

KWR 2018.007 | Februari 2018

# Microbieel gezond water in de glastuinbouw

Vergelijking van de nulmeting bij Phalaenopsis  
met onderzoek 2016 teelt van sla en paprika



## Microbieel gezond water in de glastuinbouw

Vergelijking van de nulmeting bij Phalaenopsis met onderzoek 2016 teelt van sla en paprika

KWR 2018.007 | Februari 2018

### Opdrachtnummer

402240

### Projectmanager

Luc Palmen

### Opdrachtgever

LTO Glaskracht

### Auteur(s)

Luc Hornstra

### Verzonden aan

Margreet Schoenmakers

Jaar van publicatie  
2018

### Meer informatie

Dr. Luc Hornstra  
T 0306069628  
E luc.hornstra@kwrwater.nl

Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E info@kwrwater.nl  
I www.kwrwater.nl



KWR | Februari 2018 © KWR

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

# Samenvatting

Teelt op water of substraat is vaak succesvol, maar kampt soms met hardnekkige problemen die kunnen worden gerelateerd aan de microbiologische waterkwaliteit. Het handhaven van een goede microbiologische waterkwaliteit bij teelt op water of substraat is lastig, omdat niet bekend is hoe en met welke parameters dit kan worden vastgesteld. Bij een verslechtering van de microbiologische waterkwaliteit wordt geprobeerd door middel van desinfectie de waterkwaliteit gezond te houden.

Eerder onderzoek bij sla op water en paprika op substraat heeft laten zien dat de hoeveelheid organische stof in een systeem enorm kan fluctueren. Omdat organische stof voor bacteriën de belangrijkste voedingsbron is, is dit hiermee ook een belangrijke sleutel naar een goede waterkwaliteit. Het onderzoek bij de sla en paprika teelt heeft laten zien dat met microbiologische meetmethoden vanuit de drinkwaterwereld een teeltsysteem goed microbiologisch kan worden gekarakteriseerd. Een volgende stap is om te bepalen welke bacteriesoorten in een teeltsysteem juist gewenst zijn, en welke soorten verantwoordelijk zijn voor microbiële problemen.

Het nieuwe onderzoek focust zich op de teelt van Phalaenopsis, tomaat en gerbera, en zal daar zoeken naar de link tussen teeltcondities en dus de gezondheid van het gewas, en de microbiologische populaties die daar bij horen. Daarnaast wordt geprobeerd om de microbiologische populaties te beïnvloeden naar een populatie die hoort bij een robuust teeltsysteem, door middel van het verwijderen/toevoegen of veranderen van de organische stof verbindingen in het water.

Deze eerste rapportage heeft als doel om de resultaten van een 1<sup>e</sup> nulmeting bij de teelt van Phalaenopsis te vergelijken met de bevindingen van de eerdere studies naar teelt van sla en paprika. De nulmeting wijst uit dat de microbiologische parameters, en vooral de invloed van organische stof op de microbiologische waterkwaliteit, ook bij Phalaenopsis en naar verwachting ook bij tomaat en Gerbera, een belangrijke rol spelen. Het gebruik van Next Generation Sequencing zal het in kaart brengen van de verschillende bacteriesoorten onder verschillende groeiomstandigheden mogelijk maken. Op basis van de nulmeting wordt geadviseerd deze ook uit te voeren bij tomaat en gerbera. Verder wordt geadviseerd om het onderzoek naar de relatie tussen specifieke organische stofcondities en bacteriesamenstelling uit te voeren onder gecontroleerde (lab)condities, maar daarnaast metingen te verrichten bij telers in de praktijk, om seizoen variatie in een systeem vast te stellen. Zeker op het moment dat specifieke ziekteverwekkers de kop op steken, wordt een additionele bemonstering geadviseerd. Met deze kennis kan het project in de beginfase zo worden vormgegeven dat de resultaten zoveel mogelijk aansluiten bij eerder onderzoek naar microbiologische waterkwaliteit. Daarmee zijn de resultaten naar verwachting breder inzetbaar dan uitsluitend bij de gewassen die meedoen aan het onderzoek, en daardoor belangrijk voor de glastuinbouw als sector.

# Inhoud

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>4</b>
1.1	Microbiologische waterkwaliteit in de glastuinbouw	4
1.2	De huidige stand van zaken	5
<b>2</b>	<b>Vergelijk van resultaten 2016 met 2018 nulmeting.</b>	<b>7</b>
2.1	Korte conclusies uit het onderzoek bij paprika en sla.	7
2.2	Vergelijk van de teeltsystemen, en monsternamenpunten.	8
2.3	Organische stof gehalten:	8
2.4	Kiemgetal en ATP:	9
2.5	Ziekteverwekkers	10
2.6	Karakterisatie van bacteriepopulaties door middel van Next Generation Sequencing	11
2.7	Overige partners in het meetprogramma.	14
<b>3</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>16</b>
3.1	Conclusies	16
3.2	Aanbevelingen	16
<b>4</b>	<b>Referenties</b>	<b>17</b>

# 1 Inleiding

## 1.1 Microbiologische waterkwaliteit in de glastuinbouw

Teelt op water of substraat wordt in toenemende mate toegepast bij teelt van groente en siergewassen, mede omdat emissie in deze systemen gemakkelijker is te beperken. Het is vaak succesvol, maar kampt soms met hardnekkige problemen die kunnen worden gerelateerd aan de microbiologische waterkwaliteit. Steeds vaker worden reinigingsmiddelen ingezet om de leidingen te reinigen en te ontdoen van de biofilm in de leidingen. Ook het proceswater wordt met regelmaat behandeld. Dit kan effect hebben op de microbiologische waterkwaliteit in een teeltsysteem. Deze effecten kunnen positief, maar ook negatief uitpakken. Steeds duidelijk wordt dat er relaties zijn tussen microbiologische waterkwaliteit, het optreden van ziekten en de gezondheid van een gewas.

