veel micro-organismen goed op kunnen groeien, en daarmee een belangrijke parameter in de monitoring.
- De toename is waarschijnlijk het gevolg van de secretie van deze verbindingen door plantenwortels tijdens fotosynthese. Bij teelt op water komen deze verbindingen direct in het water, terwijl bij teelt op substraat een deel van deze verbinding door micro-organismen in de substraatmat wordt gebruikt.
- Bij teelt op water zijn deze organische verbindingen gemakkelijk afbreekbaar, dat wil zeggen direct voor de micro-organismen te gebruiken als energiebron.
- Doordat deze verbindingen gemakkelijk afbreekbaar zijn, kunnen ze vermoedelijk een belangrijke oorzaak zijn voor microbiologische problemen bij teelt op water.
- Behalve de parameter TOC laten de overige chemische parameters geen duidelijke veranderingen zien tijdens het seizoen, en blijven nagenoeg allemaal het gehele seizoen stabiel.
- De schimmeldruk neemt toe aan het eind van het seizoen bij zowel de teelt op water als op substraat, waarbij bij de teelt op water schimmels die behoren tot het genus *Pythium* het meest worden gevonden, terwijl bij teelt op substraat schimmels die behoren tot *Fusarium* en *Pythium*, het vaakst worden aangetroffen. Dit was (nog) niet zichtbaar in de teelt. Verder worden schimmels meer aangetroffen in de biofilm van een systeem.
- De CBM (continu biofouling monitor) kan worden ingezet om de biofilmvormings-snelheid van het water vast te stellen. Wellicht kan de CBM ook worden ingezet om het gedrag van specifieke plantpathogenen in de biofilm te onderzoeken.
- De biofilm die zich heeft gevormd in het watersysteem van een kas bestaat voor een groot gedeelte uit andere bacteriën dan de bacteriën die worden aangetroffen in de waterfase.

5.2 Aanbevelingen

Dit onderzoek heeft nieuwe inzichten opgeleverd die direct kunnen worden ingezet om de microbiologische kwaliteit van het gietwater in de kas te monitoren.

Aanbevelingen zijn:

- Bepaal de productie en hoeveelheid organische stof door de planten bij teelt op water en substraat
- Bepaal de invloed van de hoeveelheid organische stof op de groei van de normale micro-organismen en op de groei van ziekteverwekkers in een teelt.
- Bepaal de invloed van hoge temperatuur, bijvoorbeeld 30°C, op het water met een grote hoeveelheid organische stof en een hoge groeipotentie op de groei van micro-organismen. Bepaal dan tevens het effect van de snelle groei van micro-organismen op de zuurstofconcentratie in het water.
- Zet op kleine schaal een teelt op water op, waarbij de omstandigheden zo worden gekozen dat het gewas ziek kan worden. Bemonster dan vlak voor en tijdens het ziek worden van de planten het water, de biofilm van het systeem en de biofilm van de wortels, en onderzoek deze met de in deze studie geïntroduceerde microbiologische parameters en met NGS om op detailniveau verschuivingen te kunnen zien van de bacteriepopulaties en ziekteverwekkers.
- Onderzoek onder bovenstaande condities of (opportunistische) plantpathogenen zich bevinden in het water of in de biofilm, en onderzoek of en waar deze zich in het systeem kunnen vermeerderen.
- Omdat de bacteriepopulatie in de biofilm enorm verschilt van de bacteriepopulatie in water is het cruciaal om zowel de biofilm als het water te onderzoeken bij het bepalen van het gedrag van ziekteverwekkers en de microbiologische waterkwaliteit van bassinwater/gietwater of ander water in de kas.

5.2.1 Suggesties voor concreet verder onderzoek

Dit onderzoek heeft als doel een structurele aanpak om microbiologische waterkwaliteitsproblemen in de praktijk te voorkomen. Microbiologische waterkwaliteitsproblemen zijn echter complex, en daarom is dit project een start van een gestructureerde aanpak, waarbij op basis van nieuwe inzichten vervolgstappen worden voorgesteld. Het doel is niet het onderzoek, maar een duidelijk handelingsperspectief voor de sector om de waterkwaliteitsproblemen snel en op tijd vast te kunnen stellen, en tevens robuuste strategieën te ontwikkelen voorafgaand aan problemen al op te kunnen treden. Dit eerste onderzoek, gepresenteerd in dit rapport, heeft een duidelijke relatie laten zien tussen de aanwezigheid van organische verbindingen en groeicondities voor bacteriën, en deze zullen verder moeten worden onderzocht om deze kennis daadwerkelijk om te zetten naar methoden voor het snel bepalen van de microbiologische waterkwaliteit en een daaropvolgende strategie om microbiologische problemen te voorkomen of, als ze zijn opgetreden, te behandelen. Hieronder volgen een aantal suggesties om met de kennis van het huidige onderzoek vervolgstappen te kunnen zetten om een aantal op dit moment concrete problemen rondom microbiologische waterkwaliteit gericht aan te kunnen pakken.

