Het effect van verschillende bewaar-omstandigheden van bollenafval op de groei en verspreiding van *A.fumigatus* en de toepasbaarheid in de praktijk

17-08-2022

Wageningen, 17 augustus 2022

Uitgevoerd door:

Léon Jansen[1], Mariana Santos Couta Silva[2], Sijmen Schoustra[2], Bram de Rooij[2], Harry Kager[1] en Bas Zwaan[2]

In opdracht van KAVB, LTO, Nefyto en Ministerie van LNV

1. Schuttelaar & Partners, 2. Laboratorium voor Erfelijkheidsleer WUR.

Redactie en uitgave

Schuttelaar & Partners

Zeestraat 84

2518 AD Den Haag

Nederland

t +31 (0) 70 318 44 44

f +31 (0) 70 318 44 22

info@schuttelaar.nl

www.schuttelaar.nl

© 2022 Schuttelaar & Partners B.V.

Schuttelaar & Partners is onderdeel van de Healthy World Cooperation.

Inhoudsopgave

Management samenvatting 6
1. Inleiding 7
1.1 aanleiding en doel 7
1.2 Verantwoording 7
1.3 Achtergrond informatie 9
2. Aanpak 11
2.1 Kwalitatief onderzoek naar de praktische toepasbaarheid van de nieuwe voorschriften 11
2.2 Kwantitatief onderzoek naar de toepassing van de huidige voorschriften van het protocol of alternatieven in de sector 12
2.3 Experimenteel onderzoek naar (A) de effectiviteit van het protocol en pilots voor mogelijke alternatieven voor het voorkómen van groei en ontwikkeling van (resistente) *Aspergillus fumigatus* tijdens de opslag en verwerking van bollenafval (B) verspreiding door de lucht 12
3. Bevindingen 17
3.1 Kwalitatief onderzoek naar de praktische toepasbaarheid van het protocol 17
3.1.1 Bevindingen over praktische uitvoering van het protocol 17
3.1.2 Het continu afdekken van de afvalhoop 17
3.1.3 Het na maximum twee weken afvoeren of verwerken van de afvalhoop 17
3.1.4 Administratie afvalhopen, keren van hopen en temperatuurregistratie 18
3.2 Resultaten kwantitatief onderzoek naar het protocol onder telers 18
3.2.1 Belangrijkste bevindingen uit het kwantitatief onderzoek 19
3.2.1.1 Bekendheid met het protocol 19
3.2.1.2 Is het lastig om met het protocol te werken? 19
3.2.1.3 Andere manier van bewaren van de afvalhoop? 20
3.3 Metingen van *A. fumigatus* groei en fractie resistentie in bewaarhopen onder verschillende condities 21
3.3.1.1. Totale hoeveelheid schimmels 22
3.3.1.2 Duiding resultaten van metingen hoeveelheid sporen in experimentele bewaarhopen. 27
3.3.1.3 Aantallen gevonden schimmelsporen in experimentele opstelling voor leliemateriaal uitgevoerd bij Wageningen Universiteit 29
3.3.1.4 Duiding van resultaten 31
3.3.2.1 Fractie resistentie 31
3.3.2.2 Duiding van resultaten fractie resistentie 32
3.3.3.1 Temperatuur 32
3.3.3.2 Duiding van resultaten temperatuurmetingen 33
3.3.4.1. Vochtgehalte 33
3.3.4.2 Duiding van resultaten vochtgehalte 33

3.4.1 Verspreiding van *A. fumigatus* door de lucht 34
3.4.2 Duiding van resultaten voor luchtmetingen 35
3.5 Synthese van resultaten en conclusies 36
3.6 Open vragen, toekomstig onderzoek 37
3.6.1 Nat maken, wat is precies het effect of groeivermindering en het effect of verminderde verspreiding naar de lucht? 37
3.6.2 Transmissieroutes 38
3.7 References 39
4. Samenvatting en advies 41
Bijlage 1 Informatieblad voor telers 44
Bijlage 2 Vragenlijst on-line onderzoek 45

Management samenvatting

Vanaf 1 maart 2021 zijn aan de gebruiksvoorschriften van azoolhoudende middelen die gebruikt worden in de bollenteelt een aantal voorschriften (het protocol) toegevoegd die erop gericht zijn om het ontstaan en verspreiding van azolen-resistente *Aspergillus fumigatus* (A. *fumigatus*) te voorkomen. Dit project onderzocht in welke mate het protocol effectief was in de remming van de groei en verspreiding van *A.fumigatus,* de remming van de vorming van de azolenresistente A.fumigatus en de uitvoerbaarheid van het protocol voor de telers. Daarnaast werd de werkwijze volgens protocol vergeleken met de opslag van bollenafval die tot voor kort mocht worden toegepast en enkele mogelijke alternatieven voor de opslag van afval. Daarnaast is onder telers onderzocht in welke mate verschillende stappen van het protocol goed uitvoerbaar waren en bij knelpunten is doorgevraagd waarom iets knellend was en welke mogelijke alternatieven toegepast zouden kunnen worden.

Uit de experimenten met afvalhopen die volgens het protocol (en langer) werden bemonsterd bleek dat het afdekken van afvalhopen geen remmend (en soms zelfs een verhogend) effect had op de schimmelgroei. Tevens bleek dat al in het begin van de twee weken opslag er grote aantallen schimmelsporen in de afvalhoop kunnen zitten en dat deze aantallen na de twee weken niet veel groter worden. Dit betekent dat het nut van het direct afdekken en binnen twee weken verwerken van het bollenafval niet onderbouwd kan worden. Daarnaast waren er, zo bleek uit het onderzoek onder telers, ook veel praktische problemen met deze aspecten van het protocol.

Al bij de start van de afvalhopen worden hoge percentages resistente sporen gevonden. Dit betekent waarschijnlijk dat de resistentie waarschijnlijk niet ontstaat door de opslag, maar dat de opslag zorgt voor een selectieve groei van de resistente schimmel. Het protocol helpt dus niet tegen de vorming van resistentie van de schimmel.

