

Onderzoek naar de effectiviteit van chloordioxide voor het schoonhouden van watergeefsystemen (fase 1)

DLV Plant

Postbus 7001

6700 CA Wageningen

Agro Business Park 65

6708 PV Wageningen

T 0317 49 15 78

F 0317 46 04 00

E info@dlvplant.nl

www.dlvplant.nl

Gefinancierd door:

Productschap Tuinbouw
Postbus 280
2700 AG Zoetermeer

In opdracht van:

Landelijke Komkommer commissie LTO Groeiservice

Uitgevoerd door:

Harrie Koenraadt, Naktuinbouw, Roelofarendsveen
Helma Verberkt, DLV Plant, Wageningen



In samenwerking met en mede financiering van: ProMInent Verder te Vleuten

ProMInent[®]

PT-projectnr : 12697

Interne rapportage, niet bestemd voor publicatie

Dit document is auteursrechtelijk beschermd. Niets uit deze uitgave mag derhalve worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch door fotokopieën, opnamen of op enige andere wijze, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLV Plant. De merkrechten op de benaming DLV komen toe aan DLV Plant B.V.. Alle rechten dienaangaande worden voorbehouden. DLV Plant B.V. is niet aansprakelijk voor schade bij toepassing of gebruik van gegevens uit deze uitgave.

LTO  Groeiservice

Productschap  Tuinbouw

Inhoudsopgave

Samenvatting	4
1 Inleiding en doel	6
1.1 Inleiding	6
1.2 Doelstelling	7
2 Projectplan	8
3 Effect van 2 ppm ClO₂ op de infectieusiteit van CGMMV	10
3.1 Inleiding	10
3.2 Materiaal en methode	10
3.3 Resultaten	11
3.4 Discussie	12
4 Effect van 5 ppm ClO₂ op infectieusiteit van CGMMV	13
4.1 Inleiding	13
4.2 Materiaal en methode	13
4.3 Resultaten	13
4.4 Discussie en conclusie	15
5 Monitoring concentratie ClO₂	16
5.1 Inleiding	16
5.2 Materiaal en methode	16
5.3 Resultaten	17
5.4 Discussie en Conclusie	21
6 Effect van ClO₂ op de infectieusiteit van CGMMV	22
6.1 Inleiding	22
6.2 Materiaal en methode	22

6.3	Resultaten	23
6.4	Discussie	25
6.5	Conclusie	26
7	Conclusies en aanbevelingen	27

Samenvatting

Het Komkommerbontvirus (= CGMMV = Cucumber green mottle mosaic virus) teistert al jaren de Nederlandse Komkommerteelt. De eerste ziekteverschijnselen zijn zichtbaar op de jonge bladeren, die dan vlak bij de groeipunten licht- en donkergroen gevlekt zijn. Naast vlakke, lichtgroene gedeelten hebben deze bladeren donkergroene bobbels. Als het blad uitgroeit ontstaat een vlekkerig patroon. Vruchten kunnen ook zwakke mozaïekverschijnselen vertonen. Uiteindelijk kan het gewas als gevolg van het Komkommerbontvirus geheel afsterven. Komkommerbontvirus is een zaadoverdraagbaar virus. Virus kan via onvoldoende ontsmet zaad geïntroduceerd worden maar er zijn talloze alternatieve inoculumbronnen (besmet fust, kleding, handen, etc) die een rol kunnen spelen bij de primaire besmetting. Komkommerbontvirus is namelijk een zeer stabiel virus wat via mechanische transmissie zich snel door teelten kan verspreiden. Naast verspreiding door teelthandelingen wordt het virus ook verspreid via het watergeefstelsysteem (mechanisch).

Doelstelling van het project is na gaan middels onderzoek of het schoonhouden van het watergeefstelsysteem tijdens de teelt de verspreiding van ziekten en plagen kan tegen gaan. In dit project wordt dit gedaan aan de hand van het Komkommerbontvirus in het watergeefstelsysteem. Binnen fase 1 zijn in totaal 4 laboratorium proeven uitgevoerd. Het Komkommerbontvirus kan via zaad en mechanisch (o.a. via het water) worden overgebracht. Het water is een belangrijke bron voor de verspreiding. Het testen in laboratoriumomstandigheden of het virus zich wel of niet beter verspreidt in een schoon watergeefstelsysteem is niet mogelijk. Het onderzoek zal daarom via toetsplanten worden uitgevoerd.

In een tweetal experimenten werd nagegaan of een chloordioxide (ClO_2) ontsmetting van CGMMV besmet extract mogelijk was. In het eerste experiment werd 2 ppm ClO_2 gebruikt voor de ontsmetting. Er bleek in dit experiment geen duidelijk effect van ClO_2 te zijn. Om die reden werd er in het tweede experiment een hogere ClO_2 concentratie (5 ppm) gebruikt. In het tweede experiment werd er opnieuw geen duidelijk positief effect van de ClO_2 behandeling gemeten. De meest logische verklaring voor het achterwege blijven van een effect is dat er te veel organisch plantenmateriaal in het extract aanwezig was waardoor er onvoldoende ClO_2 beschikbaar was voor afbraak van het virus. In een aanvullend experiment waarin de hoeveelheid beschikbaar ClO_2 gemeten is, is nagegaan of deze hypothese klopt.

Uit het derde experiment bleek een groot verschil te zijn in ClO_2 afbraaksnelheid wanneer er extractiebuffer met en zonder PVP (polyvinylpyrrolidone is een polymeer en is een standaard ingrediënt van de extractiebuffer) werd gebruikt. Toevoeging van PVP zorgt voor een versnelde afbraak van ClO_2 waardoor de ontsmetting voorheen niet efficiënt kon gebeuren. In zowel bladextract in 0,05 M PBS als fosfaatbuffer met PVP neemt de concentratie ClO_2 namelijk zeer snel af.

In de aanvullende experimenten is duidelijk geworden dat er door een overmaat aan PVP en organisch plantenmateriaal er onvoldoende ClO_2 aanwezig was voor afbraak van CGMMV in de eerste twee proeven. De potentie van met ClO_2 werd vervolgens in een

aanvullend experiment bevestigd waarbij er geen overleving was van *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, een bacterie die zwartnervigheid in kool veroorzaakt, na korte blootstelling aan PBS met ClO_2 . De verschillende experimenten maken duidelijk dat monitoring van ClO_2 tijdens de ontsmetting absoluut noodzakelijk is. Wanneer er onverwacht snelle afbraak plaats vindt zal er namelijk geen ontsmettingseffect waarneembaar zijn.

Uit het vierde experiment bleek dat inactivering van CGMMV door ClO_2 goed mogelijk was bij hoge inoculum verdunning. Het bleek echter wel dat complete afbraak van CGMMV door ClO_2 in relatief zwaar besmette lagere verdunningen niet mogelijk was. Het is bekend dat tobamovirussen, waaronder TMV, ToMV en CGMMV, zeer stabiele virussen zijn en gedurende lange tijd infectieus kunnen blijven. In het experiment bleek CGMMV zelfs na een relatief lange blootstelling (5 minuten) aan een hoge concentratie ClO_2 (zelfs rond 10 ppm) nog infectieus te zijn. Hierbij is het duidelijk dat er een concentratie effect aanwezig was omdat 10 ppm ClO_2 een betere afname gaf dan 5 ppm ClO_2 .

Mechanische transmissie is de manier waarop CGMMV zich snel kan verspreiden door kassen. In de biotoets werd er gebruik gemaakt van carborundumpoeder voor een veel efficiëntere mechanische transmissie. Een belangrijke vraag is derhalve hoe representatief dit experiment is voor praktijkomstandigheden omdat er gewerkt met zwaar besmet bladextract met zeer veel viraal en planteneiwit. Het is hierbij logisch dat er bij lage verdunning ook versnelde afbraak plaats vindt van ClO_2 van planteneiwitten waardoor er minder virus afgebroken kan worden. Het is wel opmerkelijk dat de ClO_2 monitoring aangeeft dat er na meer dan 500x verdunning van het extract nog veel ClO_2 aanwezig was en dat dit blijkbaar niet leidt tot complete inactivering van al het virus. Dit suggereert dat CGMMV relatief resistent is tegen ClO_2 t.o.v. verschillende bacteriën die in aanvullende onderzoek zijn meegenomen. In de praktijk zou ClO_2 ontsmetting goed kunnen werken wanneer de hoeveelheid infectieus CGMMV relatief beperkt is. Dit dient nagegaan te worden in aanvullend onderzoek.

Gezien de resultaten zijn er duidelijke perspectieven om middels ClO_2 het watergeefstelsysteem schoon te houden. Belangrijk daarbij is dan wel dat de hoeveelheid organische stof in het watergeefstelsysteem laag gehouden wordt om reactie met ClO_2 tegen te gaan, omdat anders de effectiviteit van ClO_2 verminderd wordt. Uit experimenten bij potplanten blijken schimmels maar vooral bacteriën bijzonder snel door chloordioxide afgebroken te worden. Er is echter nog geen toelating voor deze toepassing in de tuinbouw.