1. De kwaliteitsthermometer voor water in de kas.

Dit onderzoek heeft een duidelijke indicatie gegeven voor factoren die van belang zijn bij de microbiologische waterkwaliteit in een kas. Er is echter gedurende een geheel seizoen

gemeten, met grote tijdsintervallen, waardoor relatief grove verschuivingen van microbiologische parameters worden bepaald. Om beter te begrijpen wat zich microbiologisch afspeelt voordat de planten ziek worden, wordt in dit projectidee een teelt gemonitord die ziek wordt, en worden voordat de planten ziek worden met kleine tijdsintervallen monsters genomen van alle in deze studie ontwikkelde microbiologische parameters. Daarmee worden op detail niveau microbiologische veranderingen vastgesteld, welke kunnen worden gerelateerd aan een verslechterende microbiologische waterkwaliteit. Deze zijn dan indicatief voor een verslechterende kwaliteit, en geven de mogelijkheid om snel en voordat de planten ziekteverschijnselen vertonen corrigerende maatregelen te nemen.

2. Terug naar een teelt zonder permanente desinfectie.

Een groot deel van de telers van oa paprika, tomaat en meer gewassen is, om de teelt gedurende een groeiseizoen gezond te houden, afhankelijk van de permanente toediening van een desinfectiemiddel, zoals chloor. Opvallend is dat vaak jarenlang is geteeld zonder permanente desinfectie. Echter na het inzetten van permanente desinfectie is het risico om weer de stap te maken naar een teelt zonder desinfectie (te) groot, vanwege terugkeer van ziektes. Permanente desinfectie is ongewenst, want restproduct van het desinfectiemiddel wordt teruggevonden in het product. Daarnaast is dit niet duurzaam, en is er geen "laatste redmiddel" meer voor het geval dat ziekteverwekkers zich aanpassen aan condities onder permanente desinfectie. Mocht dit gebeuren, dan is er geen mogelijkheid meer om de ziekteverwekker met oxiderende desinfectie middelen te bestrijden.

Het al in dit project uitgevoerde monitoringsprogramma geeft inzicht in de belangrijkste gegevens en bacteriepopulaties bij een goedlopende teelt, echter met desinfectie. We willen een gelijke monitoring uitvoeren bij een teelt zonder desinfectie (bij voorkeur bij een paprikateler die teelt zonder desinfectie, of proeftuin of WUR). De populatie van micro-organismen die in het watersysteem van deze gezonde teelt aanwezig is, wordt ingezet als ent bij telers die nu nog desinfectie gebruiken. Door het introduceren van een grote diversiteit aan goede micro-organismen, wordt verwacht dat ziekteverwekkende micro-organismen geen of weinig kans maken om te groeien en de teelt ziek te maken. Het doel is om bij deze telers dan geen permanente desinfectie meer toe te passen. Dit zal op kleine schaal moeten worden geïntroduceerd, maar biedt op termijn de inzichten en mogelijkheden om weer te telen zonder permanente desinfectie. Daarnaast wordt het risico dat ziekteverwekkende micro-organismen zich kunnen aanpassen aan condities onder chloor (en dus niet behandelbaar worden) veel kleiner. Dit is een serieus risico en van groot belang om bij stil te staan voor substraat/water teelt. Mocht het nodig zijn, dan kan chloor of waterstofperoxide nog steeds gebruikt worden als incidenteel desinfectiemiddel, waartegen nog geen resistentie is opgetreden.

3. Aanpak Crazy Roots

De ziekte Crazy Roots is bij de tomatenteelt een hardnekkig probleem, veroorzaakt door de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*. Onder bepaalde condities kan Crazy Roots een (substantieel) deel van de teelt aantasten, met negatieve gevolgen voor smaak, opbrengst en resulterend in meer arbeid (kosten) voor de teler. Vermoedelijk is het gedrag en effect van de bacterie die Crazy Roots veroorzaakt direct gerelateerd aan de waterkwaliteit. Het plaatsen van een Triton (een systeem dat vermoedelijk zorgdraagt voor een stabiele en goede microbiologische basissamenstelling) geeft volgens de tomatentelers een tijdelijke vermindering van Crazy Roots. De exacte werking van een Triton of soortgelijke systemen is

onbekend, maar strookt wel met de huidige hypothese dat voor een robuuste teelt “goede micro-organismen” noodzakelijk zijn in plaats van een zo steriel mogelijke omgeving.

Voorgesteld wordt het eerder geteste monitoringsprogramma uit te voeren bij een tomatenteelt met Crazy roots, waarbij de bacteriepopulatie en het gedrag van *Agrobacterium rhizogenes* worden gekarakteriseerd in het water, en juist ook de biofilm van het bassin en de wortels. Dit wordt gekoppeld aan andere belangrijke teeltparameters zoals zuurstof, pH, temperatuur en TOC (organisch koolstof gehalte). Omdat een systeem als een Triton een positief effect lijkt te hebben gedurende een bepaalde tijd, wordt geprobeerd om een leverancier van een dergelijk systeem bij het project te betrekken. In dat geval kan ook het in en uitgaande water van dit systeem worden meegenomen in het meetprogramma. Echter ook zonder de deelname van een Triton systeem is de verwachting dat het onderzoek inzicht geeft over het gedrag van bacteriepopulaties en *Agrobacterium rhizogenes* in combinatie met teeltcondities. Deze inzichten zullen worden gebruikt voor waterbehandelings strategieën die direct kunnen worden geïmplementeerd in de huidige teelt.