Er is een verschil in het vochtgehalte wat vrijkomt uit voorjaarbloeiers (tulp) en uit najaarbloeiers (gladiolen, lelie). Leliemateriaal in afvalhopen is beduidend natter en bevat 10 tot 100 keer minder sporen dan tulpenafval. Van de geteste alternatieven bleek dat het nathouden van de afvalhoop ervoor zorgt dat de groei van de schimmel wordt geremd. Luchtmonsters windafwaarts van afvalhopen lieten zien dat uit onberoerde hopen weinig sporen vrijkomen. Afdekken is hiervoor niet nodig. Bij het omzetten van de hopen komen veel meer sporen vrij, tenzij de afvalhoop erg nat is. Het nathouden van de hoop kan dus ook de verspreiding tegengaan. Dit betekent dat het nathouden van de afvalhopen dus op twee manieren de verspreiding van de schimmel reduceert: door de groei van resistente schimmel in de hoop al te remmen en door de verspreiding tijdens het omzetten van de hoop te beperken. We denken als onderzoekers hiermee een praktisch uitvoerbare oplossing te hebben om de verspreiding van *A.fumigatus* uit bollenafval aanzienlijk te verminderen.

De aspecten in het protocol aangaande de compostering zijn goed uitvoerbaar. We adviseren de registratie van de temperatuur boven de 60 graden in drie periodes van compostering, waartussen de hoop twee keer moet worden omgezet. De start- en omzettingsdata van de hoop en de registratie van de temperaturen moeten dan worden vastgelegd. Wanneer het bollenmateriaal daadwerkelijk van eigenaar wisselt zou een verklaring organisch restmateriaal of een passage in de begeleidingsbrief moeten borgen dat de ontvangende partij zich ervan bewust is dat het om organisch materiaal gaat dat met azolen in aanraking is geweest en dat de behandeling van afval volgens het protocol moet verlopen.

1. Inleiding

1.1 aanleiding en doel

Vanaf 1 maart 2021 zijn aan de gebruiksvoorschriften van azoolhoudende middelen die gebruikt worden in de bollenteelt een aantal voorschriften toegevoegd die erop gericht zijn om het ontstaan en verspreiding van resistente Aspergillus *fumigatus* te voorkomen. Deze voorschriften richten zich op de opslag en verwerking van bloembollenafval en zijn opgenomen in een protocol waar het gebruiksvoorschrift naar verwijst. De achtergrond van deze bepalingen zijn de geconstateerde volksgezondheidsrisico's van infectie met azolen-resistente *A. fumigatus* bij patiënten met een verminderde afweer. In aanvulling hierop zijn er in verschillende afvalhopen van plantaardig materiaal resistente vormen van *A.fumigatus* gevonden. Door het gebruik van azoolhoudende middelen kunnen de opslag en verwerking van bollenafval bijdragen aan de ontwikkeling en verspreiding van resistente *A*. fumigatus.

Er was tot op heden onvoldoende wetenschappelijke onderbouwing of de nieuwe voorschriften voldoende effectief zijn en of deze in de praktijk toegepast kunnen worden. Betrokken stakeholders KAVB, Nefyto, Ctgb, NVWA en de ministeries LNV en I&W hebben een overgangsperiode afgesproken dat afliep op 31 december 2021. In deze periode werden de nieuwe voorschriften toegepast, en werd tevens nader onderzoek verricht naar (i) de effectiviteit en praktische toepasbaarheid van de nieuwe voorschriften in de vorm van een uit te voeren monitoring onder bollentelers en (ii) andere binnen de sector gebruikte manieren van opslag en verwerking van bollenafval en effectiviteit daarvan om het ontstaan en verspreiden van resistente *A. fumigatus* tegen te gaan. Tevens werd (iii) geïnventariseerd in hoeverre de huidige voorschriften van het protocol in de opslag en verwerking van bollenafval door de telers worden toegepast en wat de binnen de sector gebruikte manieren van opslag en verwerking van bollenafval zijn.

Bovengenoemde onderzoeksrichtingen moeten leiden tot enerzijds het inzicht of de huidige voorschriften van het protocol effectief en inpasbaar zijn, en anderzijds of er effectieve alternatieven zijn die handelingsperspectief bieden aan de telers. Tevens zal een overzicht worden opgeleverd over de toepassing van de huidige voorschriften van het protocol door de bollensector en binnen de sector gebruikte manieren van opslag en verwerking van bollenafval. Deze inzichten moeten leiden tot voorschriften die zich ervoor lenen om waar nodig te worden opgenomen in het protocol waar het gebruiksvoorschrift van azoolhoudende middelen naar verwijst.

1.2 Verantwoording

Deze rapportage is een resultante van de samenwerking tussen Schuttelaar & Partners (S&P) en het Laboratorium voor Erfelijkheidsleer van Wageningen UR. Léon Jansen (S&P) was projectleider en verantwoordelijk voor het kwalitatieve en kwantitatieve onderzoek onder telers en de eindconclusies en aanbevelingen. Sijmen Schoustra coördineerde het wetenschappelijk onderzoek en is verantwoordelijk voor het hoofdstuk over het experimentele onderzoek (Hoofdstuk 3.3).

Tijdens dit project is veelvuldig overlegd met een projectgroep waarin de opdrachtgevers vertegenwoordigd waren en met een werkgroep waarin vertegenwoordigers van Ctgb, NVWA en het Ministerie van I&W aanwezig waren.

Hoofddoel van het project was het evalueren of het protocol (bollenafval maximaal twee weken afgedekt bewaren en dan afvoeren of verwerken) leidde tot een lagere groei en lagere verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus* en hoe effectief en uitvoerbaar dit is in vergelijking met bestaande of alternatieve manieren van opslag en verwerking van het bollenafval. Bij de start van het project is ervoor gekozen ook pilotonderzoek te doen naar mogelijke alternatieven voor de voorschriften in het

protocol in het geval het protocol niet zou leiden tot verminderde groei en verspreiding van azoolresistente *A*. *fumigatus*. De alternatieven waren het later afdekken van bewaarhopen en het natmaken van bewaarhopen.

