

Chemische ontsmetting van de aardappelringrotbacterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* op het houtoppervlak van aardappelopslagkisten

Verzamelde tussenrapportages

van onderzoek uitgevoerd in het kader van het onderzoeksproject BO-33.03-001-005 "Ontsmetting ringrot" gefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie

L.H. Stevens, J. Lamers, P.S. van der Zouwen, O. Mendes, P. Spoorenberg, J.M. van der Wolf

18 december 2015

Abstract

Chemical disinfection of ring rot bacterium (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) on the wood material of seed potato storage crates

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Cms), the bacterium that causes ring rot in potato, can be introduced in seed potatoes from contaminated wooden crates that are re-used year after year for potato storage. It is common practice to clean the crates by mechanical removal of dirt and dirt particles, including potato debris. Hygiene protocols intended to manage bacterial potato diseases comprise a chemical disinfection step, which either is incorporated in, or chronologically added to the cleaning process. In the present study four commercially available disinfection products were tested against Cms. Each of these products represented a different class of biocide, i.e. organic acids (*viz* benzoic acid), peroxygenous compounds (*viz* potassium peroxy sulfate), quaternary ammonium compounds (*viz* didecyldimethylammoniumchloride), and hypochlorite generating compounds (*viz* sodium-p-toluenesulfochloramide). The target objects consisted of small wooden panels that were smeared with potato tuber pulp homogenized with a high inoculum of an antibiotic-resistant Cms mutant. By exposing the inoculated panels to the product solutions and subsequent determination of remaining Cms viability, the relative efficacy of the products was established.

The four disinfection products each were tested in the registered concentration and in one lower and one higher concentration. As expected, treatment with increased doses of disinfectant led to decreased numbers of viable Cms recovered from the wood surface. However, none of the doses of any of the four products resulted in complete eradication of Cms. Further increase of the doses for practical applications is discouraged by economic and environmental costs and registration requirements. It was therefore decided to continue the study with the registered doses recommended by the supplier.

Apart from the doses applied, the duration of exposure of the inoculum to the active ingredients of the products is a determining factor for successful disinfection. The disinfecting activities of the four products were therefore compared by submersion of the inoculated panels into the product solutions for various periods of time between 1 second and 10 minutes. Also tested was a treatment with foam freshly prepared from one of the products. The treatments were applied to dry panels and to panels that were moderately moistened with a fine dust of water. In the case of two of the products a submersion period of less than 5 minutes appeared to be sufficient for complete eradication of Cms. These products contained respectively potassium peroxy sulfate and sodium-p-toluenesulfochloramide as active ingredients. The other products required a submersion period of less than 10 minutes to obtain the same result. The foam application gave no satisfactory results.

The two products that exhibited the highest relative efficacy were studied for their disinfection performance when applied as liquid medium for mechanical cleaning in a conventional automated crate washer. The panels were mounted at four different positions inside an original potato storage crate, which subsequently was subjected in the crate washer to a conventional cleaning procedure using disinfectant solution instead of water as cleaning medium. In contrast to the submersion procedure, the jet cleaning process of the crate washer was able to remove within 0.5 minutes all organic matter of the inoculum, as judged from visual inspection. Presumably due to this additive mechanical component, 2 minutes of jet cleaning using the potassium peroxy sulfate based product resulted in complete eradication of Cms, whereas submersion for 2 minutes did not. A disadvantage

of this product proved to be the excessive foam formation inside the pumping system of the crate washer. The product containing sodium-p-toluenesulfochloramide as active ingredient was completely effective within 0.5 minutes irrespective the method of application, and gave no technical problems during jet cleaning.

Panels with tuber tissue containing excessive numbers of Cms derived from naturally infected potatoes (ca. 10^7 cfu per gram of tissue) were exposed to the registered dose of the sodium-p-toluenesulfochloramide based product by submersion for 0.5, 1, 2 and 5 minutes. Not a single Cms colony was recovered after submersion for 2 and 5 minutes. The results suggest that automated crate washing for 2 minutes using the registered dose of the product containing sodium-p-toluenesulfochloramide is a reliable method for disinfecting Cms-contaminated wooden potato crates.

Experiment 1 Dosering van de middelen

Inleiding

Het is bekend dat de ringrotbacterie (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Cms) lang kan overleven op en in het hout van opslagkisten waarin aardappelen bewaard worden. In de praktijk zijn twee ontsmettingswijzen gangbaar, namelijk het volledig onderdompelen van de kisten in ontsmettingsmiddel, en het bespuiten van de kisten met ontsmettingsmiddel. Dit gebeurt bij voorkeur na verwijdering van vuil dat zich aan het hout heeft vastgezet, want vuil vormt eveneens een mogelijke schuilplaats voor pathogenen.

Hoe effectief een middel in de praktijk is, hangt af van de omstandigheden waarin het in contact kan treden met Cms en van de omstandigheden waarin het zijn werking op Cms kan uitoefenen. Hetzelfde geldt voor de ontvankelijkheid van Cms voor het middel: ook dat kan sterk door praktische omstandigheden bepaald zijn. Factoren die de effectiviteit van de middelen kunnen beïnvloeden zijn: de fysieke toegankelijkheid, de temperatuur, de concentratie, de blootstellingsduur, de aanwezigheid van vocht, en de matrix waarin zich het Cms-inoculum bij toediening bevindt. Wat een middel in potentie vermag en wat de eventuele risico's van dat middel in de praktijk zouden kunnen zijn, moet tegen die achtergrond bezien worden. Laboratorium-experimenten bieden betere mogelijkheden om genoemde factoren in de hand te houden dan proeven in de praktijk. Daarom is besloten om het project op te delen in twee fases. In de eerste fase wordt de potentiële effectiviteit van middelen onder gecontroleerde condities in het lab uitgetest. In de tweede fase wordt voor de meest belovende middelen onderzocht hoe hun potentiële effectiviteit onder gangbare praktijkcondities uitpakt. Het hier beschreven experiment 1 maakt onderdeel uit van de eerste fase.

Doel

Het doel van deze proef was inzicht te krijgen in de effectiviteit van vier geselecteerde ontsmettingsmiddelen bij hun toepassing kisthout aan de buitenzijde te ontsmetten van de ringrotbacterie (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Cms). De vier middelen vertegenwoordigen elk een eigen chemische categorie.

Proefopzet

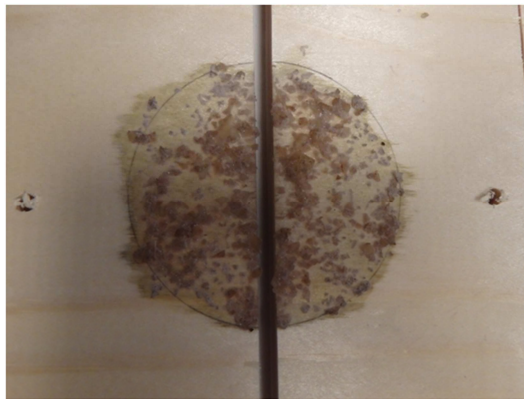
De proef, in drievoud uitgevoerd, bestond uit drie stappen, achtereenvolgens (1) inoculeren van plankjes kisthout, (2) behandeling van de plankjes met ontsmettingsmiddel, en (3) bemonsteren en analyseren van de plankjes op aanwezigheid van Cms.

- (1) *Inoculeren*. De matrix waarin Cms zich op het kisthout bevindt is een potentieel belangrijke factor voor de effectiviteit van het ontsmettingsmiddel. In de praktijk wordt het kisthout meestal besmet door versmering van door Cms verrot knolmateriaal. Dit betekent dat Cms zich doorgaans in een verslijmde laag van rot knolmateriaal op het hout bevindt. De intentie was om deze situatie te simuleren door de proefplankjes in te smeren met Cms-besmette knollen. Diverse pogingen om in het laboratorium kunstmatig met Cms besmette rotte knollen te verkrijgen waren echter niet succesvol. Als alternatief werd een pulp van anaeroob verrotte en middels gamma-bestraling gesteriliseerd knolmateriaal gebruikt waaraan Cms was toegevoegd. Ook dat was niet succesvol; testen wezen uit dat de anaerobe verrotting een milieu gecreëerd had dat dodelijk was voor Cms. Daarom werd besloten om de plankjes te inoculeren door pulp van vers knolmateriaal uit te smeren waaraan Cms was toegevoegd. Figuur 1 toont een plankje met ingedroogd inoculum; de plankjes waren elk doormidden gezaagd, waarbij één helft behandeld werd en de andere helft als onbehandelde controle fungeerde.
- (2) *Behandeling met ontsmettingsmiddel*. Drie dagen na inoculeren werd van elk plankje één helft behandeld met ontsmettingsmiddel. Gekozen werd voor onderdompeling omdat dit de meest reproduceerbare methode is om het besmette hout volledig in contact met het middel te brengen. Een cruciale factor is de blootstellingsduur. In de praktijk wordt het hout kortstondig gedompeld of kort vol bespoten met het middel. Daarom werd het hout in dit experiment in het middel gedipt, dit is dopen en onmiddellijk eruit, waarna het bij kamertemperatuur aan de lucht te drogen werd

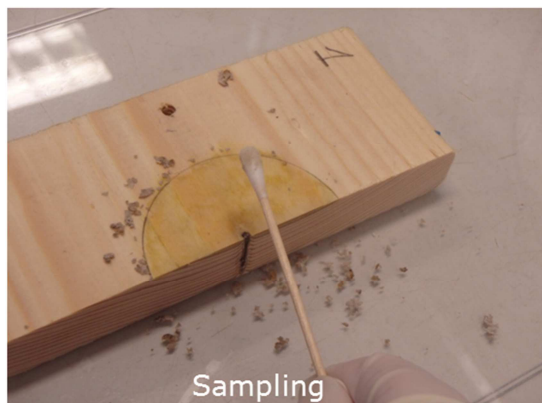
gehangen. Een tweede cruciale factor is de dosering. Om inzicht in de robuustheid van de behandelingen te krijgen werden de middelen toegepast in de aanbevolen etiketdosering, en in een 10 maal lagere dosering en, afhankelijk van onder meer de oplosbaarheid, in een 2-10 maal hogere dosering.

- (3) *Bemonstering en analyse.* Het hout werd 1 week na behandelen bemonsterd door van elke plankhelft precies de halve cirkel volledig en onder gelijkmatige druk en beweging af te nemen met een in Ringers + 0.01% Tween 20 gedoopt steriel wattenstaafje (zie figuur 2); het wattenstaafje werd vervolgens in 1 ml Ringers + 0.01% Tween 20 gewassen. De wasvloeistof werd onverdund en 100 x verdund uitgeplaat op selectief medium (100 µl per plaat). Na 1-2 weken werden de aantallen Cms-koloniën per plaat geteld; deze werden gebruikt als maat voor de effectiviteit van de ontsmettingsmiddelen. NB. Het ingedroogde inoculum was op het hout zichtbaar als een egaal dof laagje op het hout met daarop losse schilfertjes van knolmateriaal (zie figuur 1). Deze laatste werden direct voorafgaande aan de bemonstering nagenoeg volledig van het te bemonsteren plankje verwijderd door lichte aanraking met het wattenstaafje. In één van de drie herhalingen zijn ook deze knolresten op Cms geanalyseerd door ze in Bioreba-zakjes te verzamelen en met 2 ml Ringers + 0.01 Tween 20 te extraheren en onverdund en 100 x verdund uit te platen.

