

Zomerteelt kropsla Mobiel Goten Systeem

Efficiëntie van ultrasone behandeling in de beheersing van vrijlevende bacteriën, algen en biofilm

1 INLEIDING

Telers met een continu recirculatiesysteem hebben vaak problemen met verstopping van druppelaars. Dit werd op het Technisch Comité MGS van het proefstation aangehaald. De vraag werd gesteld of een ultrasoon systeem werkzaamheid vertoont op organisch materiaal en algen die verstoppingen veroorzaken en of er eventueel ook werkzaamheid is op afdoding van bacteriën of schimmels.

Hiervoor werd het ultrasoon systeem van Maritech geïnstalleerd op het MGS systeem van afdeling 13. Afdeling 14 bleef onbehandeld. Er werd samengewerkt met KULeuven die ervaring heeft met het opvolgen van opbouw van biofilm in een continu recirculatiesysteem. Zij staan in voor de analyses (Prof. Hans Rediers, Dr. Lien Bosmans, ing. Christel Verreth). De financiering voor de analyses gebeurt dankzij het project FERTINNOWA. Dit is een Europees netwerk voor waterkwaliteit en nutriëntengebruik.

De doelstelling van deze studie is nagaan of het geteste ultrasoon systeem (Biosonic) de nodige effectiviteit vertoont om organisch materiaal, bacteriën, algen en de algemene biofilm te beheersen in een slaproductiesysteem (mobiele gotensysteem), met recirculatie van water. Daarnaast wordt ook nagegaan of grote planten sneller zorgen voor accumulatie van bacteriën en biofilm dan kleine planten.

2 PROEFOPZET

2.1 INSTALLATIE

In afdeling 13 en 14 van PSKW is het mobiele gotensysteem geïnstalleerd. Beide afdeling kunnen volledig apart functioneren op vlak van klimaat, voeding, enz. (indien gewenst). Voor het onderzoek, voorafgaand aan deze proef, werden alleen de voorraadputten met voeding van afdeling 13 gebruikt. Vanuit de voorraadputten van afdeling 13 werd afdeling 13 én 14 bestuurd. Bij de start van deze proef werden de voorraadputten van **afdeling 14 nieuw opgestart**: er werd gestart met vers water dat als voedingswater continu zal gerecirculeerd worden. **Het water van afdeling 13 wordt reeds continu rondgepompt/gerecirculeerd vanaf september 2016.** In beide afdelingen werd de actieve kool vervangen vóór de start van de proef.

In afdeling 13 wordt het ultrasone systeem van Maritech geïnstalleerd: een Aquasonic in de voorraadput met proper water. De biosonic wordt geïnstalleerd op de leiding die naar het irrigatieverdeelsysteem van de serre vertrekt (zie Foto 1 en 2). De proef loopt 56 dagen (8 weken). Bij de opstart, 6 juni 2017 (dag 0), werd gedurende 1 uur/etmaal ultrasone golven door de leidingen gestuurd.

Vanaf dag 7 : 4 uur/etmaal

Vanaf dag 14: 8 uur/etmaal

Vanaf dag 21: 24 uur/etmaal. Continu ultrasone golven tot en met dag 56.



Foto 1. Voorbeeld van een Aquasonic op een open vijver bij een teler. Op PSKW werd dit in de voorraadput met proper water geplaatst.



Foto 2. Voorbeeld van een Biosonic, geplaatst op de leiding net voordat het water vertrekt naar het verdeelsysteem in de serre.

De samenwerking met KULeuven zorgt voor:

- ~ Bepaling **vrijlevende bacteriën** in water
- ~ Bepaling **aangroei biofilm**. Dit gebeurt door gebruik te maken van een monitoringsunit (biofilm device): stuk leiding tussen bestaand leidingsysteem (Foto 3)
- ~ Bepaling bacteriën totaal kiemgetal



Foto 3. Biofilm device of monitoringsunit met ringen voor bepaling aangroei of accumulatie biofilm. De transparante buis wordt gedurende de gehele proef afgeschermd met zwarte plastic. Enkel bij staalname voor de ringen wordt de zwarte plastic verwijderd.