Om knelpunten in de uitvoerbaarheid van het protocol en mogelijke alternatieven in beeld te brengen zijn eerst kwalitatieve interviews gehouden met vooral telers. Op basis van inzichten uit de interviews, aangevuld met de wetenschappelijke inzichten, zijn enkele bewaarmethoden getoetst op de groei van en aanwezig percentage resistentie tegen azolen. Omdat in de periode waarin het project startte de laatste tulpen werden gerooid, moest snel een proefopzet gemaakt worden om verschillende bewaarmethoden van de afvalhopen te volgen door wekelijks te bemonsteren. Hierbij is gekozen voor het experimenteel volgen van bollenafval bewaard onder de onderstaande condities, waarbij het in kaart brengen van alternatieven niet op alle bollenbedrijven zijn uitgevoerd.

1. Opslag van afval zonder verdere andere activiteiten. Dit is de controle afvalhoop zoals bij de telers het gewoonlijk wordt bewaard. Afval wordt gewoon op een hoop gedaan.
2. Opslag volgens het protocol. De hoop wordt direct afgedekt en wekelijks (dus ook na twee weken bewaren) bemonsterd. Na twee weken zou deze hoop verwerkt moeten worden, maar het is belangrijk om te weten wat er verder met de schimmel in deze hoop gebeurd als deze langer blijft bestaan. Dit omdat vaak de afvalhopen ook langer blijven liggen. De twee weken grens werd in interviews door telers ook als slecht uitvoerbaar gekenmerkt. De afgedekte bewaring is daarom, ten behoeve van de meetgegevens, voortgezet tot 10 of 12 weken.
3. Afdekken na twee weken. Deze variant is gekozen omdat het direct afdekken vanaf dag 1 als erg lastig werd benoemd omdat er steeds afval moet worden toegevoegd aan de afvalhopen. Het is beter werkzaam als de hoop stap na stap kan worden opgebouwd tot de uiteindelijke hoogte en daarna pas wordt afgedekt. Dit zou na twee weken kunnen plaatsvinden. Deze variant meet dus het effect van een vertraagde afdekking van een afvalhoop.
4. Nat maken. Een meer natte hoop zorgt mogelijk dat de groei van *A.fumigatus wordt geremd*. Om dit te testen werd een afvalhoop twee keer per week gedurende de gehele periode nat gemaakt.
5. Container. Een mogelijke opslagmogelijkheid voor het afval kan een sleufsilo zijn, vergelijkbaar met kuilvoer. In deze sleuf kan afval worden verzameld tot de rand van de sleuf, waarna het afgedekt kan worden. We hebben dat geprobeerd na te bootsen door het afval in een container te storten en die af te dekken. Het gaat hier dus om het (later) afdekken van materiaal in een meer gesloten omgeving.

Het kiezen voor deze varianten van opslag van afval, betekent dat niet specifiek is gekozen om één alternatieve methode tot in detail te onderzoeken. Hiervoor is gekozen omdat dit enerzijds meer voorbereiding zou vragen en die tijd was niet beschikbaar. Anderzijds zou dan de mogelijkheid bestaan dat een verkeerde keuze zou zijn gemaakt en het gekozen alternatief dan niet zou blijken te werken. Door verschillende opties te onderzoeken bestond de kans om een effectieve opslagmethode te vinden die ook uitvoerbaar is door de telers. Dit betekent ook dat niet eerst via fundamenteel onderzoek naar de effecten van temperatuur en vochtigheid in verschillende bollenmaterialen is gekeken. Wanneer dit eerst onderzocht en daarna pas in de praktijk getest zou moeten worden, was er meer tijd nodig geweest. Dit paste niet in de beperkte tijdsduur van dit project met het oog op de tijdelijke regeling van het protocol.

Tijdens de eerste proeven met tulpenmateriaal werd duidelijk dat verspreiding van schimmelsporen in de lucht een belangrijk aanknopingspunt was. Aan het eind van de proef met tulpenafval zijn daarom luchtmetingen gedaan wind afwaarts van een afvalhoop die onberoerd was. Daarna is

tijdens de omzetting van de hoop ook gemeten hoeveel sporen er in de lucht komen. Deze proef is later met leliemateriaal herhaald om zo ook het effect van natmaken op de verspreiding tijdens omzetten van de hoop in kaart te brengen.

1.3 Achtergrond informatie

De schimmel *Aspergillus fumigatus* komt van nature in het milieu voor, met name in dood plantenmateriaal waar het een belangrijke rol speelt in de afbraak ervan. *A. fumigatus* produceert veel sporen die zich verspreiden door de lucht en kunnen worden ingeademd. Gezonde mensen ondervinden hier geen last van aangezien het natuurlijke immuunsysteem hiertegen een goede bescherming biedt. Soms kan *A. fumigatus* een infectie van de luchtwegen veroorzaken, onder andere bij mensen met een verzwakt immuunsysteem. Deze infecties zijn relatief zeldzaam, maar hebben een slecht verloop als deze infectie niet adequaat wordt behandeld. Medische behandeling vindt plaats door het toedienen van antischimmelmiddelen, sinds 1980 de klasse van medische triazolen.

In de afgelopen jaren is een verhoogd aantal infecties veroorzaakt door deze ziekteverwekker gemeld bij patiënten met een verzakt immuunsysteem en/of patiënten met longaandoeningen. In de afgelopen 12 jaar is een verviervoudiging van invasieve aspergillose (IA) waargenomen. In 1992 was IA verantwoordelijk voor ongeveer 30% van de schimmelinfecties bij patiënten die stierven aan kanker, en naar schatting komt IA voor bij 10 tot 25% van alle leukemiepatiënten (Látge, 1999). Bij deze patiënten worden tri-azolen gebruikt als geneesmiddel om *A. fumigatus* te bestrijden. Sinds de introductie in Nederland werden in 1998 triazoolresistente *A. fumigatus* - isolaten gevonden en sindsdien is er in veel landen wereldwijd resistentie gemeld. Gelijktijdige infecties met Aspergilllus zijn ook gemeld bij gevallen van ernstige griep en COVID-19 (Arastehfar *et al* ., 2020) en dragen bij aan een hogere morbiditeit.

Sinds 1998 blijkt in toenemende mate dat behandeling van patiënten lastig is doordat de schimmel resistent is tegen triazolen al voordat de patiënt deze toegediend heeft gekregen voor behandeling. Terwijl meerdere genetische mechanismen van resistentie in principe mogelijk zijn, hebben schimmels geïsoleerd uit patiënten altijd resistentie door mutaties in het gen *CYP51*. Hierbij gaat het om een uniek genetisch mechanisme dat twee genetische veranderingen vraagt, namelijk een zogenoemde tandem repeat in de promotor van het gen en verschillende puntmutaties in het structurele gedeelte van het gen.