Door gedurende de proef het gewicht van de plankhelften te volgen, werd een beeld verkregen van de snelheid waarmee het droogproces na inoculeren en behandelen verliep.



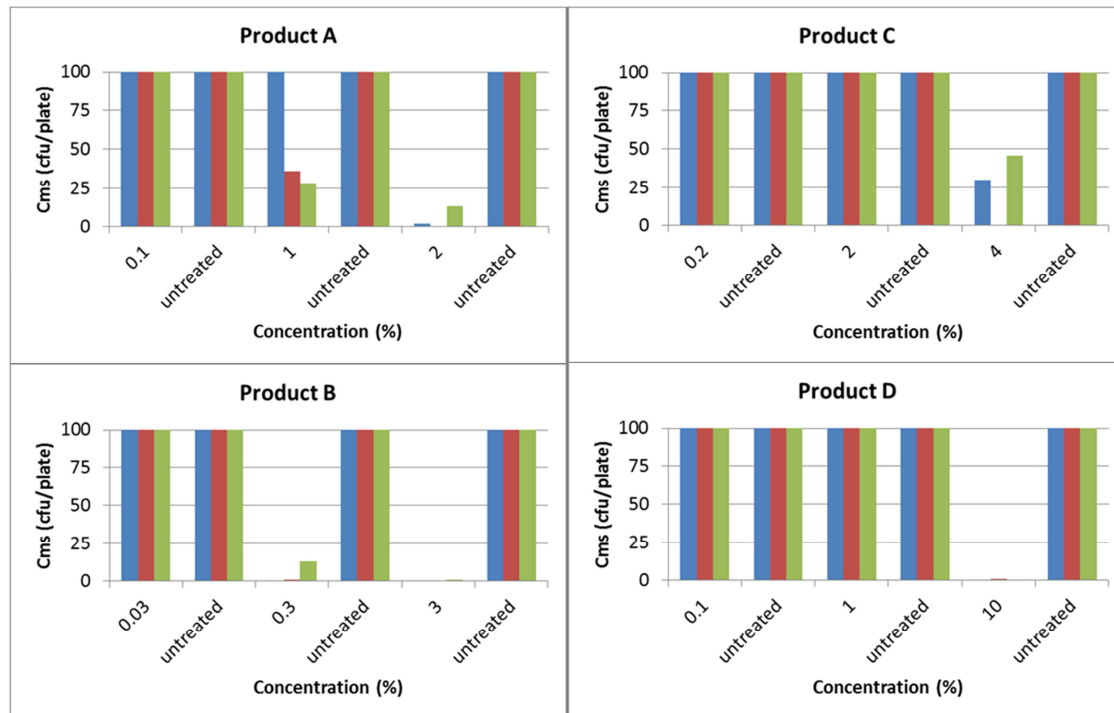
Figuur 1. De helften van één plankje kisthout met binnen de aangegeven cirkel ingedroogd inoculum (verse aardappelpulp waaraan een suspensie van Cms, $>10^8$ cfu/ml, was toegevoegd, 9:1 v/v).



Figuur 2. Bemonstering van het kisthout.

Resultaten

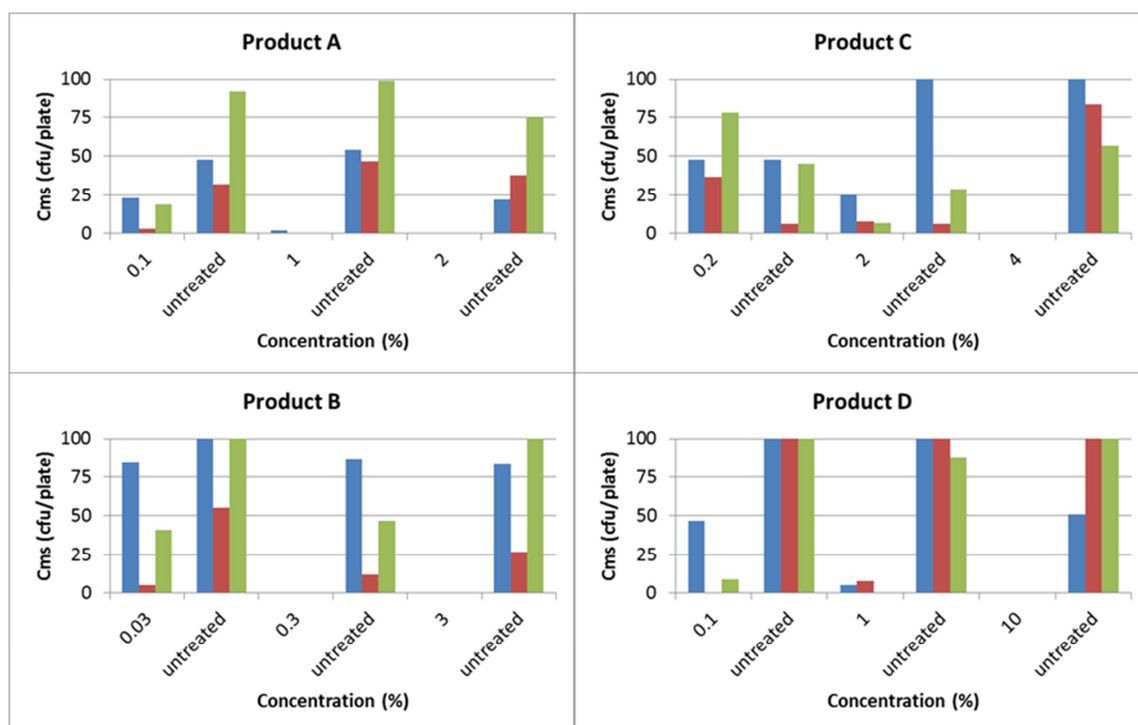
Zoals verwacht werden bij alle vier de middelen met toenemende dosering afnemende aantallen Cms-koloniën in de monsters waargenomen die van het houtoppervlakte afkwamen. Toegepast in de aanbevolen etiketdosering gaf geen van de vier middelen een volledig ontsmettende werking (zie de absolute cfu-aantallen per plaat in figuur 3 verkregen uit de onverdunde wasvloeistof). Ook de hogere doseringen bleken voor geen van de middelen volledig effectief (figuur 3). Deze resultaten lieten tevens zien dat de vier middelen althans onder de toegepaste omstandigheden niet dezelfde effectiviteit bezaten. Een nauwkeurigere vergelijking van de effectiviteit van de vier middelen geven de resultaten verkregen met de 100 maal verdunde monsters, weergegeven in figuur 4. Deze tonen min of meer hetzelfde beeld: twee middelen werkten iets beter dan de overige twee, terwijl deze laatsten onderling ook nog iets van elkaar verschilden in effectiviteit.



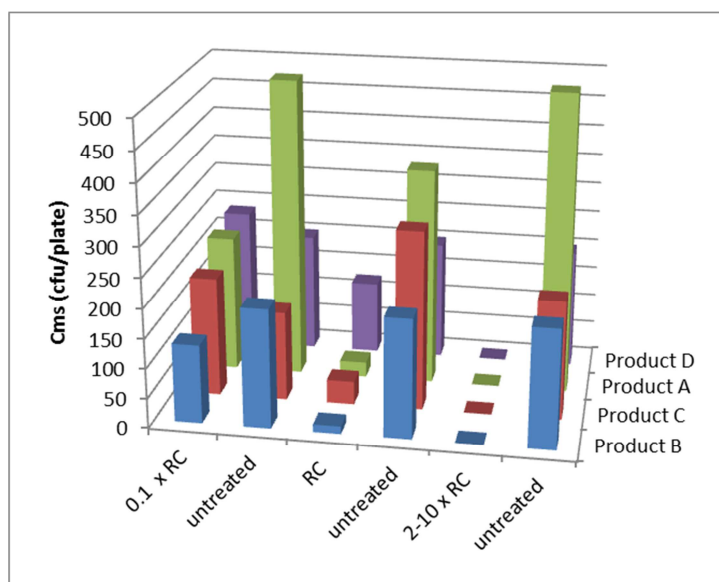
Figuur 3. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de onverdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na behandeling met drie concentraties van de producten A t/m D en de bijbehorende onbehandelde plankhelften ("untreated"). De blauwe, rode en groene kolommen presenteren de afzonderlijke drie herhalingen. De y-as is afgekapt op 100 cfu/plaat, waardoor onzichtbaar is dat kolommen die op 100 cfu/plaat eindigen waarden vertegenwoordigen van > 100 cfu/plaat.

Ook op de losliggende knolresten (verzameld en doorgemeten in één van de drie herhalingen) hadden de middelen een meetbare reductie van Cms teweeg gebracht (zie figuur 5). De onderlinge verhouding in effectiviteit kwam overeen met die waargenomen in de monsters verkregen van het houtoppervlak (figuur 3 en 4).

Het verloop van het plankjesgewicht tijdens de proef liet zien dat de droogtijd na behandelen enkele uren in beslag nam; na 1 uur was ca. 40%, en na 2 uur circa 70% verdampt. Dit betreft echter niet de droogtijd van het houtoppervlakte. Tijdens dippen neemt het plankje aan de kopse zijde vocht op. Dit verdampt aanzienlijk minder snel dan het vocht op het oppervlak. Opdrogen van het houtoppervlak – en daarmee dus de blootstellingsduur – betrof niet uren maar veeleer tientallen van minuten (visuele waarneming).



Figuur 4. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de 100 maal verdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na behandeling met drie concentraties van de producten A t/m D en de bijbehorende onbehandelde plankhelften (“untreated”). De blauwe, rode en groene kolommen presenteren de afzonderlijke drie herhalingen. De y-as is afgeknapt op 100 cfu/plaat, waardoor onzichtbaar is dat kolommen die op 100 cfu/plaat eindigen waarden vertegenwoordigen van > 100 cfu/plaat.



Figuur 5. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de 100 maal verdunde monsters verkregen van de knolresten op de behandelde plankhelften een week na behandeling met drie concentraties van de producten A t/m D en op de bijbehorende onbehandelde plankhelften (“untreated”). RC = aanbevolen etiketdosering.