2.2 TEELTVERLOOP

Proeflocatie	Proefstation voor de Groenteteelt Sint-Katelijne-Waver – PSKW afd.13+14
Proefplan	7 beoordelingen in de tijd: onbehandeld (afd.14) t.o.v. behandeld (afd.13)
Opkweekmethode	5 cm perspot
Voortelt	kropsla, ras: Cosmopolia (Rijk Zwaan) (Foto 4)
Zaaidatum	Van 28 april tot 20 juni 2017
Plantdatum tray	Van 16 mei tot 5 juli 2017
Oogstdatum	7 opeenvolgende oogsten, van 21 juni tot 9 augustus 2017 (21/06/17; 29/06/17; 05/07/17; 12/07/17; 17/07/17; 03/08/17; 09/08/17).



Foto 4. 7 opeenvolgende oogsten van Cosmopolia in afdeling 13 en 14

2.3 ANALYSES

Zowel de **bacteriële belasting** van het water als de **gevormde biofilm** werden gedurende 5 weken opgevolgd op regelmatige tijdstippen. In afdeling 14 was er geen extra behandelingstechniek. In afdeling 13 werd een ultrasoon systeem geplaatst in de waterput. Voor beide afdelingen werden waterstalen en biofilmstalen genomen enerzijds van een rij met kleine planten (kraanvak 1) en anderzijds van een rij met grote planten (kraanvak 5).

Voor **kwantificatie van biofilm** werd een biofilm device in het irrigatiecircuit geplaatst (Foto 3). Deze bestaat uit een buis gevuld met polycarbonaat ringen waarop de biofilm gevormd kan worden, zoals eerder beschreven (Bosmans et al. 2016; Lambert et al. 2010; Vankerckhoven et al. 2011). Bij een staalname worden 3 ringen uit de buis verwijderd, wordt de biofilm afgeschraapt en opgelost in 10 mL fysiologisch water.

Het **aantal vrijlevende bacteriën** (planktonische cellen) in de waterstalen en in de geresuspendeerde biofilmstalen werd bepaald door klassieke uitplating van seriële verdunningen op TSA agar volgens de EN1276 norm.

Voor **bepaling van de algen** werd 10ml waterstaal gecentrifugeerd bij 8500rpm gedurende 20 min. De pellets werden vervolgens geresuspendeerd in 90% methanol (10ml) en gedurende 24h bij 4°C geïncubeerd. Nadien werden celresten verwijderd door centrifugatie gedurende 10 min bij 8500rpm. Van dit extract werd 200µl geanalyseerd bij 664 nm en 630 nm met een ThermoScientific Multiscan GO UV/VIS spectrophotometer. Het chlorophyll a gehalte (wat een maat is voor de hoeveelheid algen) werd bepaald aan de hand van volgende formule:
$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/l}) = (11.47 \cdot \text{OD}_{664}) - (0.4 \cdot \text{OD}_{630}).$$

3 RESULTATEN

Volgende zaken werden beoordeeld:

- 1) Visuele beoordelingen
- 2) Waterstalen: vrijlevende bacteriën
- 3) Via monitoring aangroei biofilm m.b.v. biofilm device
 - a. Afdeling 13 met Aquasonic/Biosonic
 - i. Monitoringsysteem kraanvak 1 kleine planten (D 50 min.)
 - ii. Monitoringsysteem kraanvak 5 grote planten (D 10 min.)
 - b. Afdeling 14 controle (geen Biosonic)
 - i. Monitoringsysteem kraanvak 1 kleine planten (D 50 min.)
 - ii. Monitoringsysteem kraanvak 5 grote planten (D 10 min.)
 - c. Ringen analyseren (3 herhalingen) op aangroei bacteriën
 - i. Week 1, 2, 3, 4, 6, 8
- 4) Oogstgewichten en rand van 7 × oogst van 21/06/17 tot 09/08/17, Cosmopolia

3.1 VISUELE BEOORDELING

In het onbehandelde object (afdeling 14) ontstond na 3 weken proef draaien organisch materiaal aan de binnenkant van de monitoringsunit (Foto 5). In het behandelde object (afdeling 13) kon geen aanslag van organisch materiaal aangetroffen worden.