Vanaf 1990 zijn door het Ctgb azolen toegelaten die chemisch erg lijken op medische azolen en die voor veel verschillende toepassingen worden gebruikt in landbouw en bescherming van producten tegen schimmelgroei. Azolen die chemisch erg lijken op de medisch toegepaste azolen worden voor een breed scala aan toepassingen gebruikt. Onderzoek heeft uitgewezen dat het gebruik van azolen voor toepassingen in de landbouw en houtverduurzaming leidt tot resistentie tegen deze azolen met kruisresistentie tegen medische azolen. Terwijl er meerdere genetische mechanismen mogelijk zijn, hebben resistente *A. fumigatus* uit het milieu dezelfde unieke genetische veranderingen als in resistente *A. fumigatus* uit patiënten.

Er is aangetoond dat dood plantaardige materiaal ideale omstandigheden bieden voor de groei van *A. fumigatus*. Hierbij is de mate uitgroei van deze schimmel afhankelijk van specifieke groeiomstandigheden, met name mate van vochtigheid en temperatuur. Als dit materiaal ook residuen van azool-fungiciden bevat, bevordert dit de groei, reproductie en verspreiding van triazool-resistente mutanten van *A. fumigatus* vanuit het milieu richting patiënten (Verweij *et al* . 2017). Er is wereldwijd onderzoek gedaan om de ontwikkeling van azoolresistentie te begrijpen en de

mechanismen erachter te evalueren (Hoken *et al* ., 2019). Eerder onderzoek heeft aangetoond dat opslag van rottend plantaardig materiaal een reservoir kan vormen voor groei en verspreiding van *A. fumigatus*, inclusief de verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus* (Schoustra *et al*. 2019). Het ontstaan en verspreiden van resistentie hangt af van de groeiomstandigheden, zoals duur van incubatie, temperatuur en vochtigheid. Als een resistentie eenmaal is ontstaan, kan resistente *A. fumigatus* zich handhaven in het milieu. Inmiddels zijn er aanwijzingen uit pilot onderzoek dat resistente *A. fumigatus* in lage aantallen aanwezig zijn in het milieu, ook op plekken waar geen (hoge concentraties van) azolen zijn. In ander lopend onderzoek wordt dit momenteel nader in kaart gebracht.

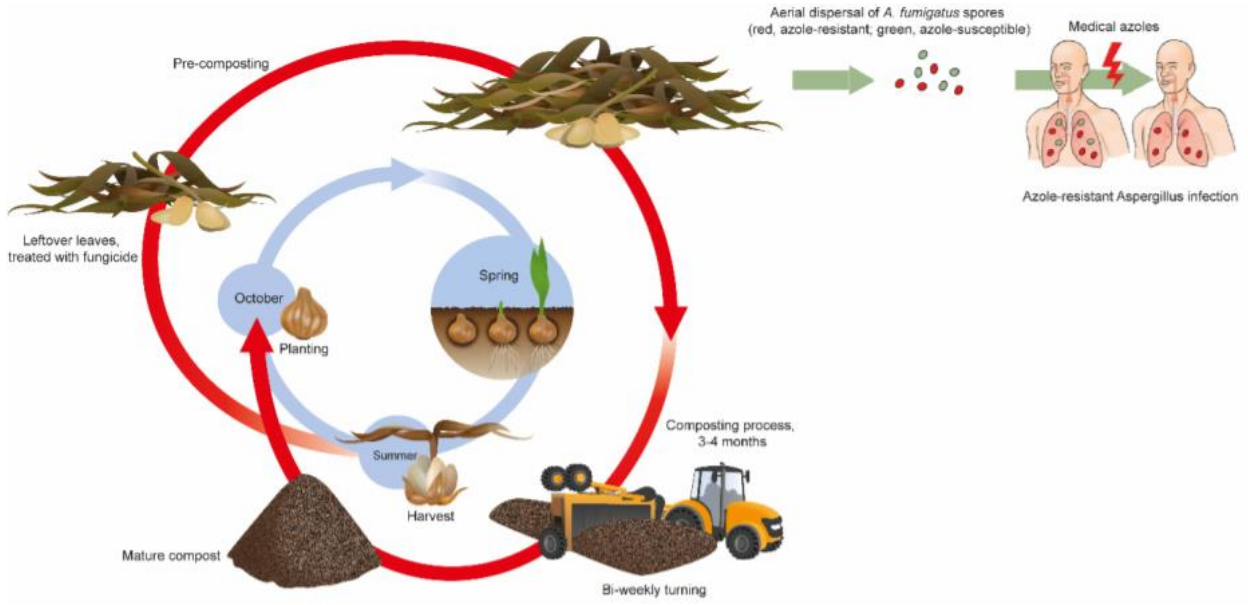


Fig.1 Beginnende circulariteit zoals toegepast op veel bedrijven in de bollensector. Het opslaan van bollenafval in een bewaarhoop wordt ook wel pre-composting genoemd.

In gewasbescherming worden azolen gebruikt om schimmels als *Fusarium* en *Botrytis* te bestrijden, zoals in de bollenteelt, fruitteelt en uien en dergelijke. Door drift kunnen de azolen ook op niet-agrarisch gebied zoals bermen en natuurgebied terechtkomen. Bij de behandeling van hout worden ook azolen gebruikt. Indien verduurzaamd hout wordt toegepast in bermen, watergangen en de groenvoorziening kan dit mogelijk leiden tot verspreiding van deze azolen naar het maaisel en bladrestanten uit deze terreinen. Door deze verschillende toepassingen van azolen kan *A. fumigatus* in aanraking komen met azolen met selectie voor resistentie als gevolg, ook bij relatief lage concentraties azolen. Deze selectie kan eruit bestaan dat er nieuwe resistentie ontstaat of dat al bestaande resistente schimmels zich selectief vermeerderen op deze plekken. Op deze manier kunnen deze toepassingen een reservoir vormen voor *A. fumigatus* populaties die azoolresistent zijn en waaruit resistente schimmelsporen zich door de lucht kunnen verspreiden.