Experiment 2 Blootstellingsduur I

Inleiding

In Experiment 1 werd van vier middelen in drie concentraties de ontsmettende werking getest op de ringrotbacterie die in verse aardappelpulp op kisthout was aangebracht (zie de betreffende tussenrapportage). De vier onderzochte middelen vertegenwoordigen elk verschillende chemische categorieën. Zoals was verwacht werden in de monsters die van het houtoppervlak afkwamen afnemende aantallen Cms-koloniën waargenomen naarmate de dosering van de middelen toenam. Geen van de vier middelen bleek in de aanbevolen etiketdosering volledig effectief.

Voor het verbeteren van de effectiviteit zijn er in theorie tenminste de volgende opties:

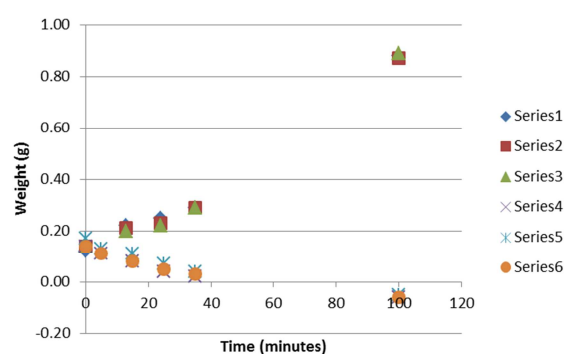
a. Verhoging van de dosering. De resultaten uit Experiment 1 lieten zien dat dit tot het gewenste resultaat kan leiden. Deze optie is slechts mogelijk voor middelen waarvan de oplosbaarheid toelaat de dosering substantieel te verhogen. Een potentieel probleem hierbij is dat hogere dosering dan de etiketdosering een nieuwe toelating vergt. Zeker is dat verhoging van de dosering tot hogere kosten leidt, en tot een hogere milieubelasting.

b. Verlenging van de blootstellingsduur. In Experiment 1 was de blootstellingsduur overeenkomstig de praktijk kort: het houtoppervlak werd volledig nat gemaakt en onmiddellijk daarna aan de lucht gedroogd. We gaan uit van de aanname dat het middel voornamelijk zijn chemische werking uitoefent wanneer het houtoppervlak nat is. De blootstellingsduur zou dus verlengd moeten worden door het houtoppervlak langer nat te houden. Dit zou kunnen door:

- i. Verdamping vertragen door hogere luchtvochtigheid. Lijkt in de praktijk lastig.
- ii. Schuimvorming. Er is tenminste één middel op de markt die toegepast kan worden in schuimvorm. Vermoedelijk leidt dit tot verlenging van de blootstellingsduur.
- iii. Kisten langer dompelen of herhaald met product bespuiten. Dit maakt de kosten navenant hoger en belast het milieu extra.
- iv. Houtoppervlak nat houden door na de behandeling water i.p.v. middel te vernevelen. Dit ondervangt de nadelen van ii maar introduceert het risico dat hiermee het middel wordt verdund en de actieve chemische stoffen van het houtoppervlak worden gespoeld.

c. Verhoging van de chemische activiteit van het middel. Wellicht is het mogelijk om de chemische activiteit van de middelen te verhogen door bij hogere temperatuur te werken, bijvoorbeeld door het middel te verwarmen bij toediening, en/of de kisten na behandeling bij hogere temperatuur weg te zetten. Een mogelijk nadeel is dat hiermee waarschijnlijk de droogtijd, en dus de blootstellingsduur verkort wordt.

In principe kan de blootstellingsduur verlengd worden door het houtoppervlak langer nat te houden. In een pilot experiment is gecontroleerd of opdrogen van nat gemaakt houtoppervlak kan worden tegengegaan door het hout in een gesloten container te plaatsen met hoge RV (wanden, bodem en deksel aan binnenzijde volledig bekleed met nat filtreerpapier). Het houtoppervlak werd nat gemaakt door er gedurende 10 seconden een waterkolom van 10 cm op te houden. Vervolgens werd het hout onmiddellijk in de container geplaatst. Een controlegroep werd buiten de container gehouden (droge lucht). Bijgaande figuur toont de netto gewichtsverandering in de tijd. Conclusies: (1) de plankjes die bij hoge luchtvochtigheid werden geïntubeerd namen weliswaar vocht op en werden dus zwaarder



(Series 1 t/m 3), MAAR tegen de verwachting in was het *houtoppervlak* na ca. 25 minuten niet meer nat; (2) de plankjes buiten de container (Series 4 t/m 6) stonden vocht af en het houtoppervlak was evenals het houtoppervlak van de groep in de container na ca. 25 minuten niet meer nat; (3) de vochtopname door het hout in de container was na 24 uur niet gestopt en bedroeg op een plankje van 80 gram maar liefst meer dan 6 gram; (4) Nat houden van het houtoppervlak lukt niet door het hout bij hoge luchtvochtigheid te incuberen.

Doel

In overleg met betrokken partijen is er voor gekozen om te onderzoeken of de effectiviteit van de etiketdosering verbeterd kan worden door de blootstellingsduur te verlengen (optie b). Zoals hierboven beschreven wees een pilot-experiment uit dat opties b-i en b-iv lastig zijn te verwezenlijken. Besloten werd om in dit experiment het houtoppervlak langer of herhaald te dompelen (optie b-iii) en in het geval van één middel ook schuimvorming toe te passen (optie b-ii). De behandelingen werden uitgevoerd met geïnoculeerde plankjes die tevoren wel en tevoren niet bevochtigd waren met een waterneveltje. Als controle-behandelingen werd de korte blootstellingsduur gehanteerd zoals uitgevoerd in Experiment 1. Het experiment werd in 3-voud uitgevoerd.

Uitvoering

Inoculum. De te gebruiken Cms-lijn is de stam IPO 1873 (streptomycine mutant van NCPB 4053), een slijmvormer. Vanaf een agarplaat wordt hiervan een geconcentreerde suspensie bereid (ca. 10^9 cfu/ml) die onmiddellijk wordt toegevoegd aan vers bereide pulp van aardappelknollen in een volumeverhouding van 1:10 (Cms-suspensie : knolmateriaal). Na homogenisatie wordt dit mengsel als inoculum aangebracht op het houtoppervlak.

Kisthout. Uit gangbare aardappelopslagkisten (nieuw) worden plankjes gezaagd (lengte x breedte ca. 9 x 9 cm). Beide kopse kanten worden in het midden en 1 cm uit de kant doorboord (diameter 3 mm). Midden op de plankjes wordt met potlood een cirkel getrokken van 6 cm diameter. De plankjes worden dwars op de nerven in twee gelijke helften gezaagd, waarmee tevens de cirkel in twee gelijke helften verdeeld is.

Inoculeren van het kisthout. Per plankje worden beide helften in oorspronkelijke positie stevig tegen elkaar gefixeerd. Vervolgens wordt hierop met een lepel homogeen circa 1 gram Cms-inoculum aangebracht zodanig dat de aangebrachte zaagsnede door het midden van de ingesmeerde plekken loopt en de potloodcirkel volledig ingesmeerd is. Hierbij zal een zichtbare laag aardappelmateriaal op de plankjes achterblijven. Door de plankjes uit elkaar te nemen ontstaan paren van besmette plankjes. Het inoculum krijgt ruim de gelegenheid (circa 3 dagen) te drogen aan lucht (kamertemperatuur). Aanname: binnen ieder paar is de houtstructuur en het inoculum nagenoeg gelijk.

Behandeling van het kisthout met ontsmettingsmiddel. Kort gezegd zijn er drie behandelingsmethoden uitgetest voor vier middelen, plus een vierde methode (namelijk het middel in schuimtoestand aanbrengen) uitgetest voor één van de vier middelen (namelijk voor Product C). Op een rijtje gezet:

1. Eén enkele keer dippen in het ontsmettingsmiddel (alle vier middelen getest);
2. Twee keer dippen met tussenpoze van 2 uur (alle vier middelen getest);
3. Tien (10) minuten ondergedompeld houden (alle vier middelen getest);
4. Aanbrengen van het middel in schuimtoestand (slechts Product C getest).

Deze behandelingen zijn uitgevoerd (a) op **droge** plankjes waarop het Cms-inoculum een week eerder was ingedroogd, en (b) op tevoren oppervlakkig **natgemaakte** plankjes (waterneveltje) waarop het Cms-inoculum een week eerder was ingedroogd.

Controles zijn (a) behandeling met water, en (b) niet-geïnoculeerd hout behandeld met water (negatieve controle). Elk middel wordt getest in de etiketdosering, zoals in onderstaande tabel aangegeven.

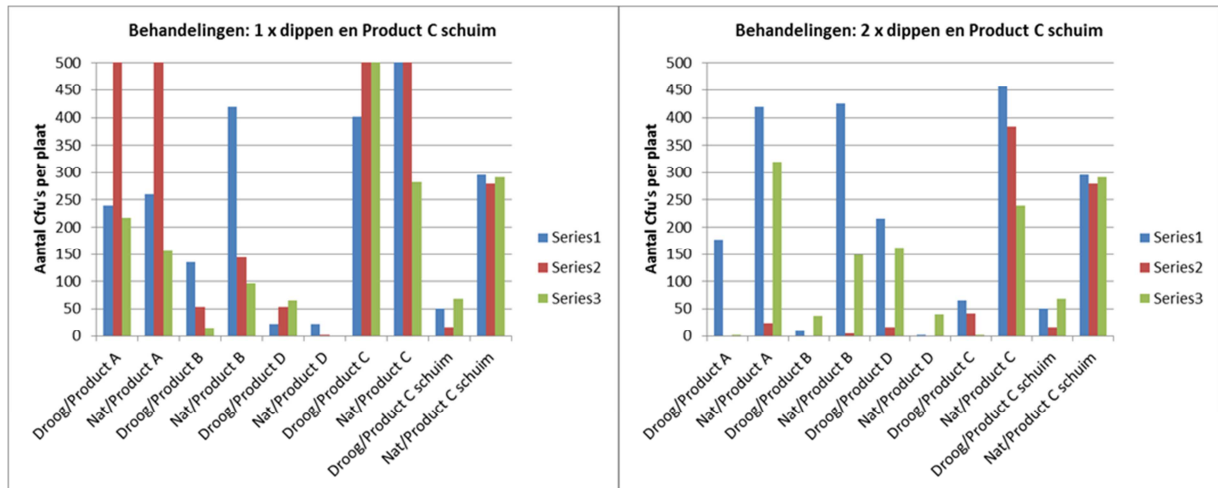
Produkt	werkzame stof	dosering
1. Product A	45,3% pentakalium bis(peroxymonosulfaat)bis(sulfaat)	1%
2. Product B	450 g/l N,N-didecyldimethylammoniumchloride	0,3%
3. Product D	81% natrium-p-tolueensulfonchloramide	1%
4. Product C	90 g/l benzoëzuur	2%
5. Product C Schuim	90 g/l benzoëzuur	2%

Bemonstering van het kisthout. Het kisthout werd bemonsterd door van elke plankhelft precies de halve cirkel volledig en onder gelijkmatige druk en beweging af te nemen met een in Ringers + 0.01% Tween 20 gedoopt steriel wattenstaafje (Swab); het wattenstaafje werd vervolgens in 3 ml Ringers + 0.01% Tween 20 gewassen. De wasvloeistof werd onverdund en 100 x verdund uitgeplaat op selectief medium (100 µl per plaat). Het aantal zich ontwikkelende Cms-koloniën per plaat werd geteld en gebruikt voor de beoordeling van de effectiviteit van de ontsmettingsmiddelen.