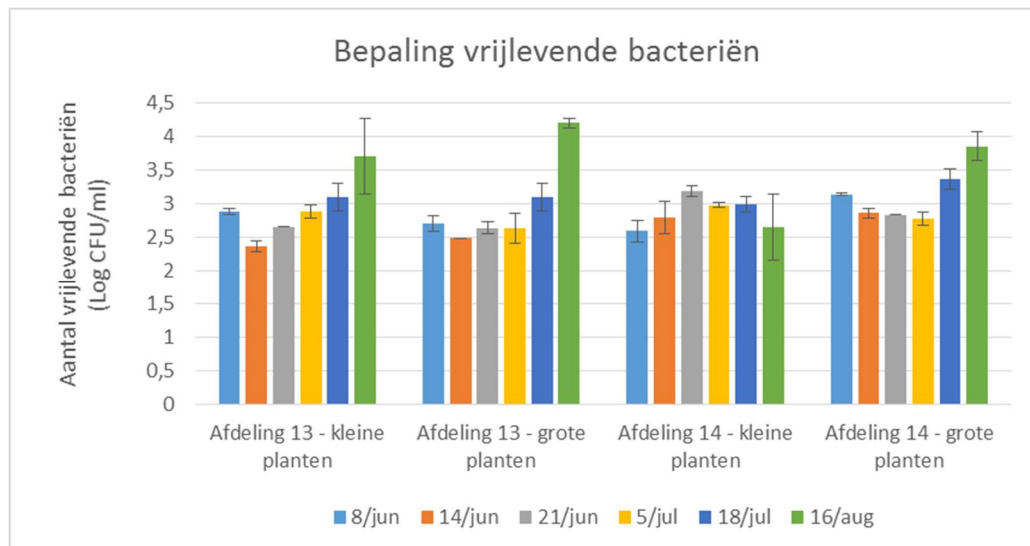


Foto 5. Na 3 weken proef draaien vertoonde de binnenkant van de buis van de monitoringsunit van het onbehandelde object aanslag van organisch materiaal.

3.2 BEPALING WERKZAAMHEID OP VRIJLEVENDE BACTERIËN

De hoeveelheid vrijlevende bacteriën die teruggevonden werden in de waterstalen worden weergegeven in Figuur 1. Bij de eerste staalname (8/6/2017) werd er in afdeling 14 met de grote planten een lichtjes hogere waarde voor het kiemgetal bekomen. Gezien de geringe verschillen zouden bijkomende testen deze observatie moeten bevestigen. In de volgende staalnames lijkt er voornamelijk in afdeling 13 een accumulatie op te treden in het kiemgetal van de waterstalen. Maar op de voorlaatste staalnamedag (18/7) is er wat het kiemgetal betreft geen noemenswaardig verschil tussen de verschillende afdelingen. Op de laatste staalnamedag lijkt er een lager kiemgetal aanwezig te zijn in afdeling 14 met kleine planten, maar deze waarneming zou bevestigd moeten worden om zekerheid te verschaffen. Er zijn ook geen noemenswaardige verschillen tussen het kiemgetal in het circuit met grote of met kleine planten vastgesteld.

De meeste waarden voor het kiemgetal liggen onder 10^3 CFU/ml. Voor irrigatiewater zijn er momenteel geen normen, maar uit vorig onderzoek bleek dat de gemiddelde waarden voor irrigatiewater rond 10^4 CFU/ml ligt, wat aangeeft dat de microbiologische kwaliteit van het water in beide afdelingen goed is.