Een bekend voorbeeld is de ziekte Crazy Roots, veroorzaakt door de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*, die bij onder andere de tomaten,- en aubergine teelt een groot probleem is. Ook Fusarium is een bekend probleem bij veel teelten zoals o.a. bij potorchidee en Gerbera. Ook bij andere gewassen komen bij teelt op water en substraat problemen voor, maar niet altijd is bekend welke bacterie of schimmel aan de problemen ten grondslag ligt. Van de meeste ziekteverwekkers is niet bekend onder welke condities ze zich kunnen handhaven, en of ze zich in een systeem kunnen vermeerderen. Mocht vermeerdering plaatsvinden, dan is vaak niet duidelijk waar dat gebeurt (bijvoorbeeld in het water of in de biofilm in het systeem, of biofilm op de wortels van de plant). Verder wordt vaak geconstateerd dat er specifieke perioden in de teelt zijn gedurende een seizoen, waarin het gewas meer vatbaar is voor een ziekteverwekker. Er is dan blijkbaar iets in het systeem veranderd waardoor de planten vatbaarder zijn, of juist de ziekteverwekker zich heeft kunnen vermeerderen.

Recent onderzoek heeft laten zien dat de microbiologische waterkwaliteit van het water in een teeltsysteem niet het gehele jaar gelijk is. Juist microbiologische parameters zijn aan verandering onderhevig, maar dit wordt niet waargenomen omdat deze parameters in reguliere meetprogramma's niet worden bepaald. Hoewel veranderingen in de microbiologische waterkwaliteit een cruciale impact kunnen hebben op de teelt, worden deze veranderingen in waterkwaliteit niet opgemerkt. Daardoor kan de relatie tussen microbiologische waterkwaliteit en de gezondheid van een gewas niet worden gemaakt.

Veel telers realiseren zich dat de waterkwaliteit gedurende een seizoen aan veranderingen onderhevig is, en hiermee direct van invloed is op de gezondheid van het gewas. Kennis om het water microbiologisch te onderzoeken op kwaliteitsparameters is echter niet aanwezig. Deze kennis zal structureel moeten worden opgebouwd om te identificeren hoe de microbiologische waterkwaliteit kan worden vastgesteld, en bij voorkeur kan worden gestuurd naar de kwaliteit die nodig is voor een stabiele en robuuste teelt gedurende de gehele teeltperiode. Dit waarborgt een duurzame teelt met zo weinig mogelijk gewasbeschermingsmiddelen.

## 1.2 De huidige stand van zaken

### 1.2.1 Het onderzoek in 2016

Een eerste aanzet tot een structurele aanpak van microbiologische waterkwaliteitsproblemen in de glastuinbouw is gestart in 2016. Bij twee teeltbedrijven is de microbiologische waterkwaliteit bepaald gedurende een teeltseizoen. Om de microbiologische waterkwaliteit te bepalen is voor het eerst gebruik gemaakt van microbiologische technieken die zijn ontwikkeld om de microbiologische waterkwaliteit van drinkwater vast te stellen.

De twee deelnemende bedrijven teelden sla op water en paprika op substraat, en een zeer uitgebreid monitoringsprogramma is uitgevoerd om chemische en microbiologische veranderingen tijdens de teelt gedurende het seizoen vast te leggen. Tijdens deze monitoring is met voor de tuinbouwsector nieuwe microbiologische technieken gekeken naar het gedrag van bacteriën, niet alleen in het water maar juist ook in de biofilm van het teeltsysteem en in de biofilm op de wortels van de planten. Uit dit onderzoek bleek dat zowel het water als de biofilm in een systeem belangrijk zijn. Beide omgevingen zijn een verschillend reservoir voor bacteriën, wat betekent dat de bacteriën in de biofilms in een systeem enorm verschillen van de bacteriën in het water. Ook zijn sommige ziekteverwekkers in het water te vinden, terwijl andere ziekteverwekkers zich bij voorkeur ophouden in de biofilm. Daarnaast blijkt het gehalte aan organische verbindingen in het water zeer belangrijk te zijn voor de microbiologische waterkwaliteit. Dit is namelijk direct gerelateerd aan de hoeveelheid bacteriën in een systeem.