Resultaten

De resultaten zijn samengevat in figuur 6. Op basis van de ruwe data (uitgedrukt in aantallen kolonievormende units per plaat verkregen na uitplaten van een onverdund en 100X verdund Swab-extract afgenomen van de plankjes) kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

1. De tien-minuten-onderdompeling was zodanig effectief dat bij geen van de middelen op zowel vooraf droog als nat gemaakt hout enige vitale (= kolonievormende) Cms-bacterie werd teruggevonden (geen data meegestuurd want alles nul);
2. De dipbehandelingen gaven een gevarieerd beeld, welke te aanschouwen is in bijgaande figuren (series 1 t/m 3 zijn de **drie herhalingen**; 100x-verdunningen). Te zien is dat
 - a. 2 keer dippen met tussenpoze van 10 minuten bleek effectiever dan 1 keer dippen, maar niet afdoende voor complete afdoding van het Cms-inoculum; alleen voor Product D lijkt een herhaalde dip niet zoveel uit te maken.
 - b. toepassing van de middelen bleek op droog hout effectiever dan toepassing op nat hout, uitgezonderd voor het middel Product D, waar precies het omgekeerde het geval lijkt;
 - c. toepassing van Product C in schuimvorm bleek effectiever dan 1 keer dippen in Product C, namelijk ongeveer zo effectief als twee keer in Product C dippen met tussenpoos van 10 minuten;
 - d. Product D *lijkt* hier, dat wil zeggen in deze proef, het meest effectieve middel te zijn.
3. Dezelfde (controle)behandelingen met water hadden geen (of althans een niet vastgesteld, gering) effect, want de platen bleken allen overgroeid met ontelbaar veel Cms-kolonies (geen data meegestuurd). Dit bevestigt dat er bij de behandelingen daadwerkelijk sprake was van een aan de ontsmettingsmiddelen toe te schrijven effect.



Figuur 6. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de 100 maal verdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na één keer (linkerfiguur) en twee keer (rechterfiguur) dippen in oplossingen van de producten A t/m D, en na behandeling met product C in schuimvorm. De blauwe, rode en groene kolommen presenteren de afzonderlijke drie herhalingen.

De waarneming dat de effectiviteit van de middelen afhankelijk lijkt te zijn van het al dan niet in natte of droge toestand verkeren van het houtoppervlak én dat die afhankelijkheid bij een enkel middel tegengesteld was aan die van andere middelen gaf mij de volgende hypothese in (cumulatief):

- in droge toestand is hout relatief waterafstotend, wat het aanbrengen en dus de werking van het in water opgeloste middel onder kortstondige blootstelling (zoals dippen) doet verminderen;
- voorafgaande bevochtiging van het hout heft dit waterafstotende effect (deels) op;
- een surfactant bevordert het aanbrengen van het middel op en in het hout echter nog beter dan voorafgaande bevochtiging van het hout;
- een verbeterde aanbrenging van het middel op en in het hout geeft een betere ontsmettende werking.

Indien deze hypothese juist is, dan zouden Product A, Product B en Product C WEL een surfactant moeten bevatten, en Product D juist NIET. Aanvullende waarnemingen wezen uit dat inderdaad de Product D-oplossing NIET schuimt (-> geen surfactant aanwezig), terwijl de oplossingen van de eerstgenoemde drie WEL (hevig) schuimen (-> surfactant aanwezig). Druppels aangebracht op parafilm wezen uit dat de contacthoek van Halamid ruwweg overeenkomt met die van water (grote contacthoek, dus geringe benatting), dit in tegenstelling tot die van de eerder genoemde drie (kleine contacthoek, goede benatting). Op droog hout spreiden druppels van deze drie beduidend beter dan druppels water of druppels Product D-oplossing. Alle waarnemingen, kortom, ondersteunen dus de hypothese dat het aanbrengen van het middel via een kortstondige blootstelling (zoals dippen) aanmerkelijk verbeterd kan worden met een surfactant. Niettemin lijkt Product D, dat geen surfactant bevat, toch effectiever dan de overige middelen. Wellicht dat Product D plus surfactant het nog veel beter doet (bijvoorbeeld bij 1 keer dippen).

Dompelen gedurende 10 minuten werkte volledig. Vervolgproeven moeten uitwijzen wat de minimaal benodigde dompeltijd (< 10 minuten) is.

Experiment 3 Blootstellingsduur II

Inleiding

De resultaten van experiment 2 leidden tot de conclusie dat minutenlang dompelen een aanzienlijk betrouwbaarder ontsmettingsmethode is dan een korte dip- of spuitbehandeling. Vastgesteld werd dat een dompeltijd van 10 minuten voor alle vier de geteste middelen in de voorgeschreven concentraties resulteert in volledige ontsmetting van de kunstmatig geïnoculeerde plankjes. Er werd daarom besloten om voor de vier middelen in een labexperiment uit te zoeken wat de minimale dompeltijd dient te zijn voor volledige ontsmetting.

De kans dat het kisthout volledig in contact komt met het ontsmettingsmiddel is naar verwachting groter bij dompeling dan bij afsprit. Wanneer de ontsmettende activiteit ontleend wordt aan de chemische reactie van de actieve component met het doelorganisme, dan zal een nieuwe aanvoer van ontsmettingsmiddel de effectiviteit van de behandeling naar verwachting verbeteren. In het geval van dompeling kan dit bereikt worden door de dompelperiode te verlengen, zodat vanuit de bulkoplossing middels diffusie actieve stof aangevoerd kan worden. Indien het werkingsprincipe van het ontsmettingsmiddel niet gebaseerd is op chemische reactie met het doelorganisme, maar slechts op het creëren van een specifiek fysisch milieu, dan is de aanvoer van reactieve stof niet relevant en volstaat slechts verlenging van de blootstellingsduur.

In Experiment 2 bleek het aantal gemeten cfu's Cms een betrekkelijk ruime variatie te vertonen. Oorzaken hiervan zouden kunnen zijn: (a) het inoculum (aardappelpulp met Cms-culture) was onvoldoende gehomogeniseerd; (b) de hoeveelheid inoculum per set plankhelten vertoonde variatie; (c) de houtstructuur tussen de planksets vertoonde substantiële verschillen. Verklaring (a) lijkt het meest aannemelijk. De homogenisatie van pulp en Cms is daarom grondiger uitgevoerd dan in experiment 2.

Doel

Het doel van Experiment 3 is vast te stellen wat de minimale dompeltijd is voor volledige Cms- ontsmetting van vooraf bevochtigd kisthout voor de vier ontsmettingsmiddelen in hun voorgeschreven toedieningsconcentratie.

Uitvoering

Inoculum. De gebruikte Cms-lijn is de stam IPO 1873 (streptomycine mutant van NCPB 4053), een slijmvormer. Vanaf een agarplaat werd hiervan een geconcentreerde suspensie bereid (ca. 10^9 cfu/ml) die onmiddellijk werd toegevoegd aan vers bereide pulp van **geschilde** aardappelknollen in een volumeverhouding van 1:10 (Cms-suspensie : knolmateriaal). Na homogenisatie werd dit mengsel als inoculum aangebracht op het houtoppervlak.

Kisthout. Uit gangbare aardappelopslagkisten (nieuw) werden plankjes gezaagd (lengte x breedte ca. 9 x 9 cm). Beide kopse kanten worden in het midden en 1 cm uit de kant doorboord (diameter 3 mm). Midden op de plankjes werd met potlood een cirkel getrokken van 6 cm diameter. De plankjes werden dwars op de nerven in twee gelijke helften gezaagd, waarmee tevens de cirkel in twee gelijke helften verdeeld is.

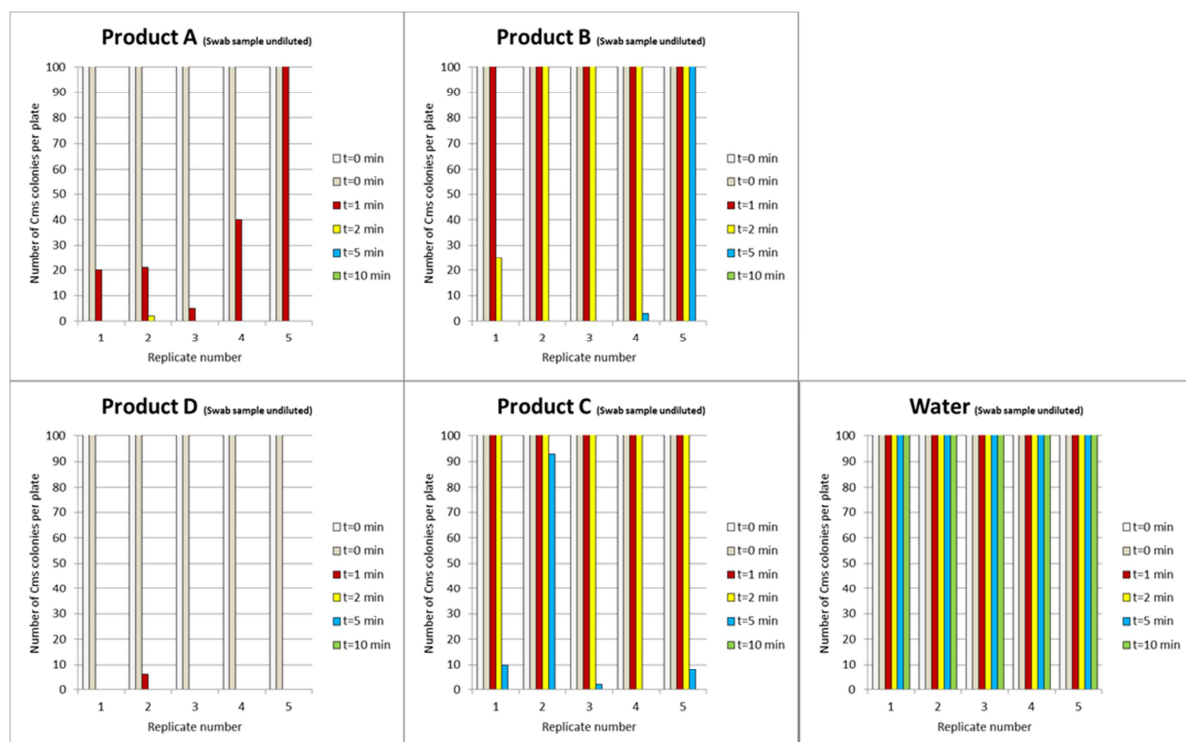
Inoculeren van het kisthout. Per plankje werden beide helften (helft a en helft b) in oorspronkelijke positie stevig tegen elkaar gefixeerd. Vervolgens werd hierop met een lepel homogeen circa 1 gram Cms-inoculum aangebracht zodanig dat de aangebrachte zaagsnede door het midden van de ingesmeerde plekken liep en de potloodcirkel volledig ingesmeerd was. Hierbij bleef een zichtbare laag aardappelmateriaal op de plankjes achter. Door de plankjes uit elkaar te nemen ontstonden paren van besmette plankjes. Het inoculum kreeg ruim de gelegenheid (circa 3 dagen) te drogen aan lucht (kamertemperatuur). Aanname: binnen ieder paar is de houtstructuur en het inoculum nagenoeg gelijk.