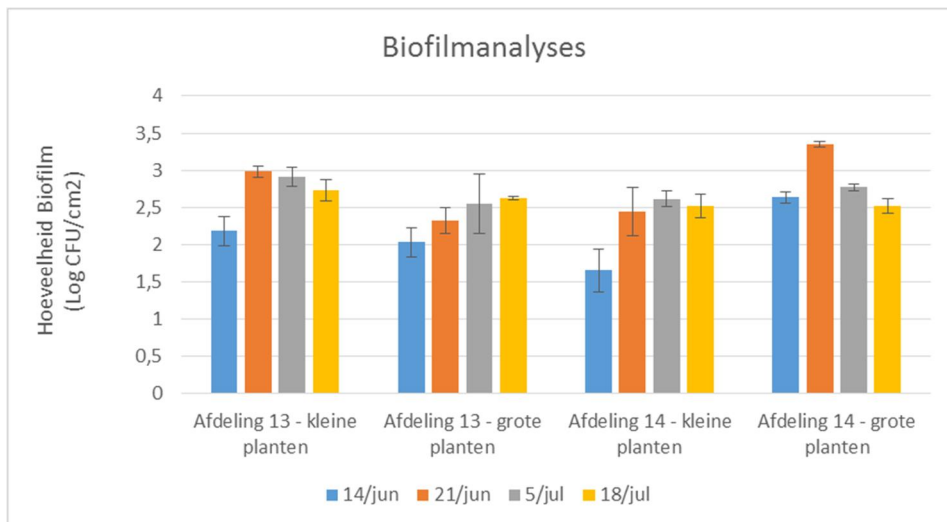
Figuur 1. Evaluatie van Biosonic-behandeling in de beheersing van vrijlevende bacteriën. Telkens wordt het gemiddelde getoond van minstens 2 uitplatingen. De foutenbalk geeft de standaarddeviatie weer.

3.3 BEPALING WERKZAAMHEID OP BIOFILM EN ALGEN

De analyses van de biofilm worden getoond in figuur 2. Bij de eerste staalname van het experiment werd er in afdeling 14 in het circuit van de grote planten een lichtjes hogere waarde van het kiemgetal bekomen. Dit komt overeen met de lichtjes hogere waarde van het kiemgetal van de vrijlevende bacteriën. Het gaat hier echter om een miniem verschil. Een onafhankelijke herhaling zou dit moeten bevestigen.

In de andere circuits is er na de eerste staalname telkens een verhoging van de biofilm waar te nemen bij de volgende staalname (21/06), waarna er min of meer een stabilisatie optreedt. Op de laatste staalnamedag is er geen significant verschil tussen afdeling 13 (met Biosonic behandeling) en afdeling 14 (zonder behandeling). Ook kan er geen verschil vastgesteld worden tussen de circuits.

Kwantificatie van algen werd uitgevoerd op basis van een chlorofyl a meting. Zowel bij de staalname bij de start van het experiment als op het einde, lagen alle waarden beneden de detectielimiet. Er kan dus geen uitsluitel gegeven worden over de effectiviteit van Biosonic om algen te verwijderen.



Figuur 2. Evaluatie van Biosonic-behandeling in de beheersing van biofilm. Het gemiddelde van 3 ringen wordt getoond. De foutenbalk geeft de standaarddeviatie weer van de 3 herhalingen.

Samenvatting analysesresultaten:

Op basis van de bekomen gemeten resultaten kan er niet eenduidig vastgesteld worden dat de behandeling met Biosonic een meerwaarde heeft voor de bestrijding van bacteriën en biofilms. Hierbij moet wel gesteld worden dat de waardes van het kiemgetal zeer laag liggen in beide afdelingen. **Indien de microbiële belasting van het water hoger zouden liggen, dan kan een ultrasone behandeling wel een meerwaarde geven door ervoor te zorgen dat het kiemgetal op een relatief laag niveau ligt (vb. 10^3 CFU/ml).** In eerder onderzoek waarbij de effectiviteit van een ultrasone behandeling werd nagegaan, werd bijvoorbeeld aangetoond dat een ultrasone behandeling in staat is om de microbiële belasting te reduceren, maar tot een bepaald niveau (2.7 log CFU/ml) (Vankerckhoven et al. 2011).

3.4 OOGSTGEGEVENS

Bij elke oogst (7) werd van 6 kroppen per object (behandeld en onbehandeld) het kroggewicht, de wortelontwikkeling en percentage rand opgemeten. Onderstaande tabel (Tabel 1) geeft de gemiddelden per 6 kroppen.