Onderzoek wijst uit dat blootstelling van de schimmel aan azolen die in het milieu voorkomen een bron is van resistentie tegen medische azolen. Hier wordt *A. fumigatus* aangetroffen met dezelfde resistentiemutaties als die gevonden worden in patiënten (in het *CYP51A*-gen). Deze bronnen zijn geclassificeerd als “hotspots” voor resistentieontwikkeling wanneer *A. fumigatus* er veel in voorkomt, er gedurende langere tijd groei kan optreden én als er azolen aanwezig zijn. Enkele van deze zijn restanten van houtverduurzaming, afval uit de bollenteelt, afval van uienteelt en fruitteelt.

Recent onderzoek heeft uitgewezen dat azoolresistente *A. fumigatus* die zijn verkregen uit hotspots van uien- en fruitteelt ook dezelfde genetische mutaties hebben als azoolresistente *A. fumigatus* uit de bollenteelt. Dit laat zien dat er in het milieu meerdere hotspots zijn voor resistentieontwikkeling, zowel het ontstaan ervan als het selectief vermeerderen van resistente *A. fumigatus* die in lage aantallen aanwezig zijn.

In het licht van de bevindingen van hotspots uit de bollensector, heeft het Ctgb een nieuw protocol opgesteld voor de verwerking van bolafval van met azolen behandelde bollen. In het protocol is bepaald dat organisch materiaal van bollen en andere planten die met azolen zijn behandeld, maximaal 14 dagen op het terrein mag worden opgeslagen en dat dit materiaal afgedekt moet worden en niet aan open lucht mag worden blootgesteld. Het protocol is in maart 2021 in werking getreden, met een respijtperiode tot 31 december 2021 om toezicht te kunnen houden op de effectiviteit van het nieuwe protocol bij het voorkomen van de opkomst en verspreiding van resistente *A. fumigatus* uit rottend plantaardig materiaal dat azolen bevat. Dit project richt zich op compost uit de tulpen- en lelieteelt.

Om de effectiviteit van het protocol te evalueren is een zogenaamd ' monitoringprogramma ' geïmplementeerd. Hier zijn verschillende hopen rottend plantaardig materiaal onderzocht op groei van *A. fumigatus,* zijn fractie azoolresistentie, ofwel het percentage van alle gemeten schimmels (CFU) dat resistent is tegen azolen, en factoren die de mate van groei zouden kunnen beïnvloeden. Dit omvatte andere mogelijke manieren om het plantmateriaal te bewaren voor verdere verwerking. Een deel van de experimenten vond plaats van juni 2021 tot december 2021, een ander deel begon in november 2021 en loopt door tot juli 2022.

2. Aanpak

Binnen dit project zijn de activiteiten op te splitsen in drie onderdelen:

1. Kwalitatief onderzoek naar de praktische toepasbaarheid van de nieuwe voorschriften;
2. Kwantitatief onderzoek naar de toepassing van de huidige voorschriften van het protocol of alternatieven in de sector
3. Experimenteel onderzoek naar de effectiviteit van het protocol. Daarnaast pilots om (a) mogelijke alternatieven voor het protocol voor opslag van afvalmateriaal in kaart te brengen met als doel het voorkómen van groei en ontwikkeling van (resistente) *Aspergillus fumigatus* tijdens de opslag en verwerking van bollenafval en (b) pilots om verspreiding van schimmelsporen te meten in de lucht vanuit (on)beroerde bewaarhopen, die zijn bewaard onder verschillende condities.

De aanpak van de verschillende onderdelen is hieronder verder beschreven.

2.1 Kwalitatief onderzoek naar de praktische toepasbaarheid van de nieuwe voorschriften

Om de praktische uitvoerbaarheid van de nieuwe voorschriften uit het protocol te onderzoeken, zijn 23 telers uit verschillende regio's benaderd en geïnterviewd. Hierbij werden stap voor stap de voorschriften uit het protocol besproken en gevraagd in welke mate deze stappen uitvoerbaar waren en waarom eventueel niet. Bij de selectie van bedrijven is rekening gehouden met regionale spreiding en met het soort bollen (voorjaarbloeiers en najaarbloeiers) dat geteeld wordt. Telers die

bevraagd zijn kwamen uit de regio Hillegom, uit de kop van Noord-Holland, en uit Noordoost polder/Friesland/Overijssel. In overleg met de KAVB is aangenomen dat hiermee telers van verschillende soorten bloeiers en bijbehorende handelswijzen met betrekking tot het afval gerepresenteerd waren. Dit is door verschillend geïnterviewde personen bevestigd. Ook zijn een drietal bedrijven geïnterviewd die werkzaam zijn bij de verzameling en/of verwerking van bollenafval (GP groot, Fam P Muntjewerf en Co, Compost Systems en de brancheverenigingBVOR).

De inzichten uit deze enquêtes zijn gebruikt voor de inventarisering van het gebruik van het protocol of andere manieren van opslag en verwerking van het bollenafval (zie 2.2) en de opzet van het experimenteel onderzoek (zie 2.3).

2.2 Kwantitatief onderzoek naar de toepassing van de huidige voorschriften van het protocol of alternatieven in de sector

Ter inventarisatie van de bekendheid, het gebruik en de mogelijke problemen die telers ondervinden bij het gebruik van het protocol is een kwantitatieve enquête uitgezet onder leden van de KAVB. De link voor invulling van de enquête is verspreid via onder andere de nieuwsbrief aan alle leden. In totaal hebben 107 bedrijven de enquête ingevuld. De KAVB geeft aan ongeveer 500 actieve telers in haar bestand te hebben, hetgeen het responspercentage ongeveer 20% maakt. De vragenlijst van de enquête is te vinden in bijlage 2.

2.3 Experimenteel onderzoek naar (A) de effectiviteit van het protocol en pilots voor mogelijke alternatieven voor het voorkómen van groei en ontwikkeling van (resistente) *Aspergillus fumigatus* tijdens de opslag en verwerking van bollenafval (B) verspreiding door de lucht

A. Metingen van *A. fumigatus* groei en fractie resistentie in bewaarhopen onder verschillende condities

Bij de geïnterviewde bedrijven is allereerst gevraagd of ze wilden en konden meewerken aan wetenschappelijke toetsing om de ontwikkeling van (resistente) *A. fumigatus* in afvalhopen onder verschillende omstandigheden te onderzoeken. Op basis van deze contacten is een aantal bedrijven bereid gevonden om hieraan hun medewerking te verlenen. Op deze bedrijven zijn experimentele bewaarhopen opgezet. Daarnaast zijn er vergelijkbare experimentele bewaarhopen opgezet bij UniFarm, Wageningen Universiteit.