### 1.2.2 Nieuw onderzoek in 2018-2019

In januari 2018 is een nieuw onderzoek gestart, waarin voortbouwend op de inzichten van het eerdere onderzoek, wederom de microbiologische waterkwaliteit zal worden onderzocht. Hiervoor is een consortium gevormd met LTO-Glaskracht, telers en telersverenigingen, WaterIQ (leverancier van een waterbehandelingssysteem) en Groen Agro Control, Stichting Control Food en Flowers (SCFF) en KWR als kennisinstituten. Tijdens dit onderzoek zal worden bepaald wat een goede microbiologische soortenpopulatie is in een systeem, en zal tevens worden geprobeerd om door middel van het afbreken of toedienen van specifieke organische stof fracties de bacteriepopulatie in een systeem zo te beïnvloeden dat het teeltsysteem meer robuust wordt, waardoor ziekteverwekkers minder kans hebben om zich in een teeltsysteem te handhaven of uit te groeien. Dit onderzoek zal worden uitgevoerd bij Phalaenopsis (potorchidee), tomaat en Gerbera.

Bij de Phalaenopsis teelt bij OK Plant wordt drainwater vanuit de kas verzameld in een kelder, van waaruit het water weer wordt hergebruikt. Voor hergebruik worden nutriënten toegevoegd, en water vanuit een andere bron bijgemengd (regenwater), waarna het water weer naar de planten gaat. In het hele systeem wordt een lage dosis peroxide gehandhaafd. Het water van de drinkkelder wordt voordat het wordt hergebruikt, eerst behandeld door middel van de Opticlear Diamond, een waterbehandelingssysteem van WaterIQ. Het systeem bestaat uit een membraan, waarmee specifieke organische fracties worden verwijderd. Daarnaast vindt een ozonbehandeling plaats ter desinfectie, en om organische verbindingen om te zetten.

Het watersysteem is in basis gelijk aan het systeem bij de paprika teelt, echter bij de paprikateelt was geen Opticlear Diamond in het systeem opgenomen. Verder bestond de desinfectiestap bij de paprikateler uit de additie van chloor. Bij de slateelt werd geen desinfectie toegepast.

Dit rapport heeft tot doel om de bevindingen informatie van het onderzoek, gedaan in 2016 bij de sla en paprikateelt te koppelen aan de resultaten van de 1<sup>e</sup> meting bij Phalaenopsis teler OK plant. Deze eerste meting is uitgevoerd op 14 december 2017. De monsters zijn genomen en geanalyseerd door GAC, SCFF en KWR. Later wordt ook de informatie vanuit de tomaat en gerbera teelt toegevoegd aan het onderzoek. De reden voor deze brede aanpak is dat de resultaten naast teeltspecifiek waarschijnlijk ook meer generieke informatie bevatten (parameters die een beeld geven van de microbiologische waterkwaliteit) die bij alle teelten kunnen worden toegepast. Daarmee komen de resultaten niet alleen ten goede aan de bedrijven en teelten die meedoen aan het onderzoek, maar wordt er nadrukkelijk naar gestreefd de resultaten sectorbreed te kunnen toepassen. Het is daarom in het belang van de gehele sector dat de microbiologische waterkwaliteit door middel van meetbare parameters kan worden bepaald, en er gericht kan worden gestuurd op een goede microbiologische waterkwaliteit, waarbij desinfectie en gebruik van gewasbeschermingsmiddelen zoveel mogelijk kan worden vermeden.

De resultaten die in dit rapport zijn gepresenteerd moeten in het licht worden gezien van het totale onderzoek "Microbieel gezond water in de glastuinbouw", dat op 01-01-2018 is gestart. Dit deelrapport heeft tot doel de eerste inzichten te delen. Het is niet uit te sluiten dat met het genereren van kennis in het project de resultaten van de nulmeting en het vergelijk met eerder onderzoek, zoals die in dit rapport zijn gepresenteerd, anders zal worden geïnterpreteerd. De definitieve resultaten van het project zullen worden gedeeld in een definitieve kwaliteitsgeborgde rapportage aan het eind van het project.



## 2 Vergelijk van resultaten 2016 met 2018 nulmeting.

### 2.1 Korte conclusies uit het onderzoek bij paprika en sla.

Om een goed vergelijk te kunnen maken tussen de eerdere studie naar de microbiologische waterkwaliteit bij paprika en sla, en de recent gestarte studie bij potorchidee, worden hieronder de conclusies uit het eerder onderzoek weergegeven (uit Hornstra, 2017: KWR rapportage KWR2017.013).

- 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 (totaal organisch carbon/koolstof) 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 ander bacteriën dan de bacteriën die worden aangetroffen in de waterfase.

Omdat uit het onderzoek blijkt dat de chemische parameters gedurende een seizoen geen verschillen laten zien, worden deze in de komende studie minder frequent bepaald. De nadruk van het meetprogramma zal komen te liggen op de concentratie organische stof in het systeem, en welke bacteriën daar bij horen. Daarnaast zal Groen Agro Control technieken inzetten om de organische stof (dit is een verzamelnaam voor meer dan 200 door de plant uitgescheiden organische verbindingen) verder te karakteriseren in bepaalde fracties.

## 2.2 Vergelijk van de teeltsystemen, en monsternamepunten.

In 2016 is bij een slateelt op water en een paprikateelt op substraat gemeten.