Behandeling van het kisthout met ontsmettingsmiddel. Elke plankhelft onderging een onderdompeling van 1, 2, 5 en 10 minuten in één van de vier ontsmettingsmiddelen A t/m D of in water. Direct voorafgaande aan deze onderdompeling werd het hout aan de oppervlakte vochtig gemaakt met een fijne waternevel. Voorafgaande aan de behandelingen werden de plankhelften gewogen. Na dippen en dompelen werd het aanhangend vocht in staat gesteld af te druipen. Vervolgens werden de plankhelften gewogen en te drogen gezet bij kamertemperatuur. Controles zijn (a) geen behandeling, en (b) niet-geïnoculeerd hout onbehandeld (negatieve controle). Elk middel werd getest in de etiketdosering (1%, 0.3%, 2% en 1% (w/v) voor A t/m D respectievelijk). De proef werd uitgevoerd in 5-voud.

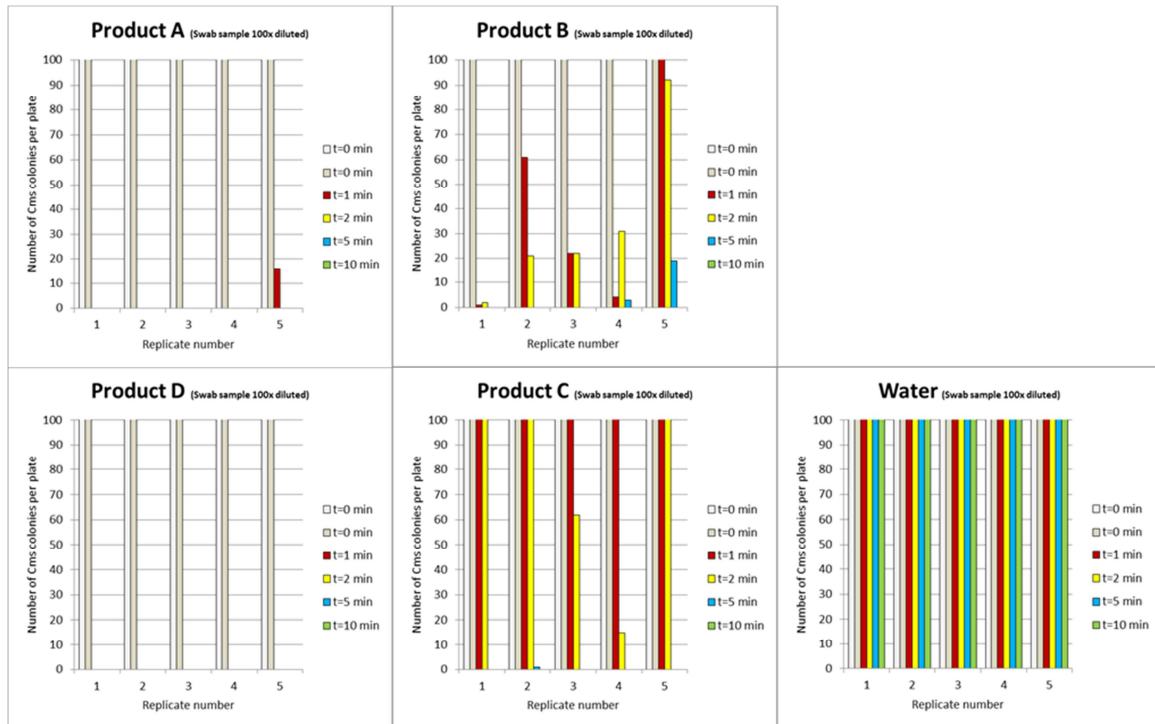
Bemonstering van het kisthout. Het kisthout werd bemonsterd door van elke plankhelft precies de halve cirkel volledig en onder gelijkmatige druk en beweging af te nemen met een in Ringers + 0.01% Tween 20 gedoopt steriel wattenstaafje (Swab); het wattenstaafje wordt vervolgens in 3 ml Ringers + 0.01% Tween 20 gewassen. De wasvloeistof werd onverdund en 100 x verdund uitgeplaat op selectief medium (100 µl per plaat). Het aantal zich ontwikkelende Cms-koloniën per plaat werd geteld en gebruikt voor de beoordeling van de effectiviteit van de ontsmettingsmiddelen.

Resultaten

De aantallen koloniën die geteld werden na uitplaten van de onverdunde en 100 maal verdunde Swab-monsters zijn weergegeven in respectievelijk Figuur 7 en Figuur 8. Volgens verwachting werden met toenemende dompeltijden minder koloniën teruggevonden. Tussen de producten werden substantiële werkingsverschillen waargenomen; voor Product A en product D bleek een dompeltijd van 2 minuten afdoende, terwijl voor Product B en Product C voor het gewenste schone resultaat 10 minuten dompelen nodig was. De controlegroepen lieten zien dat water geen ontsmettende werking had.



Figuur 7. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de onverdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na dompeling in oplossingen van de producten A t/m D en water gedurende 0, 1, 2, 5, en 10 minuten. Op de horizontale as van elke figuur zijn de vijf herhalingen uitgezet ('Replicate number'). De y-as is afgekapt op 100 cfu/plaat, waardoor onzichtbaar is dat kolommen die op 100 cfu/plaat eindigen waarden vertegenwoordigen van > 100 cfu/plaat.



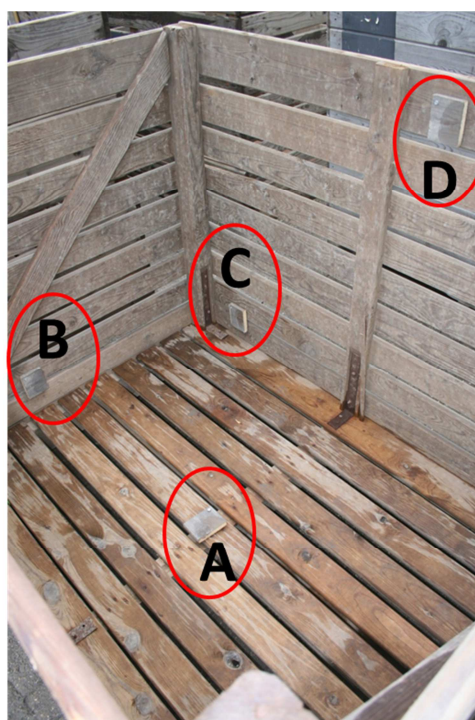
Figuur 8. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de 100 maal verdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na dompeling in oplossingen van de producten A t/m D en water gedurende 0, 1, 2, 5, en 10 minuten. Op de horizontale as van elke figuur zijn de vijf herhalingen uitgezet ('Replicate number'). De y-as is afgekapt op 100 cfu/plaat, waardoor onzichtbaar is dat kolommen die op 100 cfu/plaat eindigen waarden vertegenwoordigen van > 100 cfu/plaat.

Experiment 4 Toediening van ontsmettingsmiddelen door kistenreinigingsmachine

Inleiding

In experiment 3 is voor de vier middelen onderzocht wat de minimale dompeltijd dient te zijn voor volledige ontsmetting. Hierbij werden vijf dompeltijden gehanteerd, namelijk 0 minuten (onbehandeld), 1 minuut, 2 minuten, 5 minuten en 10 minuten. Dit bracht substantiële werkingsverschillen tussen de vier middelen aan het licht. Voor Product A en Product D bleek een dompeltijd van 2 minuten afdoende, terwijl voor Product B en Product C voor het gewenste schone resultaat 10 minuten dompelen nodig was. Daarom is besloten om in experiment 4 slechts door te gaan met de twee middelen die als beste uit de bus kwamen zodat ruimte ontstaat om in plaats van één, twee behandelingstijden toe te passen. Experiment 4, uit te voeren in 3-voud, behelst aldus:

1. Te testen middelen: Product A en Product D;
2. Te testen behandelzeiten: 2 minuten en 5 minuten;
3. Dosering: de aanbevolen etiketdosering, zijnde 1%;
4. Behandelmethod: douchen onder praktijkomstandigheden;
5. Plankposities: A. midden op de bodem; B. onder in de hoek onder de diagonale steunplank; C onder in de hoek naast de verticale hoekbalk; D. bovenin het midden (zie figuur 1 voor posities A t/m D).
6. Parallel dompelexperiment op het lab: om een betrouwbare vergelijking met dompelen te kunnen maken wordt parallel aan deze praktijkdouchebehandeling een dompelbehandeling uitgevoerd op het lab met plankjes die gelijktijdig met hetzelfde Cms/aardappel-materiaal zijn geïnoculeerd.



Doel

Experiment 3 wees voor Product A en Product D uit dat voor een volledige Cms-ontsmetting van kisthout een dompeltijd van ca. 2 minuten nodig is. In de praktijk krijgen kisten veelal een douchebehandeling in plaats van dompelbehandeling. In dit experiment werd nagegaan of deze minimale behandelduur hetzelfde volledige ontsmettingseffect bewerkstelligt wanneer in plaats van dompelen de gangbare praktijkbehandeling van douchen wordt toegepast. Het primaire doel is dus een vergelijking te verkrijgen tussen dompelen en douchen. Anticiperend op een lagere ontsmettingsefficiëntie met douchen werd ook een behandelzeit van 5 minuten toegepast. Daarnaast moest de proef aan het licht brengen of de effectiviteit van de douchebehandeling op verschillende posities binnen de kist variatie vertoont. Tenslotte geeft de proef additionele informatie over verschillen in effectiviteit tussen Product A en Product D.