Samen met de projectleider is besproken welke bewaaromstandigheden in het onderzoeksprotocol meegenomen zouden moeten worden. De gebruikelijke omstandigheden op een bedrijf en de opslag volgens protocol waren op voorhand onderdeel van de proefopzet. Varianten in afdekken en vochtigheid zijn de mogelijkheden waarmee de schimmelgroei te beïnvloeden is in de afvalhopen. Medio oktober-december is besloten dit ook zo op te zetten met afval van lelie- en gladiolenteelt. Voor deze proef is bij drie bedrijven een vergelijkbare opzet toegepast als bij het tulpenafval.

In totaal is er voor 5 opslagomstandigheden gekozen, met meerdere herhalingen per omstandigheid bij meerdere telers, voor het bewaren van bollenmateriaal in afwachting van verdere verwerking (als bewaarhopen).

1. Protocol. Opslag volgens het protocol. De hoop wordt direct afgedekt. Na twee weken zou deze hoop verwerkt moeten worden, maar het is belangrijk om te weten wat er verder met de schimmel in deze hoop gebeurd als deze langer blijft bestaan. Dit omdat de afvalhopen in

de praktijk langer blijven liggen totdat ze worden bewerkt en/of uitgereden. De twee weken grens werd in interviews door telers ook als slecht uitvoerbaar gekenmerkt. De afgedekte bewaring is daarom voortgezet tot 10 of 12 weken.

2. Controle. Opslag van afval zonder verdere andere activiteiten. Dit is de controle afvalhoop zoals bij de telers het gewoonlijk wordt bewaard. Afval wordt gewoon op een hoop gedaan.
3. Afdekken. Afdekken na twee weken. Deze variant is gekozen omdat het afdekken als erg lastig werd benoemd omdat er steeds afval moet worden toegevoegd aan de afvalhopen. Het is beter werkzaam als de hoop stap na stap kan worden opgebouwd tot de uiteindelijke hoogte en daarna pas wordt afgedekt. Dit zou na twee weken kunnen plaatsvinden. Deze variant meet dus het effect van een vertraagde afdekking van een afvalhoop.
4. Nat maken. Een meer natte hoop kan de groei van *A. fumigatus* remmen. Om dit te testen werd een afvalhoop twee keer per week gedurende de gehele periode nat gemaakt met 50 L (tulpenmateriaal) tot 30 L (leliemateriaal) water per m3 materiaal.
5. Container. Een mogelijke opslagmogelijkheid voor het afval kan een sleufsilo zijn, vergelijkbaar met kuilvoer. In deze sleuf kan afval worden verzameld tot de rand van de sleuf, waarna het afgedekt kan worden. We hebben dat geprobeerd na te bootsen door het afval in een container te storten en die af te dekken.

Bovenstaande opslagen zijn dus ingezet om het effect op groei en resistentie van *A*. *fumigatus* te meten. Deze condities zijn toegepast bij meerdere bollentelers en met twee soorten afval: tulpenmateriaal (voorjaarsbloeiers, tabel 1) en leliemateriaal/gladiolenmateriaal (najaarsbloeiers, tabel 2). Afvalhopen van ongeveer 3 m lang en 1,5 m hoog werden gevormd. Hierbij werden wekelijks monsters in drievoud genomen uit de hopen. Sommige telers hebben geen bemonstering verricht direct na het aanleggen van de hoop, hier is het eerste meetpunt week 1. De volgende metingen werden verricht voor deze monsters:

1. Totale hoeveelheid schimmels (*A. fumigatus* sporen per gram materiaal – CFU/g)
2. Fractie (%) van schimmels dat resistent is tegen azolen, als fractie van totale CFU/g
3. Temperatuur (continue meting)
4. Vochtigheid van materiaal

Er zijn geen metingen gedaan naar hoeveelheid aanwezige azolen. Niet alle behandelingen zijn uitgevoerd door alle telers, sommige telers hadden onvoldoende afvalmateriaal om alle behandelingen in te kunnen zetten. Tabellen 1 en 2 geeft hiervan een overzicht.

Tabel 1: Overzicht van de proefopzet met tulpenafval.

Bewaring	Aantal hopen totaal	Bij aantal telers (max 2/teler)	looptijd
a) Protocol	3	3	12 weken *
b) Controle	4	4	12 weken
c) Afdekken	3	3	12 weken
d) Nat	4	4	12 weken
e) Container	1	1	12 weken

* Hierbij is het 2 weken meetpunt belangrijk in verband met het protocol.

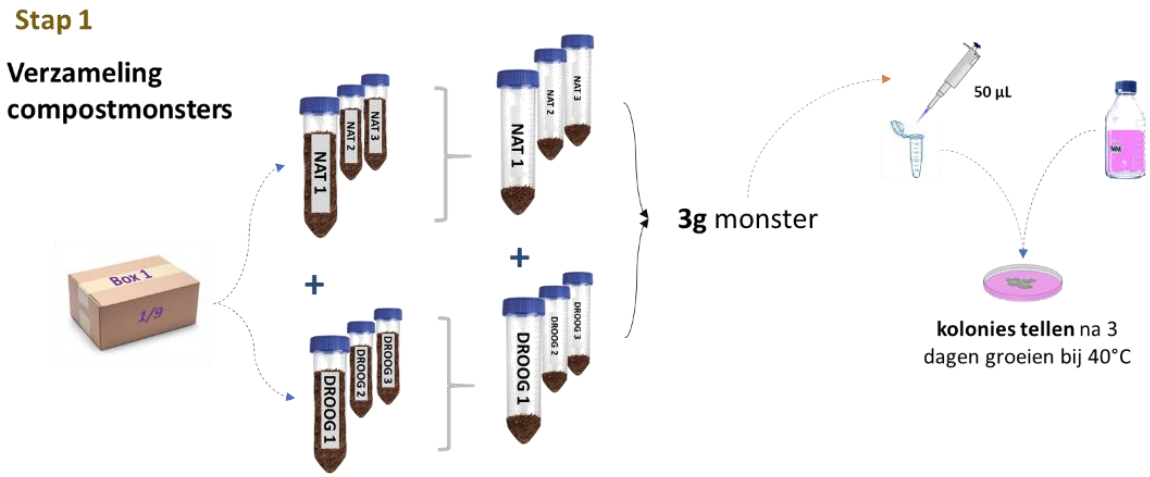
NB. In de eerste drie weken van de proeven met tulpenmateriaal regende het hard. In de weken daarna is vergeten de hopen goed nat te maken bij telers B en D. Daarom is na 6 weken ingegrepen en zijn de hopen alsnog goed nat gemaakt voor aanvullend 6 weken. Daarom duurde de proef hier 12 weken in totaal. De data van natgemaakt materiaal en niet-natgemaakt materiaal zijn samengevoegd (zie later). Zo konden deze data gebruikt worden in de totale set aan data.