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 ververst, 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

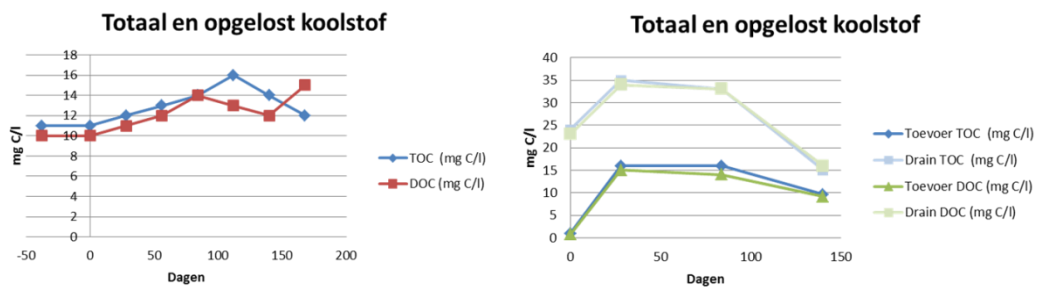
2. Het Wilgenbos, Bleiswijk. Het Wilgenbos teelt paprika op steenwol. Water met nutriënten en een desinfectant (chloor) wordt aangevoerd en met druppelaars aan de steenwol toegevoegd. Overtollig water druppelt uit de steenwol en wordt opgevangen. Dit drainwater gaat retour en wordt opgeslagen. Na behandeling 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.

In 2018 wordt gemeten bij OK Plant, en bij een nog nader vast te stellen teler van tomaat en van gerbera.

OK Plant, Monster. Bij de Phalaenopsis teelt bij OK Plant wordt drainwater vanuit de planten verzameld in een kelder, van waaruit het water weer wordt hergebruikt. Voor hergebruik worden nutriënten toegevoegd, en water vanuit een andere bron bijgemengd (regenwater), waarna het water weer naar de planten gaat. In het hele systeem wordt een lage dosis peroxide gehandhaafd. Het water van de drainkelder wordt voordat het wordt hergebruikt, eerst behandeld door middel van de Opticlear Diamond, een waterbehandelingssysteem van WaterIQ. Het systeem bestaat uit een membraan, waarmee specifieke organische fracties worden verwijderd. Daarnaast vindt een ozonbehandeling plaats ter desinfectie, en om organische verbindingen om te zetten. Op 14 december heeft een nulmeting plaatsgevonden. De bemonsterde punten voor de nulmeting zijn vuil drainwater (voor opticlear diamond), behandeld water (na opticlear diamond) en schone (drain)water, is water wat na toevoeging van nutriënten en desinfectiemiddel (waterstofperoxide) weer naar de kas gaat voor het gieten van de planten.

## 2.3 Organische stof gehalten:

De resultaten uit het eerder onderzoek laten zien dat gedurende het seizoen het organische stof gehalte in het sla waterbassin toeneemt tot medio juli/augustus. Bij de paprikateelt is de hoeveelheid organische stof in het drainwater ongeveer 2 tot 2,5 keer zo hoog als in het toevoerwater. De planten scheiden dus veel organische stof verbindingen uit. De hoeveelheid organische stof die planten produceren hangt af van de mate van fotosynthese, die weer gekoppeld is aan de hoeveelheid licht. Bij de slateelt speelt dit een grote rol, want de piek van organische stof valt samen met lange dagen. Bij paprika en potorchidee zal dit ook een rol spelen, maar heeft de kunstmatige belichting vermoedelijk ook invloed op de organische stof productie.



Figuur 1. De organische stof productie bij de slateelt op water en paprikateelt op substraat.

Tabel 1: De gemeten hoeveelheid organische stof in het drainwater en het water naar de kas (schone drain) bij OK plant (metingen uitgevoerd door GAC en SCFF).

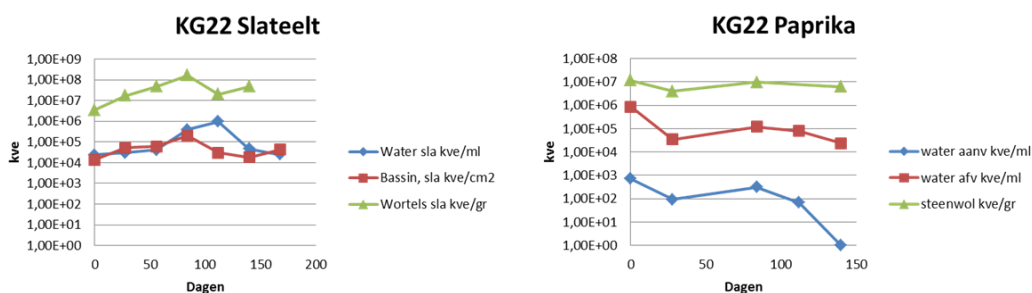
Totaal organische koolwaterstoffen	
Monster	Resultaat (mg/l)
Vuile drain 1	60
Vuile drain 2	60
Vuile drain 3	60
Schone drain 1	34
Schone drain 2	32
Schone drain 3	33

Vergelijking van de resultaten laat zien dat de organische stof gehalten bij OK plant hoog zijn in vergelijking met het eerdere onderzoek. In het schone water naar de kas is nog steeds een substantiële hoeveelheid C aanwezig, waardoor bacteriën hierin naar verwachting goed kunnen groeien. Door de Opticlear Diamond behandeling worden grotere organische moleculen verwijderd, maar er is ook water bijgemengd, waardoor niet bepaald kan worden of de OD een effect heeft op de hoeveelheid en samenstelling organische stof in het systeem.