Uitvoering

Dit experiment betreft het toetsen van de effectiviteit van drie douchebehandelingen met 1% Product A, 1% Product D, en water, uitgevoerd met een gangbare kistenreinigingsmachine. Hiertoe werden de geïnoculeerde plankjes op vier verschillende posities aan de binnenzijde van aardappelopslagkisten geschroefd (zie foto). De kisten doorliepen vervolgens het reinigingstraject door de reinigingsmachine. Ter vergelijking is parallel aan

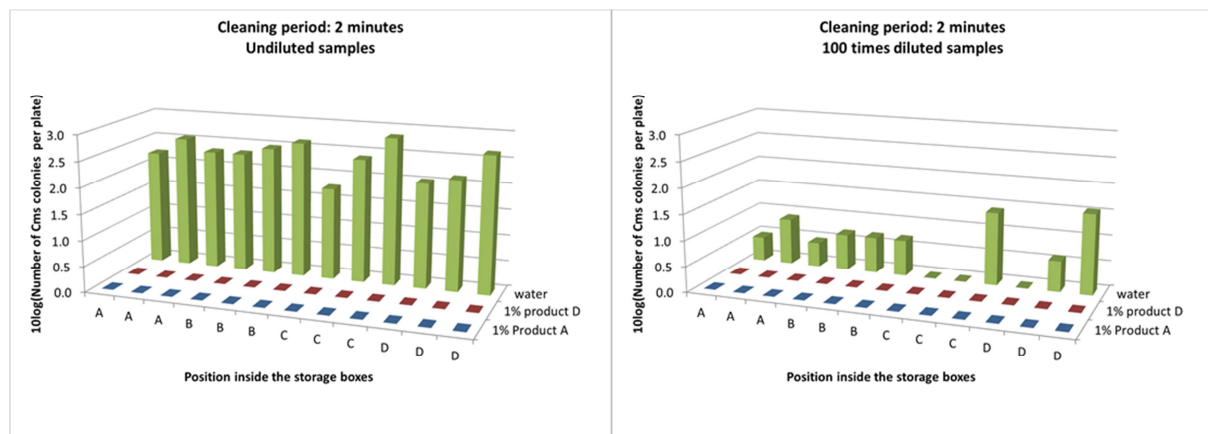
deze praktijkproef met hetzelfde Cms-inoculum op identiek plankmateriaal in het laboratorium een dompelproef uitgevoerd (op de wijze van experiment 3). Direct voorafgaande aan de douche- en dompelbehandelingen werd het houtoppervlak vochtig gemaakt met een fijne waternevel. De behandeltijden waren in beide proeven 2 minuten en 5 minuten. Controlegroepen bestonden uit plankjes met en zonder inoculum die onbehandeld bleven. Een deel van deze controlegroepjes maakten het transport mee naar en van de praktijklocatie. Zowel de praktijkproef als de dompelproef zijn in 3-voud uitgevoerd. Een week na de behandelingen werd het volledige standaard-oppervlakte dat voorzien was met inoculum met een wattenstaafje grondig afgenomen. Het afgenomen materiaal werd overgebracht naar 10 ml Ringers-oplossing. Deze monsters werden onverdund en 100 x verdund uitgeplaat. Na 1-2 weken incuberen werden de platen beoordeeld en de Cms-kolonies geteld.

Resultaten

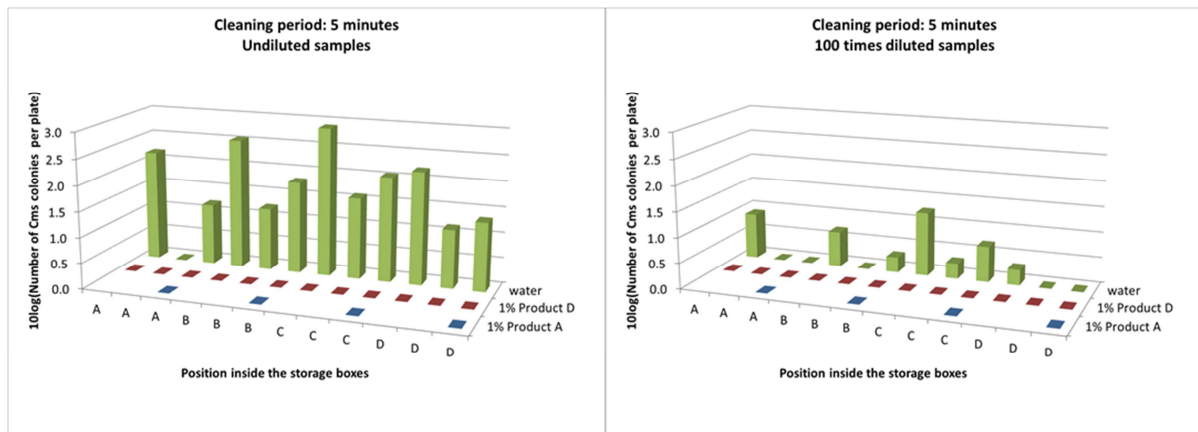
In de (onbehandelde) niet-geïnoculeerde controle-groepen werd zoals verwacht geen Cms aangetroffen. In de onbehandelde geïnoculeerde controle-groepen werden zoals verwacht zeer hoge aantallen Cms aangetroffen. Het vervoer naar en van de praktijklocatie had geen negatief effect op de vitaliteit van Cms.

Het inoculum bestond uit een pulp van geschilde aardappel met een zeer hoge concentratie Cms die op plaat opgekweekt was. Dit inoculum zorgde na indrogen voor een zichtbaar laagje biologisch materiaal (voornamelijk zetmeel) dat zich op het plankoppervlak bevond. Opvallend was dat dit laagje verdwenen was van de plankjes die de douche-behandeling ondergaan hadden (zowel 2 als 5 minuten); de plankjes die op het lab de dompelbehandeling hadden gekregen vertoonden dit laagje wel. De douchebehandeling zorgt dus voor een nagenoeg volledige verwijdering van het aangebrachte aardappelmateriaal.

De douchebehandelingen met water en met 1% Product D verliepen probleemloos. Douchen met 1% Product A was problematisch omdat er enorme schuimvorming optrad. Bij de 2 minuten behandeling van de eerste twee kisten bleek de kop niet meer te spuiten, mogelijk omdat alles schuim was geworden. Er werd besloten om Product A rechtstreeks uit de IBC te pompen. Op deze wijze werden drie kisten 2 minuten behandeld en 1 kist 5 minuten. Hierdoor is niet rondgepompt om een goede verdeling van de concentratie te krijgen.



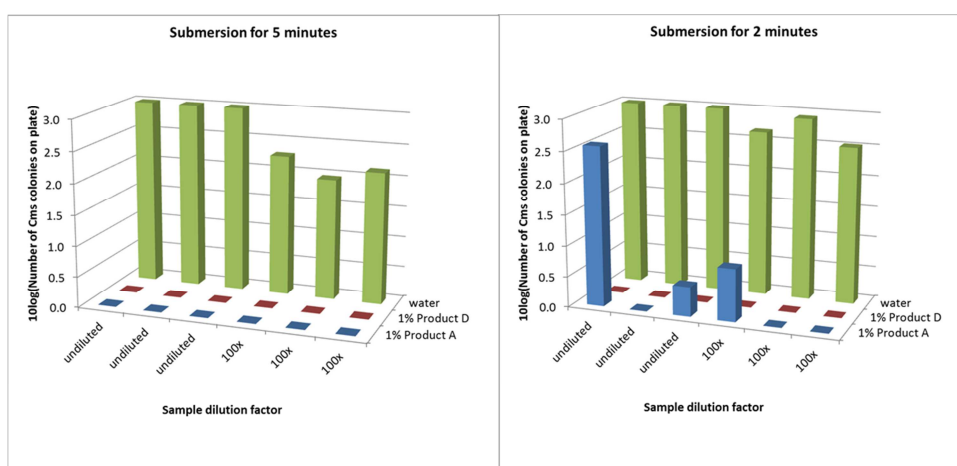
Figuur 9. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de onverdunde (linkerfiguur) en 100 maal verdunde (rechterfiguur) monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na douchen met oplossingen van de producten A en D en water in de kistenreinigingsmachine gedurende 2 minuten. Op de horizontale as van elke figuur zijn de drie herhalingen van elk van de vier posities in de opslagkist uitgezet.



Figuur 10. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de onverdunde (linkerfiguur) en 100 maal verdunde (rechterfiguur) monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na douchen met oplossingen van de producten A en D en water in de kistenreinigingsmachine gedurende 5 minuten. Op de horizontale as van elke figuur zijn de drie herhalingen van elk van de vier posities in de opslagkist uitgezet.

De resultaten van de praktijkproef zijn samengevat in Figuur 9 en Figuur 10. Een douchebehandeling van twee minuten met water bleek ontoereikend voor ontsmetting van de plankjes; dezelfde behandeling gedurende 5 minuten gaf nauwelijks een beter resultaat. Zowel na de behandeling van 5 minuten als de kortere behandeling van 2 minuten met 1% product D en met 1% Product A werd géén Cms meer teruggevonden op het hout. Dit gold voor alle posities A, B, C en D in de kisten.

De resultaten van de onderdompelingsproef komen min of meer overeen met hetgeen in experiment 3 gevonden werd. Figuur 11 toont de waarnemingen. Voor onderdompeling met 1% Product A is een dompelingstijd van 2 minuten onvoldoende; bij de dompelingstijd van 5 minuten werd geen Cms meer teruggevonden. Bij dompeling met 1% Product D was 2 minuten al toereikend om geen Cms meer terug te vinden. Zowel de dompelproef als de douche-proef zijn tegelijkertijd met dezelfde materialen en hetzelfde inoculum en dezelfde detectie-procedure uitgevoerd. De resultaten met Product A suggereren dat de douche-behandeling effectiever is dan de dompelbehandeling.



Figuur 11. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de 100 maal verdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na dompeling in oplossingen van de producten A en D en water gedurende 5 (linkerfiguur) en 2 minuten (rechterfiguur). Op de horizontale as van elke figuur zijn de drie herhalingen voor de onverdunde en 100 maal verdunde monsters uitgezet.