1 Inleiding en doel

1.1 Inleiding

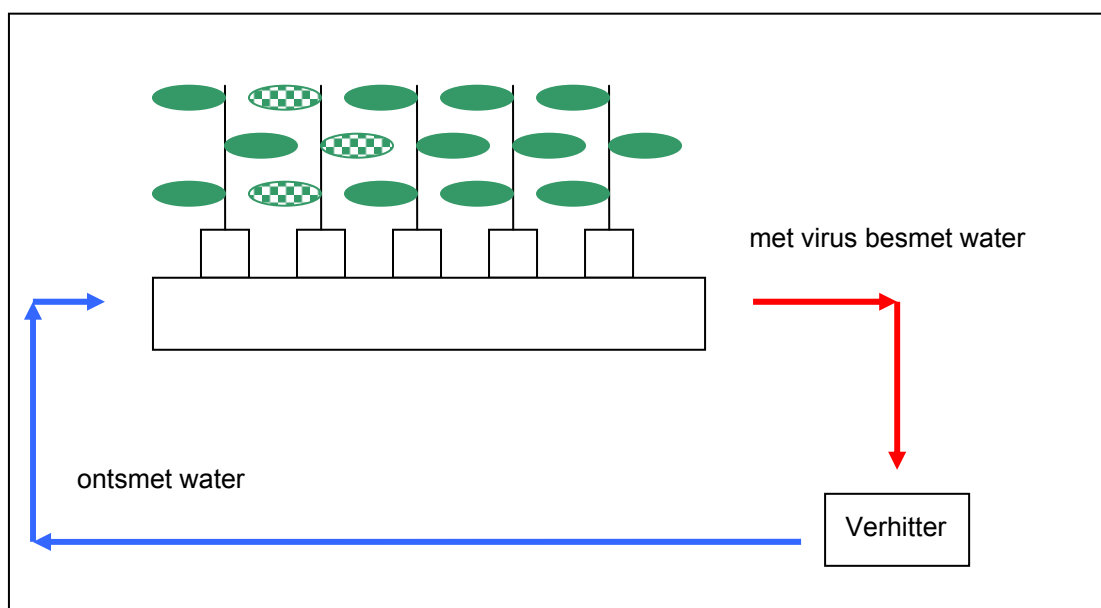
Het Komkommerbontvirus teistert al jaren de Nederlandse Komkommerteelt. De eerste ziekteverschijnselen zijn zichtbaar op de jonge bladeren, die dan vlak bij de groeipunten licht- en donkergroen gevlekt zijn. Naast vlakke, lichtgroene gedeelten hebben deze bladeren donkergroene bobbel. Als het blad uitgroeit ontstaat een vlekkelig patroon. Vruchten kunnen ook zwakke mozaïekverschijnselen vertonen. Uiteindelijk kan het gewas als gevolg van het Komkommerbontvirus geheel afsterven.

Komkommerbontvirus is een zaadoverdraagbaar virus. Virus kan via onvoldoende ontsmet zaad geïntroduceerd worden maar er zijn talloze alternatieve inoculumbronnen (besmet fust, kleding, handen, etc) die een rol kunnen spelen bij de primaire besmetting. Komkommerbontvirus is namelijk een zeer stabiel virus wat via mechanische transmissie zich snel door teelten kan verspreiden. Naast verspreiding door teelthandelingen wordt het virus ook verspreid via het watergeefstelsysteem (mechanisch).

Om verspreiding met gewaswerkzaamheden te voorkomen wordt bijvoorbeeld:

- bij elk pad een ander mesje gebruikt,
- moeten bezoekers gastenjassen aan,
- worden ontsmettingsmatten bij deuren gelegd,
- wordt altijd dezelfde werkrichting aangehouden.

Dit zijn nog maar enkele voorbeelden. Om verspreiding van het virus in het watergeefstelsysteem tegen te gaan kan het water worden ontsmet. Alle komkommertelers maken dan ook wel gebruik van meestal een verhitter of een UV-ontsmetter. Deze water ontsmettingsapparatuur kan het water pas weer ontsmetten wanneer het retourwater uit de kas weer via het watergeefstelsysteem terug komt uit de kas. Dit houdt in dat wanneer water wordt gegeven er tijdens de watergift verontreiniging plaats kan hebben gevonden waarmee ook ziekten en plagen zoals onder andere virus worden verspreid. Dit is schematisch weergegeven in figuur 1.



Figuur 1: Stroomdiagram watergeefstelsysteem (blauw is ontsmet water en rood is met virus besmet water)

De tweede plant van links is met virus besmet. In figuur 1 zal plant nummer 2, plant nummer 3, 4 en 5 besmetten met virus. Er is op dit moment dus geen methode om het systeem tijdens de watergift schoon te houden.

1.2 Doelstelling

Doelstelling van het project is na gaan middels onderzoek of het schoonhouden van het watergeefstelsysteem tijdens de teelt de verspreiding van ziekten en plagen kan tegen gaan. In dit project wordt dit gedaan aan de hand van het Komkommerbontvirus in het watergeefstelsysteem.

Het Komkommerbontvirus kan via zaad en mechanisch (o.a. via het water) worden overgebracht. Het water is een belangrijke bron voor de verspreiding. Het testen in laboratoriumomstandigheden of het virus zich wel of niet beter verspreidt in een schoon watergeefstelsysteem is niet mogelijk. Het onderzoek zal daarom via toetsplanten worden uitgevoerd.

In dit verslag zijn de resultaten weergegeven van fase 1. Binnen fase 1 zijn in totaal 4 laboratorium proeven uitgevoerd.

2 Projectplan

Het project wordt uitgevoerd in twee fasen.

Fase 1

Om er zeker van te zijn dat er een effect is wordt door ProMinent op laboratorium schaal de productie van ClO_2 nagebootst. Door de Naktuinbouw wordt het effect van de chloordioxide getest door een Elisa toets uit te voeren met niet geïnfecteerd materiaal naast met het Komkommerbontvirus geïnfecteerd materiaal dat wel en niet behandeld is met chloordioxide. Als extra controle wordt ook nog een waard-toetsplanten reeks behandeld met elk van de monsters. Deze drie toetsplantenreeksen dienen om mogelijke invloeden van de ClO_2 op de Elisa toets uit te sluiten.

Bij een positief resultaat wordt er een go / no go beslissing genomen door het PT in overleg met de BCO Komkommer van de landelijke Komkommer commissie van LTO Groeiservice.

Go/ No Go

Fase 2

In een kas worden komkommers gezet. Er wordt een ras gekozen dat representatief is voor de praktijk. Volgens diverse virologen is er namelijk weinig rasverschil in de symptoomvorming van het Komkommerbontvirus. Er worden drie objecten getoetst Zie tabel 1.

Tabel 1. Overzicht objecten fase 2

Objecten	Kunstmatige besmetting met Komkommerbontvirus	Toepassen chloordioxide in voedingswater
1(controle)	-	-
2	+	-
3	+	+

De controle behandeling wordt meegenomen om te beoordelen of de verspreiding in het systeem naar wens verloopt bij objecten 2 en 3. Chloordioxide wordt via een speciale installatie toegepast om het watergeefstelsysteem schoon te maken. Door een schoner watergeefstelsysteem vindt er minder snel verspreiding van het Komkommerbontvirus plaats. Kunstmatige infectie van het Komkommerbontvirus zal worden uitgevoerd met carborundumpoeder. Door dit poeder te mengen met virussap en over de plant te wrijven wordt door het poeder de epidermis beschadigd waardoor het virus de plant kan binnen dringen en zich kan vermeerderen. Het verkregen virus wordt door DLV Plant verder gekweekt tot de juiste hoeveelheid.

Er zal gewerkt worden met proefvelden van 10 planten en er worden 3 herhalingen aangelegd. Dit houdt in dat er 3 (objecten) x 3 (herhalingen) = 9 proefvelden worden aangelegd. Het voedingswater wordt per behandeling gerecirculeerd. Alle

ontsmettingssystemen geven slechts een 1000-voudige reductie van de ziekteverwekkers. Dit houdt in dat het virus via recirculatie zich extra zal kunnen verspreiden over de proefveldjes. Door de hoge infectiegraad (1 plant per 10 proefplanten) bestaat de kans wel dat de verspreiding mogelijk iets sneller is dan we in de praktijk gewend zijn.

Waarnemingen:

- 2 maal per week wordt visueel beoordeeld op het ontstaan van virussymptomen.

Toetsingen:

- Per proefveld worden steekproefsgewijs virusmonsters genomen om zeker te kunnen zeggen dat virusvrij wordt gestart.
- Na 2 en na 4 weken, na kunstmatige besmetting van het virus, worden van alle planten monsters genomen om te kijken of het virus zich al verspreid heeft.
- Aan het einde van de proef (6 weken, mogelijk eerder) worden wederom alle planten bemonsterd wederom om te kijken of het virus en in hoeverre het virus zich heeft verspreidt onder de planten.

Deze monster worden door de Naktuinbouw getoetst

Bij de gewaswerkzaamheden zal bij elke plant met schone handschoenen worden gewerkt om besmetting van virus via gewaswerkzaamheden te voorkomen. Verder zullen nog diverse hygiënische maatregelen worden getroffen om de verspreiding van het virus, anders dan via het voedingswater, tegen te gaan. Deze maatregelen vereisen enorm veel tijd en secuur werken waardoor de verzorging van het gewas relatief veel tijd gaat kosten.