#### 2.4 Kiemgetal en ATP:

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.

ATP is een maat voor de hoeveelheid microbiële activiteit in een monster. Bij een ATP bepaling wordt de hoeveelheid ATP per ml (water) of cm<sup>2</sup> (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.



Figuur 2: Het kiemgetal bij de slateelt op water en paprikateelt op substraat.

Tabel 2: De koloniegetallen voor bacteriën en schimmels in het vuile drainwater en in het water naar de kas bij OK plant (Metingen uitgevoerd door GAC, SCFF en KWR).

		Bacterien	Schimmels en gisten	
		Koloniegetal 22°C	koloniegetal	ATP
		kve/ml	kve/ml	pg/ml
OKplant, opweekkas	Voor OD	3,6E+04	4,9E+02	157
OKplant, opweekkas	Na OD	2,5E+04		143
OKplant, opweekkas	Naar kas	2,0E+03	1,8E+02	133

Figuur 2 laat zien dat in het bassin waar de slateelt op water plaatsvindt, het KG22 een stijgende lijn laat zien, die overeenkomt met de stijgende lijn van het organische stof gehalte. Bij de paprika teelt is het aantal KG22 bacteriën vooral hoog in het steenwol (in de nabijheid van de wortels van de plant). Omdat in dit systeem chloor wordt gebruikt is het aantal KG22 bacteriën in het ingaande water erg laag. Hetzelfde geldt voor het watersysteem bij OK plant waar peroxide als reinigingsmiddel wordt gedoseerd. Het water naar de kas bevat daarom erg weinig KG22 bacteriën. Opvallend is wel dat het aantal bacteriën in het drainwater ook erg laag is. Gezien de hoeveelheid organische stof van 60mg/L is dit alleen maar te verklaren als dit water ook een desinfectiemiddel (of residu) bevat.

## 2.5 Ziekteverwekkers

In het eerder project is een screen uitgevoerd op de meest voorkomende ziekteverwekkers. De destijds gescreende ziekteverwekkers is weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. De teelt van sla en van paprika is gescreend op de volgende ziekteverwekkers:

P1	Botrytis_cinerea
P2	Fusarium_oxysporum
P3	Fus_solani
P4	Phytophthora_spp
P5	Phytoph_cryptoqea
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	Stemphyllium_spp

Tabel 4: In het huidige project wordt daarom op de volgende ziekteverwekkers gescreend (door GAC en SCFF).

DNA analyse op plantpathogenen in schone drain			
	Schone drain 1	Schone drain 2	Schone drain 3
Phytophthora spp.	-	-	-
Pythium spp.	+/--	+/--	+/--
Fusarium oxysporum	+/--	+/--	+/--
Fusarium solani	+/--	+/--	-
Rhizoctonia solani	+/--	-	-
Pseudomonas cattleyae	-	-	-
Erwinia cypripedii	-	-	-
Erwinia chrysanthemi	-	-	-

Waarbij: Infectiedruk: - = nihil, +/-- = zeer zwak, +/- = zwak, + = middelmatig, ++ = Sterk

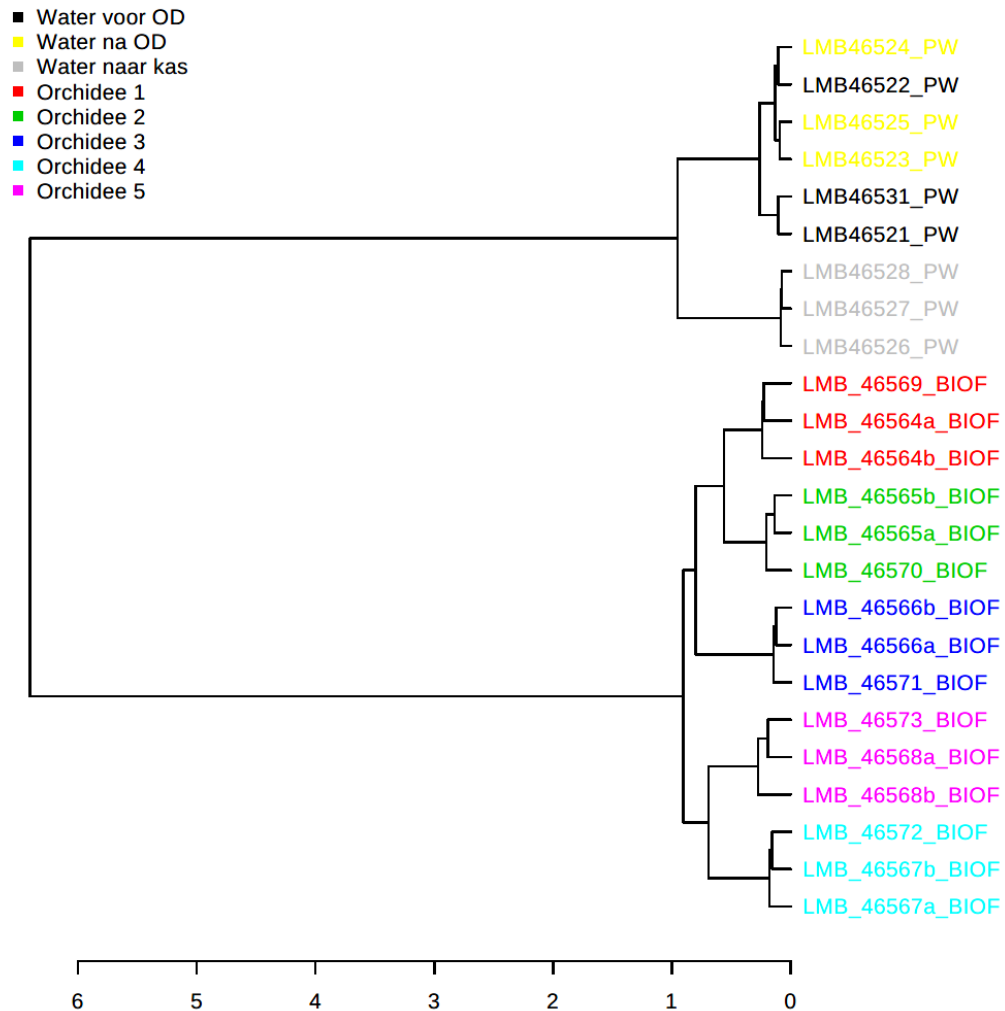
Bij de teelt van Phalaenopsis is met name Fusarium een belangrijke ziekteverwekker, en deze wordt in dit project gemonitord tezamen met Pythium en Phytophthora. Daarnaast zijn voor de Phalaenopsis teelt de bacteriesoorten Erwinia en Pseudomonas belangrijke ziekteverwekkers, en daarom zal hier ook op worden gescreend. Omdat uit het eerdere onderzoek is gebleken dat Fusarium en Pythium in hogere aantallen voorkomen in de biofilm dan in de waterfase, zal bij het huidige project naast het water wederom de biofilm worden onderzocht op de aanwezigheid van ziekteverwekkers. Deze monsters worden na de nulmeting toegevoegd. Op dit moment is de infectiedruk tijdens de nulmeting laag.