Tabel 2: Overzicht van de proefopzet met afval van lelies en gladiolen.

Bewaring	Aantal hopen totaal	Bij aantal telers (max 2/teler)	looptijd
a) Protocol	5	3	10 weken *
b) Controle	5	3	10 weken
c) Afdekken	5	3	10 weken
d) Nat	5	3	10 weken
e) Container	1	1	10 weken

* Hierbij is het 2 weken meetpunt belangrijk in verband met het protocol.

Experimentele en analysemethoden



Bemonstering

Elke week werd elke experimentele bewaarhoop bemonsterd. Deze bemonstering werd op drie verschillende plaatsen van elke hoop uitgevoerd, dus steeds drie replica's per bewaarhoop per tijdpunt. Na het labelen werden de monsters bewaard bij 4°C totdat ze werden verzameld en naar WUR-faciliteiten werden gebracht. Hier werd drie gram van het materiaal gewogen en gebruikt voor analyse.

Totale hoeveelheid schimmels (sporen per gram materiaal) en fractie resistentie

Drie gram van elk monster werd gebruikt voor het maken van 1 op 10 verdunningen in een zoutoplossing. Van elk van deze verdunningen werd 100 µl op een Petrischaal met groeimedium gebracht. Het groeimedium was het Flamingomedium (Zhang, 2021). Dit selectieve medium verhindert groei van andere schimmels en bacteriën en is een verbeterde versie van de Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar. Hierdoor kunnen we direct het aantal schimmelsporen (in kolonievormende eenheden -CFU) duidelijk tellen. Het gebruik van het antischimmelmiddel, dichloran, beperkt de verspreiding en de koloniegrootte van andere geslachten. Rose Bengal helpt ook bij het verkleinen van kolonies en is selectief tegen bacteriën. Extra selectiviteit tegen bacteriegroei wordt bereikt door de opname van het hittestabiele antibioticum chlooramfenicol. Het kweken van de platen werd uitgevoerd in donkere omstandigheden bij 40 °C, wat algemeen wordt beschouwd als de ideale omstandigheden om *A. fumigatus* selectief te isoleren, aangezien de groei van andere schimmels beperkt is. De kolonies werden geteld na vijf dagen groei.

Naast het gebruik van het groeimedium zoals hierboven, gebruikten we hetzelfde medium met toevoeging van twee azolen, tebuconazol en itraconazol. Ook hier telden we de totale hoeveelheid schimmelsporen na drie dagen groei. In dit geval zullen alleen schimmels die resistent zijn tegen azolen uitgroeien. Door deze aantallen af te zetten tegen de totale hoeveelheid aanwezige schimmelsporen hebben we de fractie resistente schimmels bepaald (Zhang et al 2021) .

Temperatuur

Bewaarhopen zijn voorzien van sensoren die continue de temperatuur hebben gemeten met een meting elke 12 uur. Instructies hoe deze geplaatst moesten worden zijn samen met de sensoren geleverd en besproken.

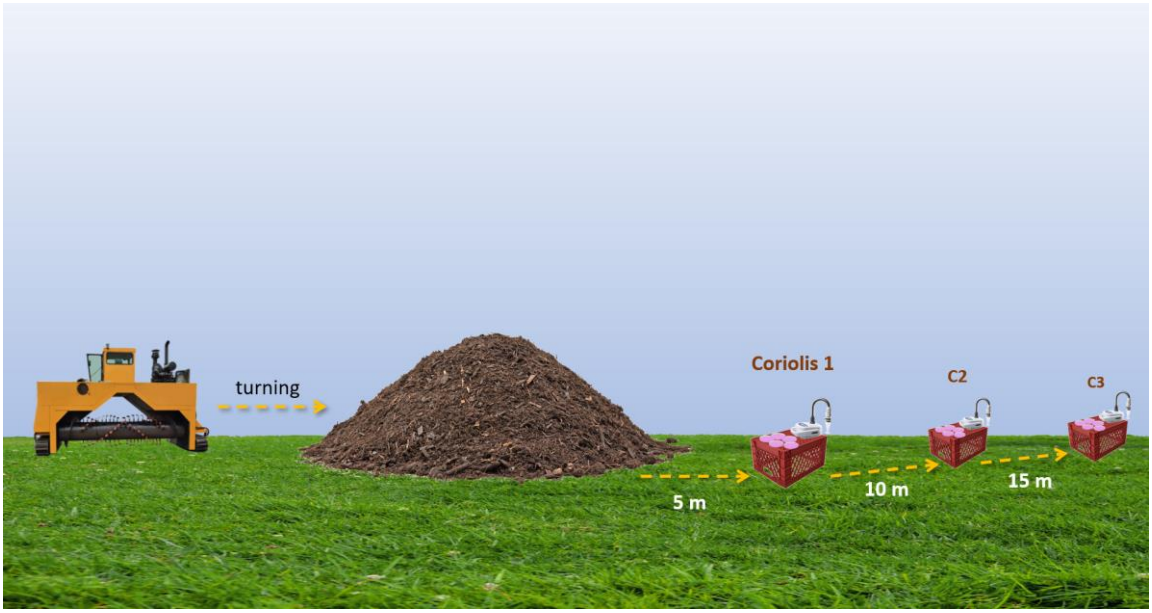
Vochtigheid van het materiaal

Om het vochtgehalte te meten is 3 gram materiaal op een open Petrischaal gebracht en afgewogen. Vervolgens is dit in een oven gezet op 60 graden gedurende ten minste 24 uur om al het vocht te laten verdampen. Na dit verdampen is het gewicht opnieuw gemeten, dit is het drooggewicht. Het verschil tussen oorspronkelijk gewicht en drooggewicht is de waterfractie.