Tabel 1. Oogstgegevens: kropgewicht (gemiddelde van 6 in g/stuk), wortelontwikkeling (gemiddelde van 6 in g/plant) en ernst rand (%) van de objecten

		Kropgew. 13	Kropgew.1 4	Wortel 13	Wortel 14	Ernst rand 13	Ernst rand 14
	Datum	Behandeld	Onbeh.	Behandeld	Onbeh.	Behandeld	Onbeh.
1	21/06/2017	452,2	516,8	-	-	-	-
2	29/06/2017	501,5	545,5	22,8	26,7	-	-
3	05/07/2017	501,3	567,0	11	13,8	56,1	33,7
4	12/07/2017	555,2	608,7	13,9	16,3	98,7	95,7
5	17/07/2017	569,8	593,3	21,8	22,5	51	65
6	03/08/2017	580,2	590,2	10,9	12,3	36,7	32
7	09/08/2017	538,2	577,2	10,1	11,9	27,4	11,5
		gem./6 kroppen		gem./6 planten			
		g/krop		g/plant		%	

Bij elke oogst is het oogstgewicht in afdeling 14 (onbehandeld) hoger. De verklaring hiervoor is dat in afdeling 14 met vers voedingswater gestart werd bij aanvang van de proef. In afdeling 13 werd verder gewerkt met het water dat reeds recirculeerde vanaf september 2016. Hetzelfde geldt voor de wortelontwikkeling. Uit literatuur blijkt reeds dat sla gevoelig is voor groeiremming door vorming van wortellexudaten die accumuleren bij continue recirculatie (vb. vorming van benzoëzuur). Dit laatste werd ook aangetoond in voorgaand onderzoek op PSKW i.s.m. UGent (afdeling LIWET). Actieve kool kan slechts 30% van de exudaten verwijderen uit het water. Op vlak van rand zien we geen effect. De aantasting van rand is sterk variabel per oogst en afwisselend hoger in de verschillende afdelingen.

4 CONCLUSIES

- ~ Visueel: Organisch materiaal valt uiteen in fijnere stofdeeltjes. Voor de telers is dit een voordeel want betekent minder verstoppingen van de druppelaars.
- ~ Bepaling vrijlevende bacteriën: De meeste waarden voor het kiemgetal liggen onder 10^3 CFU/ml. Voor irrigatiewater zijn er momenteel geen normen, maar uit vorig onderzoek bleek dat de gemiddelde waarden voor irrigatiewater rond 10^4 CFU/ml ligt, wat aangeeft dat de **microbiologische kwaliteit van het water in beide afdelingen goed is.**
- ~ In deze proef zien we geen effect op de microbiële belasting. Eerder onderzoek toonde aan dat een ultrasone behandeling in staat is om de microbiële belasting te reduceren, maar tot een bepaald niveau (2.7 log CFU/ml) (Vankerckhoven et al. 2011). In deze proef was de microbiële belasting lager.
- ~ Algen: alles bevond zich onder de detectielimiet.

Aangezien het uitgangswater kwalitatief goed is (totaal kiemgetal $<10^3$ CFU/ml), kunnen we met deze proef niet aantonen dat de bacteriën, algen of biofilm gereduceerd worden met ultrasone golven. Organisch materiaal kan verbrijzeld worden tot fijne stofdeeltjes.

5 REFERENTIES

- Bosmans, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Moerkens, R., Wittemans, L., Van Kerckhove, S., De Mot R., Lievens B. & Rediers, H. (2016). Efficacy of hydrogen peroxide treatment for control of hairy roots disease caused by rhizogenic agrobacteria. Journal of applied microbiology.

- Lambert, N., Rediers, H., Hulsmans, A., Joris, K., Declerck, P., De Laedt, Y., Liers, S. (2010). Evaluation of ultrasound technology for the disinfection of process water and the prevention of biofilm formation in a pilot plant. *Water Science and Technology*, 61 (5), 1089-1096.
- Vankerckhoven, E., Verbessem, B., Crauwels, S., Declerck, P., Muylaert, K., Willems, K. A., & Rediers, H. (2011). Exploring the potential synergistic effects of chemical disinfectants and UV on the inactivation of free-living bacteria and treatment of biofilms in a pilot-scale system. *Water Science and Technology*, 64(6), 1247-1253.
- EN 1276, European Standard: Chemical disinfectants and antiseptics – Quantative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas –Test method and requirements.

6 DANKWOORD

Deze proef werd uitgevoerd met de financiële steun van Maritech, de Belorta Veiling en de Europese Unie in het kader van GMO en het project FERTINNOWA.

I.Vandavelde, J. Van Lommel, E. Berckmoes en J. Ingelbrecht

Proefstation voor de Groenteteelt, Sint-Katelijne-Waver

H. Rediers, L. Bosmans, Ch. Verreth

KULeuven