3 Effect van 2 ppm ClO_2 op de infectieusiteit van CGMMV

3.1 Inleiding

CGMMV (Cucumber green mottle mosaic virus) is een belangrijk pathogeen van komkommer. Het komkommerbontvirus is zeer stabiel en mede om die reden erg besmettelijk. ClO_2 is een krachtig ontsmettingsmiddel wat in lage concentraties bacteriën kan afdoden. Het is onbekend of een relatief stabiel virus als CGMMV geïnactiveerd kan worden door ClO_2 . Doelstelling van het eerste experiment was om na te gaan of een 2 ppm ClO_2 ontsmetting effect heeft op de infectieusiteit van CGMMV.

3.2 Materiaal en methode

Inoculum vermeerdering

Komkommerplanten werden 7 dagen opgekweekt in kas. Na het strekken van de cotylen werden de kiembladjes bepoederd met carborundumpoeder en geïnoculeerd met CGMMV. De geïnoculeerde planten werden vervolgens opgekweekt bij kamertemperatuur in het quarantaine laboratorium van Naktuinbouw.

Bereiding CGMMV verdunningsreeks

Er werd na 5 weken opkweek een CGMMV extract gemaakt door bladmateriaal met symptomen te malen in standaard ELISA extractiebuffer (0,137 M NaCl, 0,007 M KH_2PO_4 , 0,04 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 20 g/l PVP-10, 0,1% tween 20) met de handtecan tot een homogene suspensie werd verkregen in de verhouding 0,5 gram blad/5 ml (1:10) standaard extractiebuffer. Het onverdunde extract werd in 50 ml buizen 20 minuten afgedraaid op 2500 g bij omgevingstemperatuur. Er werd ca. 150 ml extract verkregen. Er werd een 10-voudige verdunningsreeks van CGMMV m.b.v. standaard extractiebuffer gemaakt.

Productie ClO_2

Volgens het voorschrift van Dr. Lauer (Prominent publicatie 24.4.1997) werd er ClO_2 gemaakt door 5 ml 9% zoutzuur oplossing en 5 ml 7,5% NaCl oplossing bij elkaar te voegen. Het mengsel werd met de hand gezwenkt in een erlenmeyer van 50 ml. Vervolgens werd de Erlenmeyer 15 minuten afgedekt met een bekerglas. De inhoud van de Erlenmeyer werd aan 700 ml demiwater toegevoegd waarna het volume werd aangevuld tot 1 liter met demiwater. Aangenomen werd dat deze oplossing 180 ppm ClO_2 bevatte. De oplossing werd direct gebruikt voor het experiment.

Ontsmetting bladextract met ClO_2

De 10-voudige CGMMV verdunningsreeks werd in twee series opgesplitst. Een Erlenmeyer met 50 ml extract, en een erlenmeyer met 40 ml extract. Aan de serie van 50 ml extract werd per Erlenmeyer 555 μl ClO_2 toegevoegd waardoor een eindconcentratie van 2 ppm ClO_2 werd bereikt per verdunning. Vervolgens werden alle Erlenmeyers met aluminiumfolie afgedekt en 30 minuten bij omgevingstemperatuur geïncubeerd op een schudder (80 rpm). De reacties werden gestopt door toevoeging van 500 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (42

g/100 ml) aan 500 µl CGMMV extract. Extracten werden vervolgens bewaard op ijs totdat werd geïnoculeerd.

Biotoets

Er werden per behandeling 3 komkommerplanten 7 dagen na zaai geïnoculeerd met ClO₂- en onbehandeld extract. Kiembladeren werden met carborundumpoeder bestrooid waarna per verdunning 100 µl ClO₂ - of onbehandeld extract per blad werd geïnoculeerd. Het extract werd ingewreven en 1-5 minuten afgespoeld onder koud stromend water. Planten werden geïncubeerd bij 24 °C onder 16 uur licht in een bak met half open lichtdoorlatend deksel. Eén week na inoculatie werd m.b.v. DAS-ELISA nagegaan op CGMMV aanwezig was in monsters van het 1^e blad. Twee weken na inoculatie werden monsters van het 2^e en 3^e blad getoetst op CGMMV met ELISA.

ELISA

Met een DAS-ELISA werd nagegaan of CGMMV aantoonbaar was in het ClO₂- en onbehandeld extract. Voor de DAS-ELISA werden PRI antisera gebruikt volgens het standaard protocol.

3.3 Resultaten

Inoculum vermeerdering

Met ELISA kon worden aangetoond dat CGMMV zich systemisch had verspreid in de planten. CGMMV kon na 5 weken vermeerdering met ELISA tot in de 10⁵ (0,152 na 2 uur tegen achtergrond 0,06) verdunning nog aangetoond worden.

Productie ClO₂

Na 15 minuten incubatie werd boven in de Erlenmeyer een geel gas waargenomen. De vloeistof kleurde tijdens het proces geel. De exacte concentratie ClO₂ werd niet gemeten vanwege het ontbreken van meetapparatuur.

Effect van ClO₂ ontsmetting op ELISA aantoonbaarheid

De ClO₂ behandeling bleek geen duidelijk effect te hebben op de ELISA aantoonbaarheid van CGMMV (tabel 1). CGMMV was met ELISA aantoonbaar in zowel ClO₂- als onbehandelde extracten tot in de 10⁴ verdunning.

Effect van ClO₂ ontsmetting op infectieusiteit CGMMV

Het bleek dat CGMMV aantoonbaar was met ELISA in planten die werden geïnoculeerd met onverdund extract, 10x en 100x verdund extract (zie tabel 2). Er was 8 dagen na inoculatie een verschil tussen behandeld en onbehandelde extracten. Namelijk in de 1000x verdunning werd infectieus CGMMV alleen nog aangetroffen in de onbehandelde extracten (data niet weergegeven in tabel). Na 15 dagen werd CGMMV echter in beide behandelingen aangetroffen na inoculatie met 1000x verdund onbehandelde extract.

Tabel 2. ELISA van behandelde en onbehandelde plantenextracten en biotoetsplanten na inoculatie met 2 ppm ClO_2 - en onbehandeld extract

Verdunning	Behandeld met 2 ppm ClO_2		Onbehandeld	
	Directe ELISA	biotoets positieve planten	Directe ELISA	biotoets positieve planten
10^1	Pos	3/3	Pos	3/3
10^2	Pos	3/3	Pos	3/3
10^3	Pos	3/3	Pos	3/3
10^4	Pos	1/3	Pos	2/3
10^5	Pos/neg	0/3	Pos/neg	0/3
10^6	Neg	0/3	Neg	0/3
10^7	Neg	0/3	Neg	0/3
10^8	Neg	0/3	Neg	0/3
10^9	Neg	0/3	Neg	0/3
10^{10}	Neg	0/3	Neg	0/3

Pos = ELISA waarde >1 . Verhoogd = ELISA waarde $>0,1 < 0,3$. Neg = ELISA waarde $<0,1$.

3.4 Discussie

Er was geen duidelijk ontsmettingseffect waarneembaar in de biotoets na gebruik van 2 ppm ClO_2 in het eerste experiment. In de biotoets werden er namelijk in zowel ClO_2 -behandelde als onbehandelde versie planten ziek na inoculatie met een 10.000 keer verdund extract. Het werd duidelijk dat in de biotoets een snelle meting van de aanwezigheid van CGMMV met ELISA geen zin heeft. Blijkbaar is de vermeerdering van CGMMV niet zo snel dat in alle eerste echte bladeren na 1 week CGMMV kan worden aangetoond met ELISA (data niet weergegeven in tabel). Het is onbekend waarom de ClO_2 -behandeling niet heeft gewerkt. Mogelijk waren er in de extracten te veel planteneiwitten aanwezig waardoor de ClO_2 concentratie snel afnam en CGMMV onvoldoende afgebroken werd.

4 Effect van 5 ppm ClO_2 op infectieusiteit van CGMMV

4.1 Inleiding

Er werd in het voorafgaande experiment geen ontsmettingseffect waargenomen bij gebruik van 2 ppm ClO_2 . In een tweede experiment werd na overleg met Prominent de ClO_2 concentratie verhoogd naar 5 ppm omdat mogelijk planteneiwitten de ClO_2 neutraliseerden voordat CGMMV afgebroken kon worden.

4.2 Materiaal en methode

Het experiment werd grotendeels uitgevoerd zoals in het eerste experiment werd beschreven. Er werd wel gebruik gemaakt van een nieuwe inoculum productie van CGMMV waarbij geïnoculeerde planten in afgesloten bakken drie weken geïncubeerd werden in de quarantaine klimaatcel van het laboratorium van Naktuinbouw. Verder werd er een vijfvoudige verdunningreeks bereid en werd er ontsmet met 5 ppm ClO_2 . Aanwezigheid van CGMMV in de biotoets werd bepaald m.b.v. ELISA. Hierbij werd alleen na 16 dagen na inoculatie het tweede en derde blad bemonsterd.