## 2.6 Karakterisatie van bacteriepopulaties door middel van Next Generation Sequencing

Het karakteriseren van bacteriepopulaties is een cruciaal onderdeel in het project omdat daarmee inzicht wordt verkregen welke bacteriesoorten aanwezig zijn, en onder welke

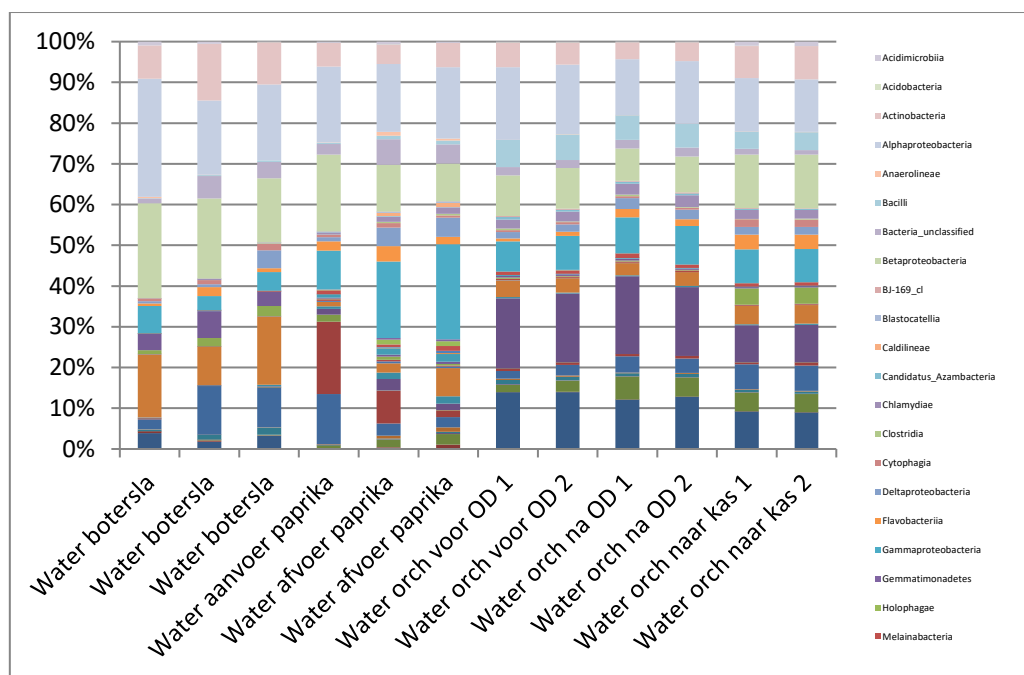
omstandigheden. In het project worden tijdens verschillende (groei)fasen de bacterie populaties gekarakteriseerd, waarbij de bacteriepopulatie zal worden gekoppeld aan de soorten en hoeveelheden organische stof, en de gewaseigenschappen op dat moment. Indien bijvoorbeeld teeltproblemen optreden, of de planten een minder goede “fitheid” vertonen, zal door een monsternamenanalyse van de bacteriesoorten geprobeerd worden op te helderen of bepaalde bacteriesoorten kunnen worden gekoppeld aan de verminderde fitheid van het gewas.