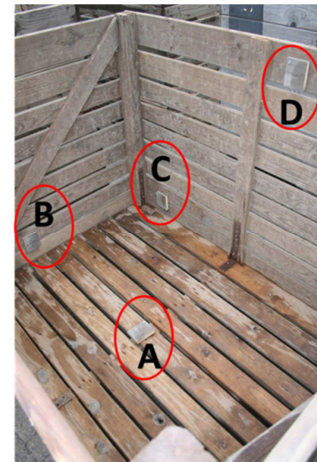
Conclusie

1. De reinigingsmachine verwijdert binnen twee minuten het aangebrachte, ingedroogde aardappelmateriaal tot een voor het oog schoon houtoppervlak. Daarentegen blijft dit ingedroogde materiaal bij alle dompelbehandelingen op het hout zitten.
2. Behandeling met water is evident onvoldoende; gebruik van ontsmettingsmiddel is noodzakelijk.
3. De resultaten van twee minuten dompelen bevestigt de in experiment 3 verkregen indruk dat Product D effectiever is dan Product A.
4. Dompelen bleek minder effectief dan behandeling in de reinigingsmachine; het hierboven onder punt 1 genoemde afspoeffect speelt hierbij wellicht een belangrijke rol.
5. Douchen met 1% Product A leverde technische problemen op (schuimvorming in de machine). Product D gaf wat dat betreft geen problemen.
6. Zowel een behandelingstijd van 2 minuten als van 5 minuten in de reinigingsmachine leverden met 1% Product D plankjes op waarin met de gebruikte detectie-methode in alle gevallen 0 (zegge: nul) Cms werd teruggevonden. Hetzelfde was het geval met 1% Product A, waarbij opgemerkt dient te worden dat de toedieningsprocedure noodgedwongen gebrekkig was (niet rondgepompt).
7. De positie van de plankjes in de kist (A, B, C en D) had geen invloed op de effectiviteit van de behandeling.

Experiment 5 Toediening van Product D door kistenreinigingsmachine

Inleiding

In Experiment 4 zijn machinale douchebehandelingen van 2 en van 5 minuten uitgevoerd met 1% Product A, met 1% Product D en met water (controle) op plankjes met Cms-inoculum die op vier verschillende posities in de kisten gemonteerd waren (zie voor de posities de foto hiernaast). Ter vergelijking werden parallelle dompelbehandelingen op het lab uitgevoerd. Belangrijk was de vaststelling dat douchen met 1% Product A technische problemen opleverde (schuimvorming in de machine) en dat Product D wat dat betreft geen problemen gaf. Daarom werd voor experiment 5 voorgesteld om Product A verder buiten beschouwing te laten en uitsluitend door te gaan met het uitgebreider testen van machinale douche-behandeling met Product D. Zowel 2 minuten als 5 minuten douchen met Product D bleek in alle gevallen zodanig effectief dat met de gebruikte swab- en uitplaatmethode geen Cms werd teruggevonden. De afspraak was om de proef bij gebleken goede werkzaamheid te herhalen. Dat is hier dus het geval voor 2 en 5 minuten douchen met 1 % Product D. Daarnaast ligt het voor de hand om te onderzoeken of ook kortere behandeltijden afdoende zijn, zoals 1 minuut en 0.5 minuut douchen met 1 % Product D. Daarom werd Experiment 5 aldus in 3-voud opgezet:



1. Te testen middelen: Product D (en water als controle-middel);
2. Te testen behandeltijden: 0.5, 1, 2 en 5 minuten;
3. Dosering: de aanbevolen etiketdosering (zijnde 1%);
4. Behandelmethode: douchen onder praktijkomstandigheden;
5. Plankposities: A. midden op de bodem; B. onder in de hoek onder de diagonale steunplank; C onder in de hoek naast de verticale hoekbalk; D. bovenin het midden (A t/m D).
6. Parallel domelexperiment op het lab: om een betrouwbare vergelijking met dompelen te kunnen maken wordt parallel aan deze praktijkdouche-behandeling een dompelbehandeling uitgevoerd op het lab met plankjes die gelijktijdig met hetzelfde Cms/aardappel-materiaal zijn geïnoculeerd.

Uitvoering

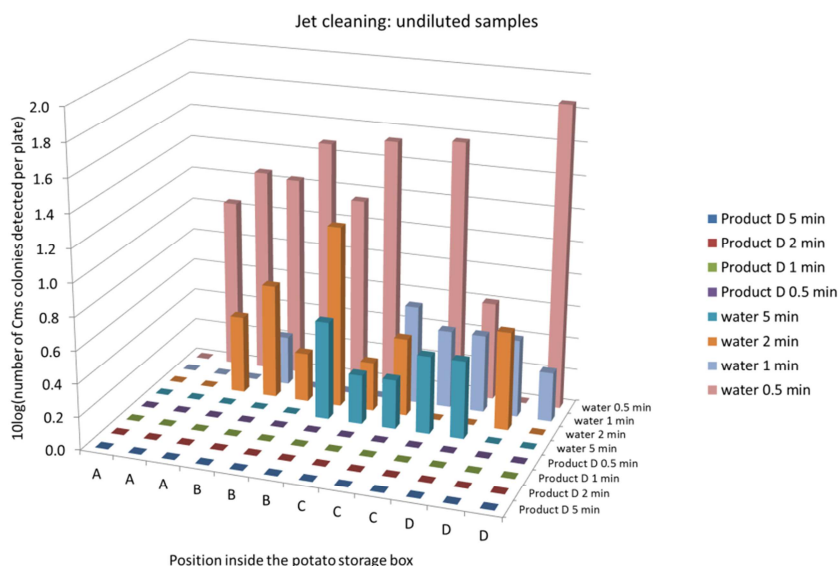
Experiment 5 betrof het toetsen van de effectiviteit van twee douchebehandelingen, namelijk met 1% product D en met water (controle-behandeling), uitgevoerd met een gangbare kistenreinigingsmachine. Hiertoe werden geïnoculeerde plankjes op vier verschillende posities aan de binnenzijde van aardappelopslagkisten geschroefd (zie foto). De kisten doorliepen vervolgens het reinigingstraject door de reinigingsmachine. Ter vergelijking is parallel aan deze praktijkproef met hetzelfde Cms-inoculum op identiek plankmateriaal in het laboratorium een dompelproef uitgevoerd (op de wijze van experiment 3). Direct voorafgaande aan de douche- en dompelbehandelingen werd het houtoppervlak vochtig gemaakt met een fijne waternevel. De behandeltijden waren in beide proeven 2 minuten en 5 minuten, precies zoals in experiment 4. Nieuw ten opzichte van proef 4 waren de additionele behandeltijden van 0.5 minuut en 1 minuut. Controlegroepen bestonden uit plankjes met en zonder inoculum die onbehandeld bleven. Een deel van deze controlegroepjes maakten het transport mee naar en van de praktijklocatie. Zowel de praktijkproef als de dompelproef zijn in 3-voud uitgevoerd. Een kleine week (6 dagen) na de behandelingen werd het volledige standaard-oppervlakte dat voorzien was met inoculum met een wattenstaafje grondig afgenomen. Het afgenomen materiaal werd overgebracht naar 3 ml Ringers-oplossing. Deze monsters werden onverdund en 100 x verdund uitgeplaat. Na 1-3 weken incuberen werden de platen beoordeeld en de Cms-kolonies geteld.

Resultaten

In de (onbehandelde) niet-geïnoculeerde controle-groepen werd zoals verwacht geen Cms aangetroffen. In de onbehandelde geïnoculeerde controle-groepen werden zoals verwacht zeer hoge aantallen Cms aangetroffen ($^{10}\log[\#Cms]_{\text{onverdund}}$ gemiddeld 3.27). Het vervoer naar en van de praktijklocatie had geen negatief effect op de vitaliteit van Cms ($^{10}\log[\#Cms]_{\text{onverdund}}$ gemiddeld 3.46).

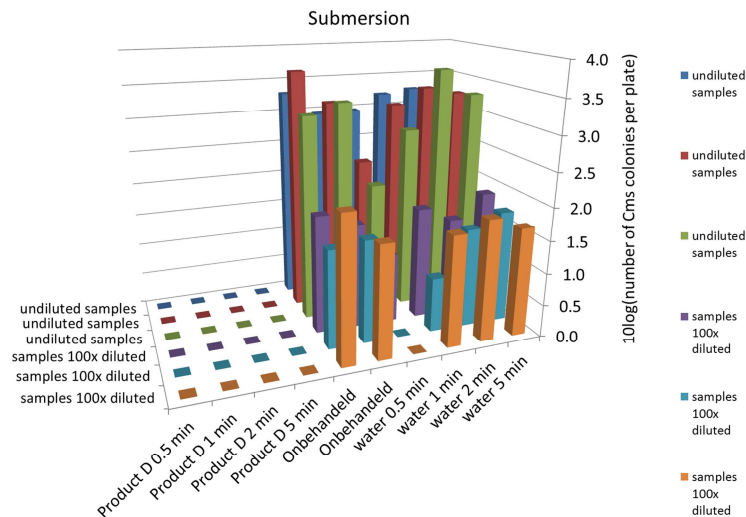
Het inoculum bestond uit een pulp van geschilde aardappel met een zeer hoge concentratie Cms die op plaat opgekweekt was. Dit inoculum zorgde na indrogen voor een zichtbaar laagje biologisch materiaal (voornamelijk zetmeel) dat zich op het plankoppervlak bevond. Opvallend was dat dit laagje verdwenen was van de plankjes die de douche-behandeling ondergaan hadden (zowel 0.5, als 1, als 2 en als 5 minuten behandeltdtijd); de plankjes die op het lab de dompelbehandeling hadden gekregen vertoonden dit laagje wel. De douchebehandeling zorgt dus voor een nagenoeg volledige verwijdering van het aangebrachte aardappelmateriaal. Eerder was dit al in experiment 4 voor 2 en 5 minuten behandeltdtijd gevonden; nu blijkt dit dus ook voor 0.5 en 1 minuut behandelen het geval te zijn.

De resultaten van de praktijkproef zijn samengevat in de Figuur 12 die de aantallen Cms-kolonies toont na uitplaten van de onverdunde monsters (de resultaten van de 100x-verdunningen worden niet getoond want betreffen slechts enkele sporadische kolonies verkregen uit de waterbehandelde plankjes). De douchebehandelingen met water bleken ontoereikend voor ontsmetting van de plankjes. Toch leidden deze waterbehandelingen met de verwijdering van het zetmeellaagje tot een aanzienlijke reductie van het aantal aanwezige Cms-kolonies van ongeveer 100 keer minder Cms ten opzichte van de onbehandelde controle-plankjes ($^{10}\log[\#Cms]_{\text{onverdund}}$ gemiddeld 3.46). De behandeltdtijd speelde hierbij logischerwijze een rol: 5 minuten douchen gaf een beter resultaat dan 0.5 minuten douchen. Tevens lijkt de positie van de plankjes er toe te doen: plankjes op positie A lijken beter van Cms ontdaan dan plankjes op posities B en C (en D). Alle behandelingen met 1 % Product D lieten ongeacht de behandeltdtijden geen enkele detecteerbare Cms achter. Dit experiment bevestigt dus de waarneming uit experiment 4 dat 2 minuten en 5 minuten douchen met 1% Product D tot het gewenste resultaat leidt, en duidt erop dat 0.5 en 1 minuut douchen ook voldoende kan zijn (zie discussie hieronder).



Figuur 12. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de onverdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na douchen met oplossingen van Product D en water in de kistenreinigingsmachine gedurende 5 minuten. Op de horizontale as zijn de drie herhalingen van elk van de vier posities in de opslagkast uitgezet.