4.3 Resultaten

Inoculumvermeerdering

Met ELISA kon worden aangetoond dat CGMMV zich had vermeerderd in de planten. De “virusload” was wel lager dan in het eerste experiment omdat de ELISA nauwelijks CGMMV kon aantonen in 2500x verdunde extract (zie tabel 2 en 3).

Effect ClO_2 ontsmetting op ELISA aantoonbaarheid

De ClO_2 behandeling bleek geen duidelijk effect te hebben op de ELISA aantoonbaarheid van CGMMV. CGMMV was direct na behandeling met ELISA aantoonbaar in het ClO_2 behandelde extract tot de $2,5 \cdot 10^3$ verdunning en in het onbehandelde extract tot in de $5 \cdot 10^2$ verdunning (zie tabel 3).

Effect van chloordioxide behandeling op infectieusiteit CGMMV

Zoals in experiment 1 werden er geen duidelijke visuele symptomen (bont en mozaïek) aangetroffen in de CGMMV-besmette planten (zie foto 1). Wel was er een duidelijk waarneembare groeiremming in planten die op basis van ELISA besmet bleken met CGMMV. Er werd geen ClO_2 behandelingseffect (zie tabel 3) waargenomen.



Foto 1. Komkommerplanten uit CGMMV biotoets. Links op de foto staan de ELISA negatieve en rechts de ELISA positieve komkommerplanten. CGMMV besmette planten hadden geen duidelijke symptomen maar bleven wel achter in groei.

Tabel 3. ELISA analyse van behandelde en onbehandelde plantenextracten en biotoets planten na inoculatie met 5 ppm ClO_2^- en onbehandeld extract

Verdunning	Behandeld met 5 ppm ClO_2^-		Onbehandeld	
	Directe ELISA op extract	biotoets positieve planten	Directe ELISA op extract	biotoets positieve planten
20	Pos	3/3	Pos	3/3
100	Pos	3/3	Pos	3/3
500	Pos	3/3	Pos/neg	1/3*
2.500	Pos/neg	0/3	Neg	0/3
12.500	Neg	0/3	Neg	0/3
62.500	Neg	0/3	Neg	0/3
312.500	Neg	0/3	Neg	0/3
1.562.500	Neg	0/3	Neg	0/3
7.812.500	Neg	0/3	Neg	0/3

Pos = ELISA waarde >1 . Verhoogd = ELISA waarde $>0,1 < 0,3$. Neg = ELISA waarde $<0,1$

* Een tweede plant had een licht hogere ELISA waarde maar dit was waarschijnlijk een verhoogde achtergrond.

4.4 Discussie en conclusie

Ook in het tweede experiment werd er geen ClO_2 behandelingseffect waargenomen. De meest plausibele verklaring is dat er opnieuw onvoldoende ClO_2 aanwezig was in het experiment om alle CGMMV virusdeeltjes te desinfecteren. Helaas is de ClO_2 concentratie niet gemeten tijdens het uitvoeren van de proef. Het meten van de beschikbare hoeveelheid ClO_2 tijdens de proef is de sleutel om na te gaan waarom de ontsmetting niet gewerkt heeft. Zonder deze essentiële monitoring kan niet nagegaan worden of er te weinig ClO_2 werd gebruikt of dat CGMMV werkelijk ongevoelig is voor ClO_2 . In het laatste scenario is dan praktische toepassing van ClO_2 voor het controleren van CGMMV verspreiding onmogelijk. Het lijkt meer waarschijnlijk dat er te veel organisch materiaal in de extracten aanwezig was waardoor er competitieve afbraak plaatsgevonden heeft tussen plantaardig en viraal materiaal. Door het harder afdraaien van plantextracten kan mogelijk de verhouding plantaardig en viraal materiaal verbeterd worden waardoor er dan wel een ontsmettingseffect zou kunnen worden gemeten. Een andere reële mogelijkheid is dat één van de extractiebuffercomponenten (PVP en/of Tween20) met ClO_2 reageert waardoor er onvoldoende actieve ingrediënt overblijft voor de inactivatie van CGMMV.

In een extra experiment met extract van komkommerplanten dient nagegaan te worden welke concentratie ClO_2 wel een behandelingseffect heeft. Hierbij zal gebruikt worden gemaakt van een ClO_2 meter. Parallel zal door gebruik van een bacterie (i.p.v. CGMMV) snel nagegaan kunnen worden of er biologische activiteit is van het ontsmettingsmiddel. In dit experiment zal eerst nagegaan worden of één van de buffercomponenten niet reageert met ClO_2 . In tweede instantie zal het effect van extra centrifugering bepaald worden.

5 Monitoring concentratie ClO_2

5.1 Inleiding

Uit eerdere experimenten met 2 en 5 ppm ClO_2 om CGMMV te inactiveren werd er geen meetbaar effect van de ClO_2 behandeling waargenomen. Omdat er geen ClO_2 meter beschikbaar was kon niet nagegaan worden wat er tijdens het experiment gebeurde. Tijdens de ontsmetting met 2 en 5 ppm ClO_2 werd fosfaatbuffer + PVP gebruikt. Vraag was of PVP mogelijk snel ClO_2 zou kunnen afbreken. Tevens zouden planteiwitten ClO_2 snel kunnen afbreken waardoor CGMMV niet geïnactiveerd kon worden. Doelstelling van het experiment was om m.b.v. een ClO_2 meter de afname van ClO_2 in verschillende buffers en bladextract te bepalen.

5.2 Materiaal en methode

Productie ClO_2

Volgens het voorschrift van Dr. Lauer (Prominent publicatie 24.4.1997) werd er ClO_2 gemaakt door 5 ml 9% zoutzuur oplossing en 5 ml 7,5% NaCl oplossing bij elkaar te voegen. Het mengsel werd met de hand gezwenkt in een erlenmeyer van 50 ml. Vervolgens werd de Erlenmeyer 15 minuten afgedekt met een bekerglas. De inhoud van de Erlenmeyer werd aan 700 ml demiwater toegevoegd waarna het volume werd aangevuld tot 1 liter met demiwater.

ClO_2 in de stockoplossing

Theoretisch zou de stockoplossing een waarde van 180 ppm moeten hebben. De ClO_2 meter heeft een meetbereik van 0,05 – 11 ppm ClO_2 . Om die reden werd er een 50x en een 100x verdunning in demiwater gemaakt zodat de concentratie in het meetbereik van de meter kwam te liggen.

ClO_2 in fosfaatbuffer + PVP

Nadat de concentratie van de stockoplossing ClO_2 bekend was werd berekend dat er 6 ml ClO_2 aan 100 ml fosfaatbuffer + PVP (0,137 M NaCl, 0,007 M KH_2PO_4 , 0,04 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 20 g/l PVP-10, 0,1% tween 20) toegevoegd moest worden voor een 10 ppm eindconcentratie. Direct na het toevoegen van ClO_2 werd iedere minuut de ClO_2 concentratie in de standaard extractie buffer gemeten.

ClO_2 in 0,05 M PBS

Er werd 3 ml ClO_2 toegevoegd aan 50 ml 0,05 M PBS (0,12 M NaCl, 0,037 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,013 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) om 10 ppm ClO_2 eindconcentratie te krijgen. Direct na toevoegen en na 26 minuten werd de concentratie ClO_2 bepaald.

ClO_2 in bladextract in 0,05 M PBS

Er werd een extract van komkommerblad in 0,05 M PBS (1:10 w/v) gemaakt. Het extract werd met variabele snelheid gecentrifugeerd waarbij 50 ml gedurende 20 minuten werd afgedraaid bij 2.500g en 10.000g. Er werd een 10x verdunning van beide extracten in 0,05

M PBS gemaakt waarna 20 ppm ClO_2 werd toegevoegd. Iedere 2,5 minuut werd de concentratie ClO_2 in beide oplossingen gemeten.

IJklijn aanvang concentratie ClO_2

Met het bladextract (afgedraaid bij 10.000g) werd een 10-voudige verdunningsreeks in 0,05 M PBS gemaakt. De verdunningsreeks van werd geïncubeerd met 4, 10, 20, 30 of 40 ppm startconcentratie ClO_2 . Na 15 minuten werd de concentratie ClO_2 in iedere verdunning bepaald.

5.3 Resultaten

Productie ClO_2

Na 15 minuten incubatie werd boven in de Erlenmeyer een geel gas waargenomen. De vloeistof kleurde tijdens het proces geel. Bij de 100x verdunning werd een waarde van $1,66 \pm 0,1$ ppm weergegeven wat correspondeerde met een concentratie van de stockoplossing ca. 165 ppm.