Tijdens de nulmeting is het vuile drainwater, het water na de OD waterbehandeling en het schone drainwater (water naar de kas) geanalyseerd door middel van NGS. Daarnaast zijn de bacteriepopulaties bepaald van de bacteriën die zich bevinden op de wortels van de orchidee. Hiervoor zijn 5 planten onderzocht. Alle analyses zijn in triplo uitgevoerd.



Figuur 3. Cluster analyse van de sequentie van de monsters vuile drain (voor OD), na waterbehandeling (na OD), water naar de kas, en van de biofilm van de wortels van Phalaenopsis.

Figuur 3 laat een cluster analyse zien van de NGS resultaten, waarmee monsters met elkaar kunnen worden vergeleken op genetische verwantschap. Hieruit blijkt dat de monsters voor (vuile drain) en na de OD waterbehandeling nagenoeg gelijk zijn. Het water naar de kas verschilt iets meer, maar heeft nog steeds een grote gelijkheid met de eerdere waterstromen. Het water naar de kas is echter drainwater na de OD behandeling aangevuld met nutriënten en bijgemengd met water uit een andere waterbron (regenwaterreservoir). Daarom zullen ook bacteriën uit dit water aanwezig zijn in het water naar de kas, en wijkt dit monster af van de monsters voor en na OD. De bacteriepopulaties die de biofilm vormen op de wortels van *Phalaenopsis* wijken sterk af van de populaties in het water. Opvallend is dat de bacteriepopulatie op elke orchidee voor een groot deel overeenkomt, maar toch een plantspecifieke bacteriepopulatie laat zien. Dit laat tevens zien dat met NGS minimale verschuivingen in bacteriepopulaties kunnen worden geïdentificeerd.

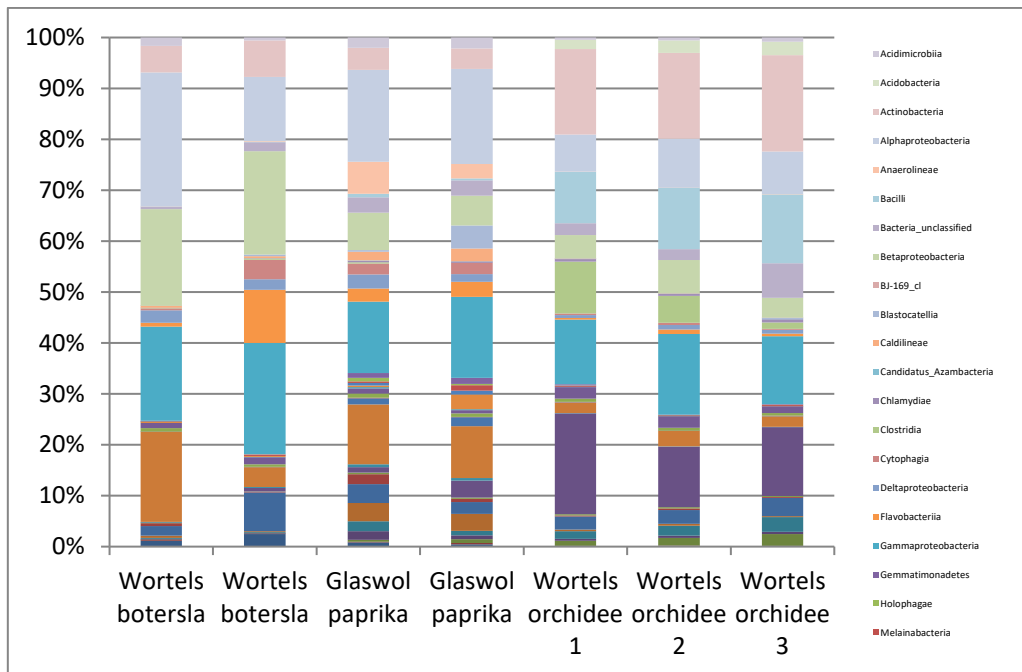


Figuur 4: De bacteriepopulaties op klasse niveau die worden gevonden in het water bij de teelt op botersla, het water bij de teelt van paprika op substraat en het water bij de teelt van *Phalaenopsis*.

Figuur 4 laat de bacteriepopulaties zien die zijn gevonden in het water bij de teelt op botersla, teelt van paprika en teelt van *Phalaenopsis*. De monsters bij de teelt op water zijn genomen op drie verschillende momenten, namelijk in mei, juli en september 2016. De monsters bij de paprika teelt zijn genomen in juli (aanvoer en drain) en in september (alleen drain). Verder bevat het aanvoerwater een desinfectiemiddel (chloor). De monsters bij de *Phalaenopsis* teelt zijn genomen in december 2017, en de nummers 1 en 2 zijn duplo monsters. OD staat voor het Opticlear Diamond waterbehandelingsysteem wat daar is geïnstalleerd. Ook bij de *Phalaenopsis* teelt is het water gedesinfecteerd (met peroxide).

De NGS analyse laat zien dat elke teelt een duidelijk eigen bacteriepopulatie heeft, en op basis daarvan ook te onderscheiden is. Echter het grootste gedeelte van de bacteriepopulatie komt voor bij alle teeltsystemen, maar in andere verhoudingen. Het is belangrijk om in alle

systemen juist verstoringen te meten in de “normale” bacteriepopulaties, die het gevolg zijn van verslechterende teeltomstandigheden. Door overlap te zoeken in bacteriële veranderingen als gevolg van deze verstoringen bij alle teeltsystemen worden bacteriesoorten zowel bij teeltspecifieke als breder voorkomende soorten geïdentificeerd, die dan kunnen worden gekoppeld aan verslechterende teeltomstandigheden.