In experiment 4 bleek 2 minuten onderdompelen in 1% Product D voldoende om geen Cms meer terug te kunnen vinden. Hetzelfde vinden we in dit experiment, zoals onderstaande figuur toont voor de onverdunde en 100x verdunde Cms-monsters. Dezelfde figuur laat tevens zien dat ook 1 minuut en zelfs 0.5 minuut onderdompelen in 1% Product D afdoende was. Onderdompeling in water gedurende 0.5 tot 5 minuten geeft nagenoeg geen afname in Cms-aantallen te zien ten opzichte van de onbehandelde controle (zie figuur 13).



Figuur 13. Aantallen koloniën die zich ontwikkelden uit de onverdunde en de 100 maal verdunde monsters verkregen van het houtoppervlakte een week na dompeling in oplossingen van Product D en water gedurende 0.5, 1, 2 en 5 minuten. Op de horizontale as zijn de drie herhalingen voor de onverdunde en 100 maal verdunde monsters uitgezet.

Conclusie

1. De reinigingsmachine verwijdert binnen 0.5 minuut het aangebrachte, ingedroogde aardappelmateriaal tot een voor het oog schoon houtoppervlak. Daarentegen blijft dit ingedroogde materiaal bij alle dompelbehandelingen op het hout zitten.
2. Behandeling met water is evident onvoldoende; gebruik van ontsmettingsmiddel is noodzakelijk.
3. Dompelen bleek extreem minder effectief dan behandeling in de reinigingsmachine; het hierboven onder punt 1 genoemde afspoeffect speelt hierbij wellicht een belangrijke rol.
4. Zowel een behandelingstijd van 0.5 minuten als van 1, van 2 en van 5 minuten in de reinigingsmachine leverden met 1% Product D plankjes op waarin met de gebruikte detectie-methode in alle gevallen 0 (zegge: nul) Cms werd teruggevonden.
5. De positie van de plankjes in de kist (A, B, C en D) had geen invloed op de effectiviteit van de behandeling met Product D. De resultaten verkregen met de waterbehandelingen duiden erop dat positie A iets beter wordt schoongewassen dan de overige posities.

Experiment 6 De gevoeligheid van natuurlijk besmet knolmateriaal voor dompeling in Product D; vergelijking met de gevoeligheid van het artificiële inoculum

Inleiding

De ontsmettende werking van de verschillende producten zijn in Experiment 1 t/m 5 getest op plankjes waarop zich opgedroogd, artificieel inoculum bevond. Dat artificiële inoculum was bereid door pulp van gezond aardappelknolweefsel te homogeniseren met zeer hoge aantallen van een antibioticum-resistente Cms-stam die op agar was opgekweekt. Dit roept de vraag op hoe representatief dit kunstmatig inoculum is voor de in de praktijk voorkomende kistverontreinigingen welke uit natuurlijk besmet knolmateriaal bestaan. Met name de slijmerige rottingsmatrix waarin Cms doorgaans onder praktijkomstandigheden verkeert, zou een belemmering kunnen vormen voor chemische ontsmetting. Op basis van de resultaten uit experimenten 4 en 5 kan verwacht worden dat mechanische verwijdering zoals die tijdens machinale reiniging plaats vindt, ook bij natuurlijk besmet knolmateriaal een substantiële bijdrage voor kistontsmetting zal leveren. Maar op plaatsen die buiten het bereik van de douchestrallen van de reinigingsmachine liggen, ontbreekt deze bijdrage; hier hangt ontsmetting af van het loutere contact met de ontsmettingsoplossing zoals dat in de dompelingsexperimenten geschiedt. Met dit experiment is geprobeerd inzicht te krijgen in de gevoeligheid van natuurlijk besmet knolmateriaal voor dompeling in Product D.

Uitvoering

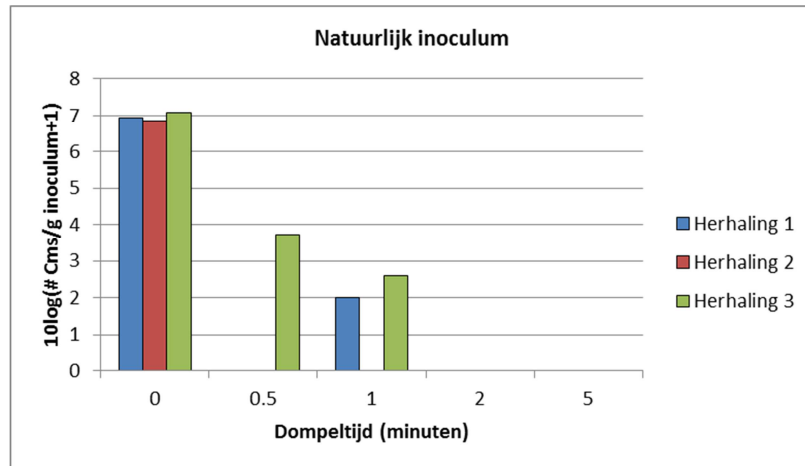
Met een lepeltje werd uit natuurlijk besmette knollen door Cms geïnfecteerd weefsel in en om de vaatbundelring verwijderd (zie de foto's hiernaast). Dit materiaal werd na toevoeging van water gehomogeniseerd (1:10 water/knolweefsel). Deze pulp werd beschouwd als natuurlijk inoculum. Daarnaast werd met de antibioticum-resistente Cms-stam en gezond knolweefsel artificieel inoculum bereid zoals in experimenten 1 t/m 5 gedaan was. Met beide inocula werden op de wijze zoals in experimenten 1 t/m 5 plankjes geïnoculeerd. Na drie dagen werd een dompelingsproef uitgevoerd zoals in experiment 3, met dompelingstijden van 0, 0.5, 1, 2 en 5 minuten. Belangrijk verschil met experiment 3 was dat de plankjes voorafgaande aan de dompeling niet bevochtigd werden; uit experiment 2 was gebleken dat dit voor Product D de *worst case* situatie is. Een week na dompelen werden de geïnoculeerde plankoppervlaktes bemonsterd (swab). Het afgenomen materiaal werd overgebracht naar 3 ml Ringers-oplossing. Deze monsters werden onverdund en 100 x verdund uitgeplaat. De monsters verkregen uit natuurlijk besmette knollen werden ook in 1000x-verdunding uitgeplaat. Het materiaal afkomstig van de natuurlijke knollen werd uitgeplaat op medium zonder antibioticum, terwijl het materiaal dat afkomstig was van de antibioticumresistente Cms-stam zoals gebruikelijk op medium met antibioticum werd uitgeplaat. Gedurende 1-3 weken hierna werden de platen beoordeeld en de Cms-kolonies geteld. Kolonies waarvan over de identiteit middels visuele beoordeling geen eenduidigheid verkregen kon worden werden met Taqman-PCR geïdentificeerd. Het experiment is in drievoud uitgevoerd.



Resultaten

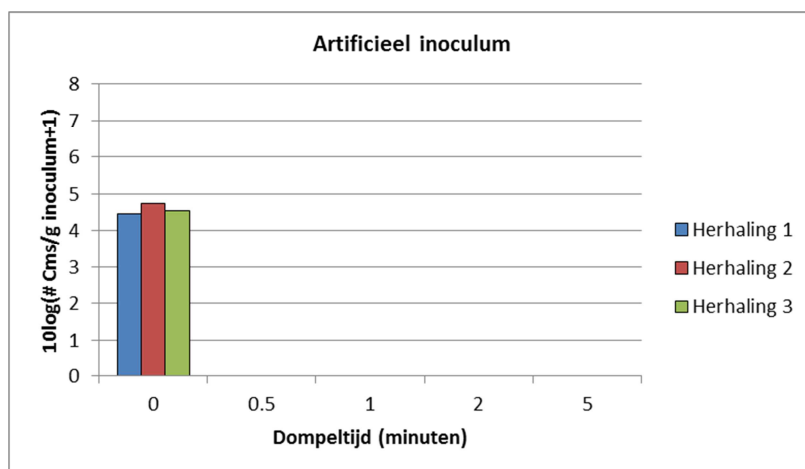
Het natuurlijk inoculum bleek zeer hoge aantallen Cms te bevatten (onbehandeld natuurlijk inoculum bevatte na afloop van het experiment ca 10^6 - 10^7 cfu per g knolmateriaal). Het artificieel inoculum bevatte substantieel minder Cms (onbehandeld artificieel inoculum bevatte na afloop van het experiment ca 10^4 - 10^5 cfu per gram knolmateriaal). Figuur 14 toont voor het natuurlijke inoculum de gedetecteerde aantallen Cms per gram knolmateriaal als functie van de dompeltijd in 1% Product D. De kortste dompeltijd van 0.5 minuten had een

sterk ontsmettend effect, want bij slechts één van de drie herhalingen werd Cms waargenomen (namelijk 136 kolonies na uitplaten van het onverdunde swab-monster). Dompeling gedurende 1 minuut reduceerde de Cms-aantallen nog verder, maar niet tot nul (namelijk tot 2, 0 en 4 kolonies na uitplaten van het onverdunde swab-monster). Na 2 en 5 minuten dompelen in 1% Product D bleken de plankjes in alle herhalingen volledig vrij van Cms te zijn.



Figuur 14. Aantallen Cms (in logaritmische schaal uitgedrukt per gram knolmateriaal) teruggevonden in natuurlijk inoculum als functie van de dompeltijd in 1% Product D.

Voor het artificieel bereide inoculum bleek een dompeltijd van 0.5 minuut al afdoende te zijn (zie figuur 15), wat overeen komt met hetgeen in experiment 5 werd waargenomen. Omdat het natuurlijke inoculum ca. 100 maal meer cfu's per gram knolmateriaal bevatte dan het artificieel bereide inoculum is het op basis van deze resultaten niet mogelijk om uitspraken te doen over eventuele verschillen tussen het natuurlijk inoculum en het artificiële inoculum in gevoeligheid voor Product D. Het inzicht dat 2 minuten dompelen voldoende bleek voor doding van extreem zware natuurlijke Cms-besmettingen duidt op de bruikbaarheid van Product D voor praktijktoepassingen.



Figuur 15. Aantallen Cms (in logaritmische schaal uitgedrukt per gram knolmateriaal) teruggevonden in artificieel bereid inoculum als functie van de dompeltijd in 1% Product D.

Bijlage: Verklaring productcodes

Product	Merknaam	werkzame stof	dosering
Product A	Virkon S	45,3% pentakalium bis(peroxymonosulfaat)bis(sulfaat)	1%
Product B	Bardac 22	450 g/l N,N-didecyldimethylammoniumchloride	0,30%
Product D	Halamid-d	81% natrium-p-tolueensulfonchloramide	1%
Product C	Mennoclean	90 g/l benzoëzuur	2%
Product C Schuim	Mennoclean schuim	90 g/l benzoëzuur	2%