ClO_2 in fosfaatbuffer + PVP

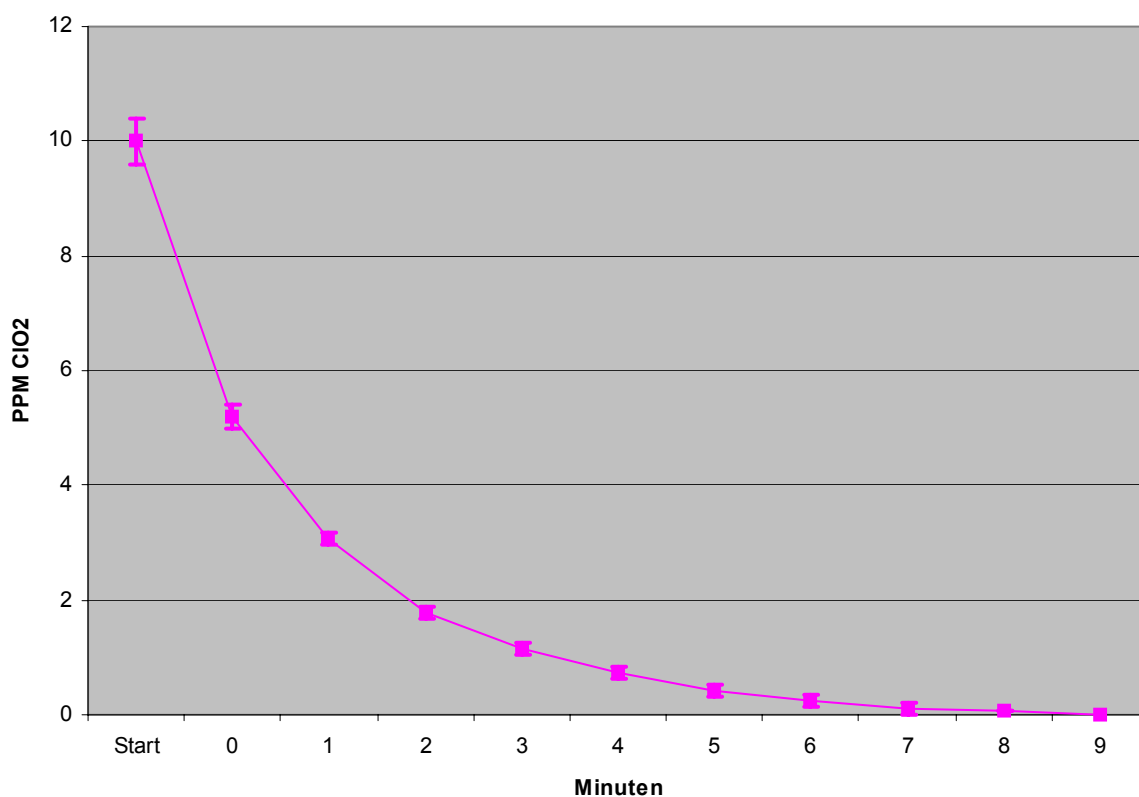
Direct na het toevoegen van 10 ppm ClO_2 aan de fosfaatbuffer + PVP werd een concentratie van $5,19 \pm 0,4$ ppm gemeten. Het bleek dat de concentratie ClO_2 snel afnam in de tijd (zie figuur 2).

ClO_2 in 0,05 M PBS

Direct na het toevoegen van 10 ppm ClO_2 aan de fosfaatbuffer (- PVP) werd een concentratie van $9,66 \text{ ppm} \pm 0,8 \text{ ppm}$ gemeten. Na 26 minuten werd $8,16 \text{ ppm} \pm 0,8 \text{ ppm}$ ClO_2 gemeten waaruit bleek dat er relatief erg weinig afbraak was.

ClO_2 in bladextract in 0,05 M PBS

Er bleek was een duidelijk verschil in kleur in extracten die relatief snel en langzaam werden afgedraaid. De concentratie ClO_2 nam in beide extracten zeer snel af tot onder de 8 ppm (zie figuur 2) en na 5 minuten reactietijd was er minder dan 1 ppm ClO_2 over in beide extracten.



Figuur. 2. Verloop van de concentratie ClO_2 in de tijd in fosfaatbuffer + PVP. Er werd gestart met 10 ppm ClO_2 . Na 9 minuten was er minder dan 0,05 ppm ClO_2 in oplossing aanwezig.

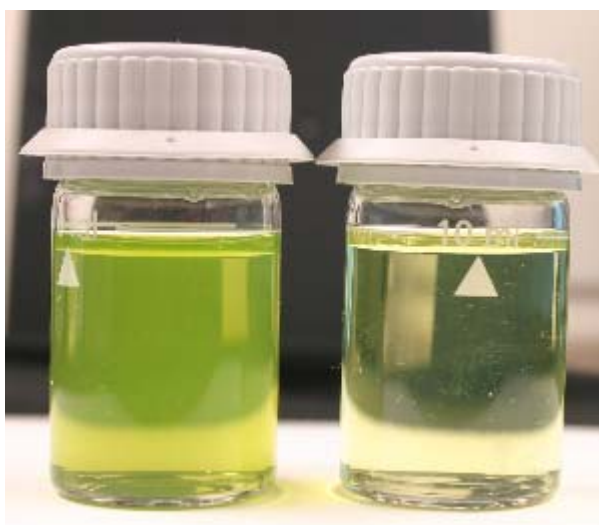
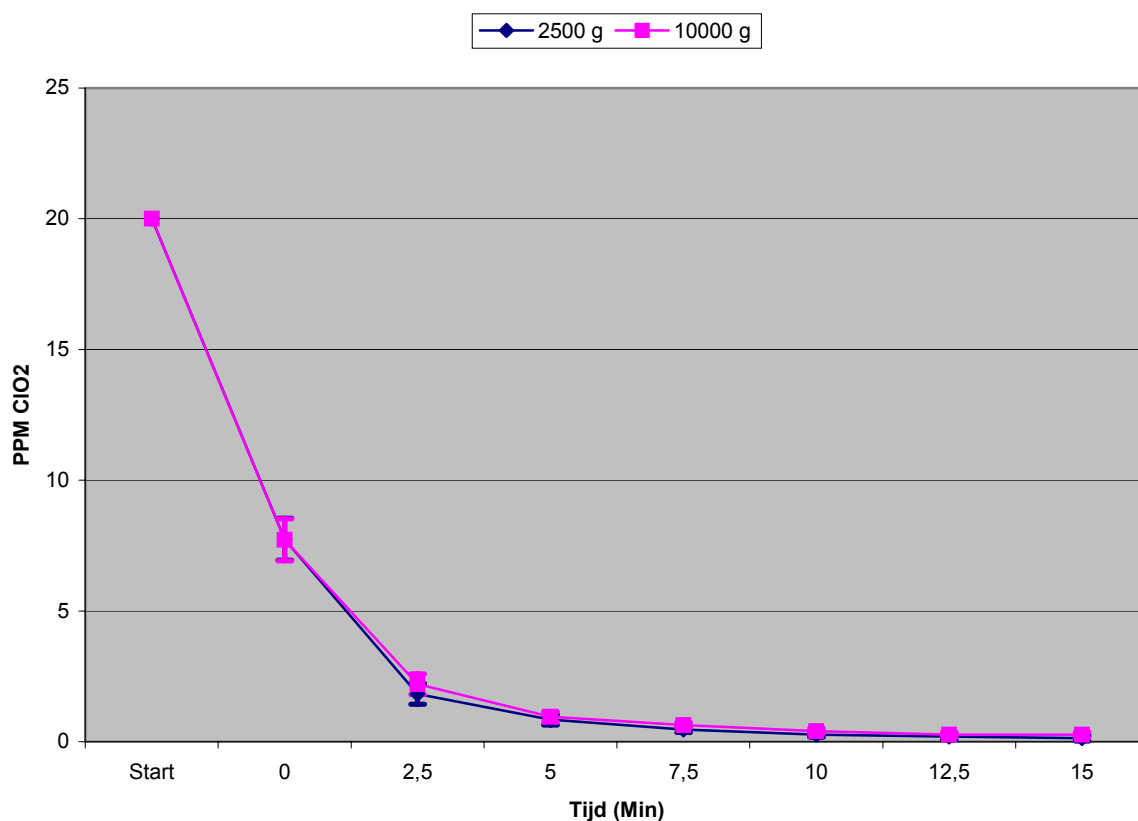


Foto. 2. Effect van variabele centrifugering op de kleur van bladextract. Bladextract werd 20 minuten afgedraaid bij 2500 g (links) en 10.000 g (rechts).

Er was wel een duidelijk verschil zichtbaar in de kleur van het bladextract. Het bladextract 20 minuten afgedraaid bij 2500g was donkergroen van kleur en het bladextract 20 minuten afgedraaid bij 10000g was lichtgroen van kleur (zie foto 2). T.a.v. de afbraak van ClO_2 was er geen duidelijk verschil waarneembaar tussen langzaam en snel afgedraaid extract (zie figuur 3).



Figuur 3. Verloop van de concentratie ClO_2 in de tijd van 10x verdund bladextract in 0,05 M PBS afgedraaid bij 2.500g en 10.000g. Er werd gestart met 20 ppm ClO_2 .

IJklijn aanvang concentratie ClO_2

Met het bladextract afgedraaid bij 10.000g werd een 10-voudige verdunningsreeks in 0,05 M PBS gemaakt. Bij de 10x verdunning was ± 25 ppm startconcentratie ClO_2 nodig om na 15 minuten een eindconcentratie van 2 ppm te meten. Bij de 100x, 1000x en 10.000x verdunning was een startconcentratie van 4 ppm genoeg om na 15 minuten een eindconcentratie van 2 – 3 ppm te meten (zie tabel 4 en figuur 4).