Figuur 5: De bacteriepopulaties op klasse niveau die worden gevonden op de wortels van botersla, in het substraat bij de teelt van paprika en de op wortels van Phalaenopsis.

Figuur 5 laat de bacteriepopulaties zien die zijn gevonden op de wortels van botersla, in het substraat van paprika en op de wortels van Phalaenopsis. De monsters van de slawortels en de paprikasubstraat zijn genomen in mei en juli 2016. De monsters van de Phalaenopsis wortels zijn genomen in december 2017, en de nummers 1, 2 en 3 zijn verschillende planten.

Elke teelt heeft zijn eigen onderscheidende bacteriële populatie rondom de wortels, waardoor ze duidelijk van elkaar verschillen. Door middel van NGS zijn zeer kleine verschillen in de bacteriepopulatie rondom de wortels, als gevolg van bijvoorbeeld verslechterende waterkwaliteit, vast te stellen. Ook hier is het belangrijk, net als bij de bacteriepopulaties in water, om de verschillen vast te leggen die optreden in de bacteriepopulaties als gevolg van een verandering in waterkwaliteit.

## 2.7 Overige partners in het meetprogramma.

Nadat de nulmeting is uitgevoerd bij de Phalaenopsis teelt, zijn twee andere gewassen aangesloten bij het project. Dit zijn Gerbera en tomaat. Nulmetingen in deze systemen zullen de parameters die hierboven zijn beschreven ook voor deze systemen bepalen. Met name de hoeveelheid en samenstelling van de organische stof, en de bacteriepopulaties die worden gevonden zijn daar van belang. Deze zullen dan worden vergeleken met de resultaten van paprika, sla en Phalaenopsis. Hiermee worden de resultaten toepasbaar voor de teelten waar daadwerkelijk wordt gemeten, maar door het zoeken naar gemeenschappelijke kenmerken tussen de teelten onderling, is het waarschijnlijk dat ook



factoren kunnen worden geïdentificeerd die niet teeltspecifiek zijn, en ten goede komen aan het begrijpen van de waterkwaliteit voor de gehele sector. Op basis daarvan kan dan gericht worden geadviseerd welke microbiologische waterkwaliteit vereist is voor een robuuste teelt.

## 3 Conclusies en aanbevelingen

### 3.1 Conclusies

- De parameters die eerder zijn geïdentificeerd in het onderzoek naar microbiologische waterkwaliteit bij teelt van sla op water en paprika op substraat, zijn ook belangrijke parameters bij de teelt van Phalaenopsis. De verwachting is daarom ook dat de eerder gebruikte methoden een goed beeld kunnen geven van de microbiologische waterkwaliteit.
- De organische stof concentratie in het drainwater en in het water naar de kas is hoog in vergelijking met de metingen bij teelt van sla en paprika. Er zijn dus zeer veel voedingsstoffen in het systeem voor bacteriën om te groeien.
- De teelt van Phalaenopsis wijkt op veel aspecten af van de teelt van andere gewassen (specifiek substraat, watergift beperkt), en zal daarom naar verwachting eigen specifieke kenmerken hebben. De teelt op tomaat en gerbera staan dicht bij de eerder onderzochte teelt van sla en paprika. Hier wordt in de proefopzet rekening mee gehouden.
- Next Generation Sequencing is in staat om zeer kleine verschillen in de bacteriële populaties waar te nemen, en is daarmee zeer geschikt om bij alle gewassen te zoeken naar veranderingen in de bacteriesamenstelling in zowel het water als op de wortels.
- Het onderzoek zal zich focussen op het detecteren van de organische stof hoeveelheden en fracties, de respons die deze geven bij de plant, en de detectie van de veranderingen in bacteriepopulaties die hier het gevolg van zijn.

### 3.2 Aanbevelingen

- Bij tomaat en gerbera moet een nulmeting worden uitgevoerd, om de bacteriepopulaties en organische stof gehalten te kunnen relateren aan de andere gewassen in het project.
- Het onderzoeken van de effecten van organische stof fracties kan niet worden uitgevoerd bij de bedrijven in de praktijk, maar zal vanwege de schaal moeten worden uitgevoerd onder labcondities.
- De resultaten van de effectbepaling van organische stof zal worden getoetst bij bedrijven in de praktijk.
- Gedurende het project zullen metingen worden verricht bij telers in de praktijk, om seizoen variatie in een systeem vast te stellen. Zeker op het moment dat specifieke ziekteverwekkers de kop op steken, wordt een additionele bemonstering geadviseerd.

Dankwoord: Jolanda Korteland van de Stichting Control Food and Flowers en André van der Wurf van Groen Agro Control worden bedankt voor het ter beschikking stellen van de meetresultaten.

## 4 Referenties

Hornstra, L.M. (2017). Structurele aanpak microbiologische waterkwaliteitsproblemen bij teelt op water en substraat. Rapportage KWR 2017.013