Tabel 4. Concentratie ClO_2 na 15 minuten incubatie in een 10-voudige verdunningsreeks van bladextract in 0,05 M PBS (géén PVP) met variabele startconcentratie van ClO_2

Verdunning	Startconcentratie	Concentratie ClO_2 (ppm)				
		40	30	20	10	4
10x		10,31	3,46	0,24	0,19	0,09
100x		>11*	>11	>11	5,85	2,2
1000x		>11	>11	>11	6,5	2,7
10000x		>11	>11	>11	6,55	2,92

* Waarde buiten meetbereik van meter

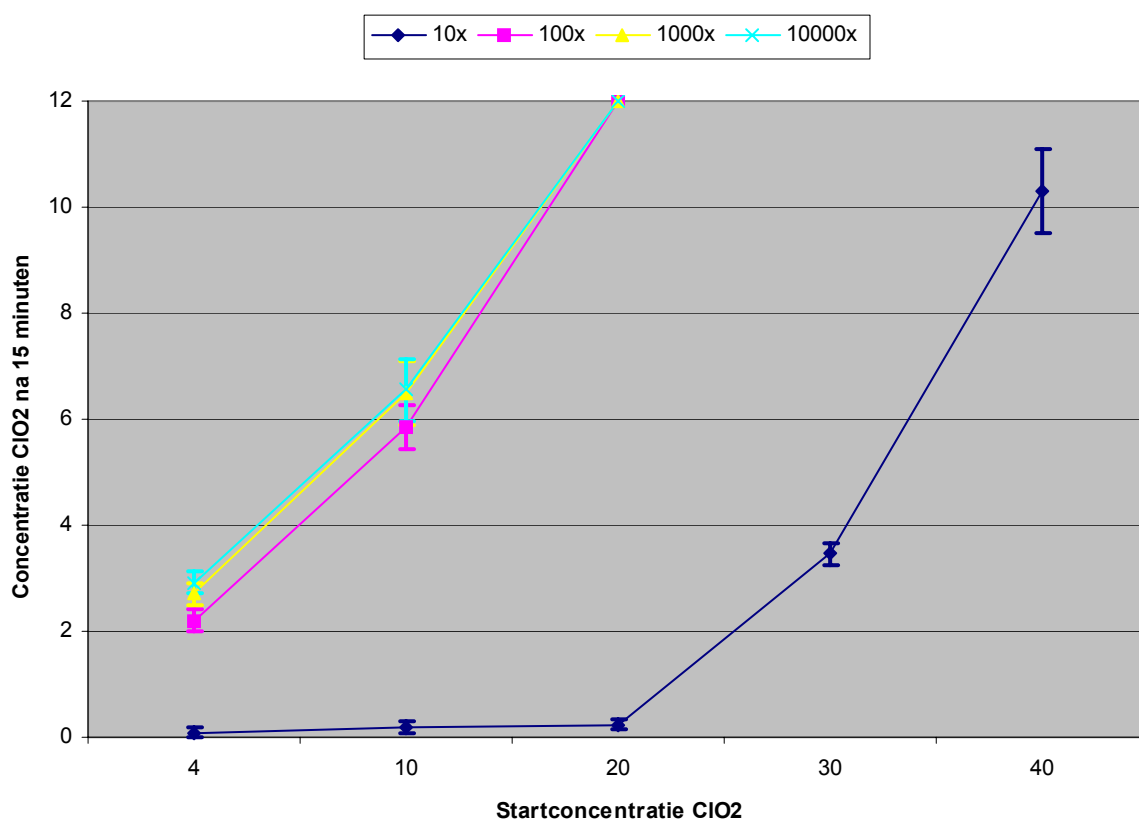


Fig. 4. Concentratie ClO_2 na 15 minuten incubatie van de 10-voudige verdunningsreeks van bladextract in 0,05 M PBS.

5.4 Discussie en Conclusie

Er bleek een groot verschil te zijn in ClO_2 afbraaksnelheid wanneer er extractiebuffer met en zonder PVP werd gebruikt. Toevoeging van PVP zorgt voor een versnelde afbraak van ClO_2 waardoor de ontsmetting niet efficiënt kan gebeuren. Sneller afdraaien van het bladextract heeft een effect op de kleur van het extract maar bij gebruik van een 10x verdund extract in PBS geen effect op de versnelde afname van op de concentratie ClO_2 . In zowel bladextract in 0,05 M PBS als fosfaatbuffer met PVP neemt de concentratie ClO_2 zeer snel af. Bij een 10x verdunning van het bladextract was volgens de ijkcurve 25-30 ppm nodig om een eindconcentratie van 2 ppm te meten. Bij hogere verdunningen (100x – 10000x) van bladextract was een beginconcentratie van 4 ppm ClO_2 net voldoende om na 15 minuten nog 2 ppm te kunnen meten.

In de aanvullende experimenten is duidelijk geworden dat er door een overmaat aan PVP en organisch plantenmateriaal er onvoldoende ClO_2 aanwezig was voor afbraak van CGMMV in de eerste twee proeven. De potentie van met ClO_2 werd in een aanvullend experiment (achterliggende data hier niet gegeven) bevestigd waarbij er geen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* overleving was na korte blootstelling aan PBS met ClO_2 .

De verschillende experimenten maken duidelijk dat monitoring van ClO_2 tijdens de ontsmetting absoluut noodzakelijk is. Wanneer er onverwacht snelle afbraak plaatsvindt, zal er namelijk geen ontsmettingseffect waarneembaar zijn.

6 Effect van ClO_2 op de infectieusiteit van CGMMV

6.1 Inleiding

ClO_2 is een ontsmettingsmiddel wat veel gebruikt wordt voor het afdoden van bacteriën. Het is onbekend of ClO_2 gebruikt kan worden voor het inactiveren van CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus). CGMMV is de veroorzaker van komkommerbont en behoort tot de zeer stabiele tobamovirussen.

In eerdere experimenten bleef het onduidelijk of ClO_2 ontsmetting werkelijk CGMMV kon inactiveren. Het bleek namelijk dat een bepaalde buffercomponent (PVP) met ClO_2 reageerde waardoor geen ontsmettingseffect werd gemeten. In dit experiment werd een alternatieve buffer zonder PVP gebruikt en werd de concentratie ClO_2 tijdens de ontsmetting gevolgd. Inactivering van het virus werd gemeten m.b.v. van een biotoets omdat ELISA geen onderscheid maakt tussen infectieus en niet-infectieus virus.

6.2 Materiaal en methode

Inoculum vermeerdering

Komkommerplanten werden 7 dagen opgekweekt in de kas. Na het strekken van de cotylen werden de kiemblaadjes bepoederd met carborundumpoeder en geïnoculeerd met infectieus CGMMV. De geïnoculeerde planten werden vervolgens opgekweekt bij kamertemperatuur onder een quarantaine regiem.

Bereiding CGMMV verdunningsreeks

Er werd 3 weken na inoculatie een CGMMV extract gemaakt door bladmateriaal met symptomen 2 minuten te malen in 0,05M PBS met de blender tot een homogene suspensie werd verkregen in de verhouding 1 gram blad/10 ml 0,05M PBS (1:10). Het onverdunde extract werd in 50 ml buizen gedurende 20 minuten afgedraaid op 10.000 g bij 4 °C voor het verwijderen van plantenmateriaal. Van het supernatant werd een 5-voudige verdunningsreeks (20x – 7.812.500x) van CGMMV extract in 0,05M PBS gemaakt.

Productie en monitoring ClO_2

Volgens het voorschrift van Dr. Lauer (Prominent publicatie 24.4.1997) werd er een geconcentreerde ClO_2 oplossing gemaakt door 5 ml 9% zoutzuur oplossing en 5 ml 7,5% NaCl oplossing bij elkaar te voegen. Het mengsel werd met de hand gezwenkt in een erlenmeyer van 50 ml. Vervolgens werd de Erlenmeyer 15 minuten afgedekt met een bekerglas. De inhoud van de Erlenmeyer werd aan 700 ml demiwater toegevoegd waarna het volume werd aangevuld tot 1 liter met demiwater. De exacte concentratie ClO_2 werd bepaald door de stockoplossing 100x te verdunnen in 0,05M PBS en te meten met ClO_2 meter.

Ontsmetting bladextract met ClO_2

De 5-voudige CGMMV verdunningsreeks werd in 3 series van 50 ml opgesplitst (A-C). Aan serie A werd per erlenmeyer geconcentreerde ClO_2 toegevoegd tot een eindconcentratie

van 10 ppm. Aan serie B werd per erlenmeyer ClO_2 toegevoegd tot een eindconcentratie van 5 ppm. Na 1 en 5 minuten werd de concentratie ClO_2 m.b.v. een ClO_2 meter (bruikleen Prominent) gemeten volgens standaard methode. Na 5 minuten inwerktijd werden de reacties gestopt door toevoeging van 500 μl CGMMV verdunningsreeks aan 500 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,24 g/l). Aan serie C werd geen ClO_2 toegevoegd. Extracten werden vervolgens bewaard op ijs totdat werd geïnoculeerd.

Biotoets

Er werden per behandeling 3 komkommerplanten 7 dagen na zaai geïnoculeerd met 5 en 10 ppm ClO_2 - en onbehandeld extract. Kiembladeren werden met carborundumpoeder bestrooid waarna per verdunning 100 μl extract per blad werd geïnoculeerd. Het extract werd ingewreven en na 1-5 minuten afgespoeld onder koud stromend water. Planten werden geïncubeerd bij 24 °C onder 16 uur licht in een bak met lichtdoorlatend deksel. 2 weken na inoculatie werd m.b.v. DAS-ELISA nagegaan of CGMMV aanwezig was in monsters van het 2^e en 3^e blad omdat CGMMV symptomen niet snel met het oog waarneembaar zijn.

ELISA

DAS-ELISA werd uitgevoerd volgens de standaard werkwijze van Naktuinbouw.

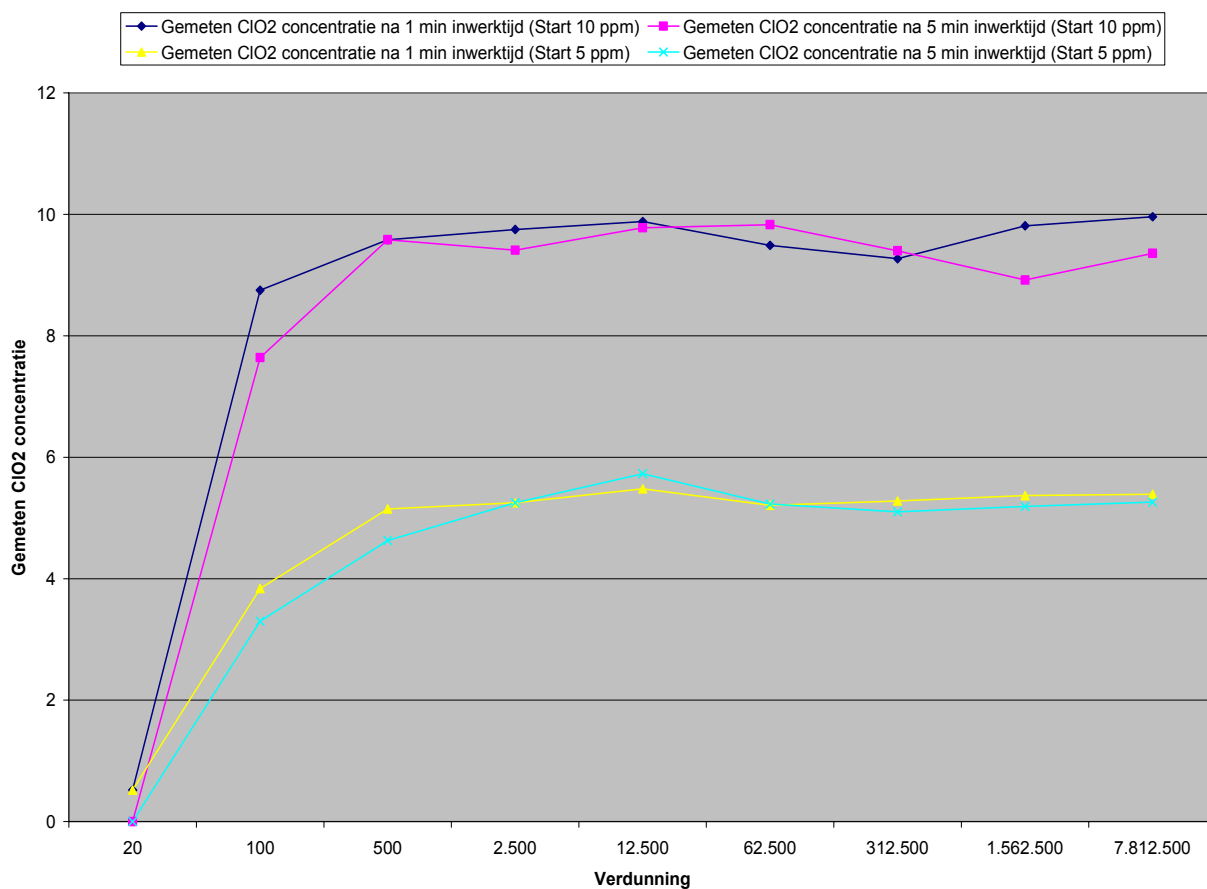
6.3 Resultaten

Inoculum vermeerdering

Met ELISA kon worden aangetoond dat CGMMV zich systemisch had verspreid in de planten. CGMMV kon na 3 weken vermeerdering met ELISA tot in de 10^6 (0,6 na 2 uur tegen achtergrond 0,06) verdunning nog aangetoond worden.

Productie en monitoring ClO_2

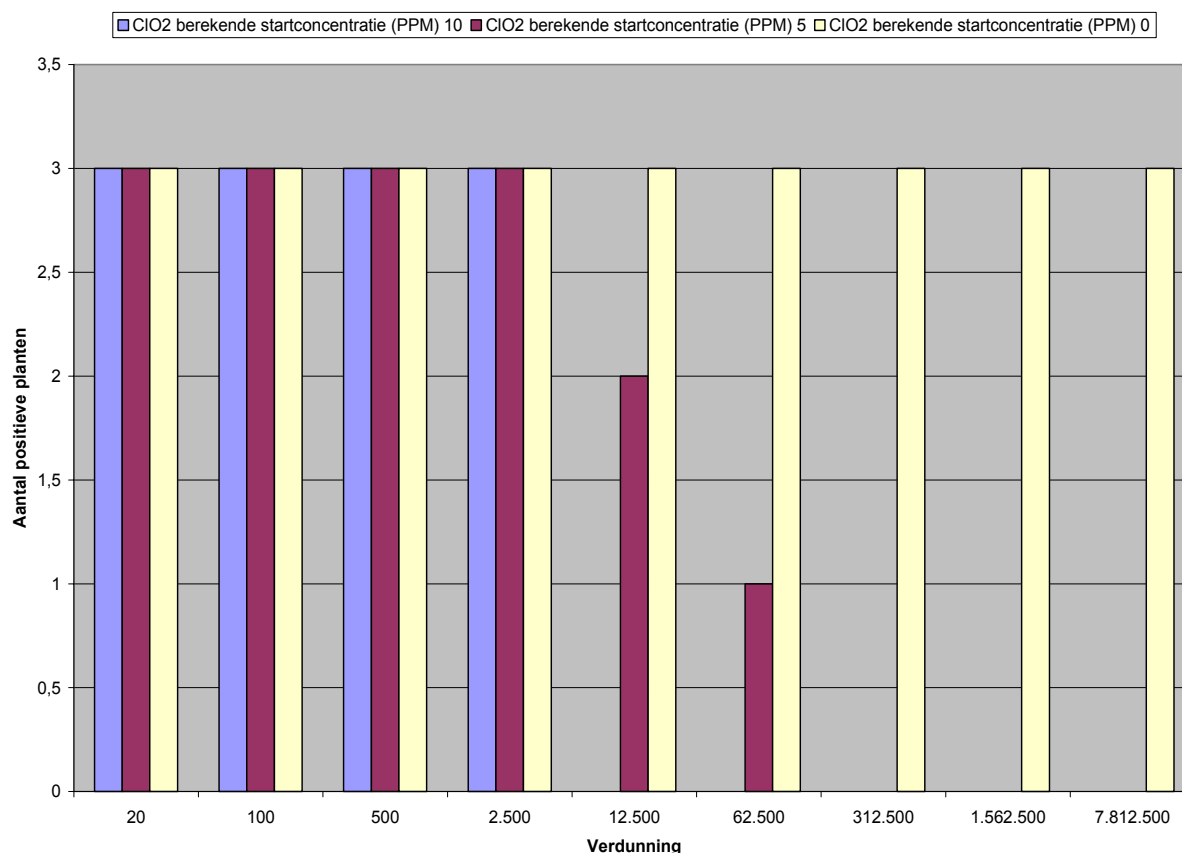
Na 15 minuten incubatie werd boven in de erlenmeyer een geel gas waargenomen. De vloeistof kleurde tijdens het proces geel. Stockconcentratie van de oplossing was 164 ppm. Uit figuur 5 blijkt dat de hoeveelheid ClO_2 in het 20x verdunde extract zeer snel afnam. Deze afname was minder snel na 100 en 500x verdunning terwijl er geen duidelijke afname was na verdere verdunning van de extracten (zie figuur 5).



Figuur 5. Gemeten ClO₂ concentratie in verdunde bladextracten na 1 en 5 minuten inwerktijd bij 10 en 5 ppm startconcentratie ClO₂

Effect van ClO₂ ontsmetting op de infectieusiteit van CGMMV

Het bleek dat infectieus CGMMV in het onbehandelde extract zelfs tot de hoogste verdunning (7.812.500x) aanwezig was. In de ClO₂ behandelde extracten bleek er geen infectieus CGMMV aanwezig te zijn bij relatief sterke verdunning van het extract. Infectieus CGMMV kon wel aangetoond worden in 2 van de 3 planten bij een 12500x verdunning na 5 min ontsmetting met 5 ppm ClO₂. Bij een 62500x verdunning bij dezelfde behandeling kon in nog 1 van de 3 planten infectieus CGMMV aangetoond worden. Tevens kon infectieus CGMMV worden aangetoond in 3 van de 3 planten bij een 2500x verdunning na 5 minuten ontsmetting met 10 ppm ClO₂ (zie figuur 6).



Figuur 6. Aantal positieve planten (Max. 3) bij iedere verdunning van CGMMV na inoculeren van extract ontsmet met 5 en 10 ppm ClO₂ en onbehandeld extract.

6.4 Discussie

Inactivering van CGMMV door ClO₂ was bij hoge inoculum verdunning goed mogelijk. Het bleek echter wel dat complete afbraak van CGMMV door ClO₂ in relatief zwaar besmette lagere verdunningen niet mogelijk was. In het experiment werd niet goed duidelijk tot welke eindconcentratie het oorspronkelijke inoculum infectieus was omdat zelfs na bijna 8 miljoen x verdunning alle drie geïnoculeerde planten symptomen vertoonden in de onbehandelde controle. Gesteld kan worden dat de hoeveelheid CGMMV virions zeer hoog moet zijn geweest. Bij gebruik van 10 en 5 ppm ClO₂ ontsmetting werden er geen zieke planten meer aangetroffen vanaf resp. de 12.500x en 312.500x verdunning. Dit betekent dat er na een 10 en 5 ppm ClO₂ behandeling tenminste een factor 625x en 25x verminderde infectieusiteit was t.o.v. de onbehandelde verdunningen.

Het is bekend dat tobamovirussen, waaronder TMV, ToMV en CGMMV, zeer stabiele virussen zijn en gedurende lange tijd infectieus kunnen blijven. In het experiment bleek CGMMV zelfs na een relatief lange blootstelling (5 minuten) aan een hoge concentratie ClO₂ (zelfs rond 10 ppm) nog infectieus te zijn. Hierbij is het duidelijk dat er een concentratie effect aanwezig was omdat 10 ppm ClO₂ een betere afname gaf dan 5 ppm ClO₂.

Mechanische transmissie is de manier waarop CGMMV zich snel kan verspreiden door kassen. In de biotoets werd er gebruik gemaakt van carborundumpoeder voor een veel efficiëntere mechanische transmissie. Een belangrijke vraag is derhalve hoe representatief dit experiment is voor praktijkomstandigheden omdat er gewerkt met zwaar besmet bladextract met zeer veel viraal en planteneiwit. Het is hierbij logisch dat er bij lage verdunning ook versnelde afbraak plaats vindt van ClO_2 van planteneiwitten waardoor er minder virus afgebroken kan worden. Het is wel opmerkelijk dat de ClO_2 monitoring aangeeft dat er na meer dan 500x verdunning van het extract nog veel ClO_2 aanwezig was en dat dit blijkbaar niet leidt tot complete inactivering van al het virus. Dit suggereert dat CGMMV relatief resistent is tegen ClO_2 t.o.v. verschillende bacteriën die in aanvullende onderzoek zijn meegenomen. In de praktijk zou ClO_2 ontsmetting goed kunnen werken wanneer de hoeveelheid infectieus CGMMV relatief beperkt is. Dit dient nagegaan te worden in aanvullend onderzoek.

6.5 Conclusie

CGMMV afbraak door ClO_2 werd duidelijk waargenomen in het experiment wanneer er relatief sterk verdunde virusextracten werden gebruikt. Bij relatief lage verdunning van de virusextracten was complete inactivering niet mogelijk.

7 Conclusies en aanbevelingen

In een tweetal experimenten werd nagegaan of een chloordioxide (ClO_2) ontsmetting van CGMMV besmet extract mogelijk was. In het eerste experiment werd 2 ppm ClO_2 gebruikt voor de ontsmetting. Er bleek in dit experiment geen duidelijk effect van ClO_2 te zijn. Om die reden werd er in het tweede experiment een hogere ClO_2 concentratie (5 ppm) gebruikt. In het tweede experiment werd er opnieuw geen duidelijk positief effect van de ClO_2 behandeling gemeten. De meest logische verklaring voor het achterwege blijven van een effect is dat er te veel organisch plantenmateriaal in het extract aanwezig was waardoor er onvoldoende ClO_2 beschikbaar was voor afbraak van het virus. In een aanvullend experiment waarin de hoeveelheid beschikbaar ClO_2 gemeten is, is nagegaan of deze hypothese klopt.

Uit het derde experiment bleek een groot verschil te zijn in ClO_2 afbraaksnelheid wanneer er extractiebuffer met en zonder PVP werd gebruikt. Toevoeging van PVP zorgt voor een versnelde afbraak van ClO_2 waardoor de ontsmetting niet efficiënt kan gebeuren. Sneller afdraaien van het bladextract heeft een effect op de kleur van het extract maar bij gebruik van een 10x verdund extract in PBS geen effect op de versnelde afname van op de concentratie ClO_2 . In zowel bladextract in 0,05 M PBS als fosfaatbuffer met PVP neemt de concentratie ClO_2 zeer snel af. Bij een 10x verdunning van het bladextract was volgens de ijkcurve 25-30 ppm nodig om een eindconcentratie van 2 ppm te meten. Bij hogere verdunningen (100x – 10000x) van bladextract was een beginconcentratie van 4 ppm ClO_2 net voldoende om na 15 minuten nog 2 ppm te kunnen meten.

In de aanvullende experimenten is duidelijk geworden dat er door een overmaat aan PVP en organisch plantenmateriaal er onvoldoende ClO_2 aanwezig was voor afbraak van CGMMV in de eerste twee proeven. De potentie van met ClO_2 werd vervolgens in een aanvullend experiment bevestigd waarbij er geen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, een bacterie die zwartnervigheid in kool veroorzaakt, overleving was na korte blootstelling aan PBS met ClO_2 . De verschillende experimenten maken duidelijk dat monitoring van ClO_2 tijdens de ontsmetting absoluut noodzakelijk is. Wanneer er onverwacht snelle afbraak plaats vindt zal er namelijk geen ontsmettingseffect waarneembaar zijn.

Uit het vierde experiment bleek dat inactivering van CGMMV door ClO_2 goed mogelijk was bij hoge inoculum verdunning. Het bleek echter wel dat complete afbraak van CGMMV door ClO_2 in relatief zwaar besmette lagere verdunningen niet mogelijk was. In het experiment werd niet goed duidelijk tot welke eindconcentratie het oorspronkelijke inoculum infectieus was omdat zelfs na bijna 8 miljoen x verdunning alle drie geïnoculeerde planten symptomen vertoonden in de onbehandelde controle. Gesteld kan worden dat de hoeveelheid CGMMV virions zeer hoog moet zijn geweest. Bij gebruik van 10 en 5 ppm ClO_2 ontsmetting werden er geen zieke planten meer aangetroffen vanaf resp. de 12.500x en 312.500x verdunning. Dit betekent dat er na een 10 en 5 ppm ClO_2 behandeling tenminste een factor 625x en 25x verminderde infectieusiteit was t.o.v. de onbehandelde verdunningen.

Het is bekend dat tobamovirussen, waaronder TMV, ToMV en CGMMV, zeer stabiele virussen zijn en gedurende lange tijd infectieus kunnen blijven. In het experiment bleek CGMMV zelfs na een relatief lange blootstelling (5 minuten) aan een hoge concentratie ClO_2 (zelfs rond 10 ppm) nog infectieus te zijn. Hierbij is het duidelijk dat er een concentratie effect aanwezig was omdat 10 ppm ClO_2 een betere afname gaf dan 5 ppm ClO_2 .

Mechanische transmissie is de manier waarop CGMMV zich snel kan verspreiden door kassen. In de biotoets werd er gebruik gemaakt van carborundumpoeder voor een veel efficiëntere mechanische transmissie. Een belangrijke vraag is derhalve hoe representatief dit experiment is voor praktijkomstandigheden omdat er gewerkt met zwaar besmet bladextract met zeer veel viraal en planteneiwit. Het is hierbij logisch dat er bij lage verdunning ook versnelde afbraak plaats vindt van ClO_2 van planteneiwitten waardoor er minder virus afgebroken kan worden. Het is wel opmerkelijk dat de ClO_2 monitoring aangeeft dat er na meer dan 500x verdunning van het extract nog veel ClO_2 aanwezig was en dat dit blijkbaar niet leidt tot complete inactivering van al het virus. Dit suggereert dat CGMMV relatief resistent is tegen ClO_2 t.o.v. verschillende bacteriën die in aanvullende onderzoek zijn meegenomen. In de praktijk zou ClO_2 ontsmetting goed kunnen werken wanneer de hoeveelheid infectieus CGMMV relatief beperkt is. Dit dient nagegaan te worden in aanvullend onderzoek.

CGMMV afbraak door ClO_2 werd duidelijk waargenomen in het experiment wanneer er relatief sterk verdunde virusextracten werden gebruikt. Bij relatief lage verdunning van de virusextracten was complete inactivering niet mogelijk.

Gezien de resultaten zijn er duidelijke perspectieven om middels ClO_2 het watergeefstelsysteem schoon te houden. Belangrijk daarbij is dan wel dat de hoeveelheid organische stof in het watergeefstelsysteem laag gehouden wordt om reactie met ClO_2 tegen te gaan, omdat anders de effectiviteit van ClO_2 verminderd wordt. Er is echter nog geen toelating voor deze toepassing in de tuinbouw.