B. Luchtmetingen

Aspergillus-soorten zijn alomtegenwoordige schimmels die enorme hoeveelheden sporen in de lucht afgeven. Ander onderzoek suggereert dat (resistente) *A. fumigatus* zich via de lucht verspreidt vanuit bollenmateriaal (Schoustra et al 2019). Om te onderzoeken of en hoeveel verspreiding er plaatsvindt vanuit bewaarhopen bewaard onder verschillende condities zijn er metingen uitgevoerd van het aantal schimmelsporen in de lucht.

Bij in totaal vier bewaarhopen (1 met tulpmateriaal en 3 met leliemateriaal) is de verspreiding van *A. fumigatus* vanuit de bewaarhoop naar de lucht gemeten, zowel bij een onberoerde hoop als bij dezelfde hopen tijdens omzetten.



De bemonstering van voor dit experiment werd uitgevoerd op de dag waarop de hopen op één boerderij werden gekeerd. Het vangen van de sporen werd uitgevoerd vóór en tijdens het keren, op drie verschillende afstanden (5, 10 en 15 meter) nabij de hooplocatie. Vijf replica's per hoop per afstand werden verzameld, en geanalyseerd op hoeveelheid schimmelsporen door middel van uitplaten als hierboven beschreven. Het keren van de hopen met tulpenmateriaal en met leliemateriaal werd respectievelijk uitgevoerd bij teler C en D.

Binnen in het gebouw, waar de bollen door het personeel van het bedrijf worden gesorteerd en opgeslagen, werden ook sporenmonsters genomen.

3. Bevindingen

3.1 Kwalitatief onderzoek naar de praktische toepasbaarheid van het protocol

Ruim 20 telers zijn geïnterviewd om inzicht te krijgen hoe zij nu het afval van de bollen opslaan en/of verwerken, en wat zij zien aan mogelijkheden en belemmeringen met betrekking tot het volgen van het protocol. Een eerste selectie telers is gemaakt met medewerking van de KAVB om spreiding te hebben van telers van de soorten bollen en van verschillende regio's. Met de opgedane kennis is deze aangevuld met gesprekken met verwerkers van (bollen)afval en met telers uit andere regio's. Ook zijn telers die belden om informatie over het protocol gevraagd om aan een interview mee te werken.

3.1.1 Bevindingen over praktische uitvoering van het protocol

Verschillende stappen van de behandelingen van het afval die in het protocol beschreven zijn, zijn besproken met de telers/verwerkers. Puntsgewijs geven we hier de belangrijkste bevindingen per onderwerp.

3.1.2 Het continu afdekken van de afvalhoop

Het continu afdekken van de afvalhoop wordt door veel respondenten als lastig ervaren om verschillende redenen:

- Er wordt continue afval geproduceerd dat aan de bewaarhoop moet worden toegevoegd. Steeds een doek eraf en erop doen is erg bewerkelijk en kost teveel tijd (= geld)
- In Noord Holland waait het vaak zodat het doek weg kan waaien in de praktijk. Als je ook steeds ballast erop moet leggen wordt het veel en zwaar werk om bij iedere lading afval (per kuub bak) het doek vrij te moeten maken en het afval erbij te moeten storten. Dit kost dan te veel tijd en moet je bij grotere bulten ook nog met twee personen doen.

3.1.3 Het na maximum twee weken afvoeren of verwerken van de afvalhoop

Ook over deze stap hebben veel telers opmerkingen. De volgende opmerkingen worden vaker genoemd:

- Het niet kunnen composteren/afvoeren van afval in twee weken omdat:
    - De afvalhoop te klein is;
    - Er nog geen ander materiaal is waarmee het bollenafval gemengd moet worden; tulpenafval wordt bijvoorbeeld gemengd met lelie-afval, stro, gras en dat is niet steeds in de juiste hoeveelheden beschikbaar;
    - Het teveel ruimte kost om van iedere twee weken een aparte hoop te hebben en aparte composthoop te maken;
    - De hoopjes klein zijn en zo te weinig warmte kunnen produceren (zeker in de winter). Dit geldt helemaal voor lelie-afval omdat dit ook nog erg inslinkt;
    - Het teveel tijd kost en geld om iedere twee weken een loonwerker te moeten laten komen om de afvalhoop te gaan verwerken/afvoeren;
    - Het afval maar een halve container is. Dat wordt te duur om steeds inefficiënt halflege containers te laten vervoeren;

- Het kost tijd om composthopen goed op te bouwen en te starten. Dit is lastig als je midden in het rooiseizoen zit. Composteren wordt daarom aan het eind van het rooiseizoen gedaan;
- Het weer kan tegenzitten om dit precies na twee weken te kunnen doen en loonwerkers hebben hier niet altijd tijd voor;
- Uitrijden van leliemateriaal is in de wintermaanden niet goed mogelijk, omdat tractoren niet het land op kunnen, die rijden dan alles kapot;
- Composteren in de winter van lelie-afval is lastig in verband met de vochtigheid van het materiaal, de neerslag en de buitentemperatuur.

3.1.4 Administratie afvalhopen, keren van hopen en temperatuurregistratie

De telers zien bij sommige van de aspecten wel mogelijkheden, bij andere minder. Wanneer iedere twee weken aparte hopen gemaakt moeten worden en daar moet ook weer van alles over worden bijgehouden, dan wordt het een administratieve exercitie. Wanneer er gewoon één composthoop gemaakt kan worden, dan is het bijhouden van de temperatuur en de data van omgooien in principe wel mogelijk. Temperatuurmetingen kunnen goed in composthopen worden uitgevoerd met verkrijgbare meters met een pin van 1 meter die in de composthoop gestoken kan worden.

Het werken met een verklaring organisch restmateriaal is vooral van toepassing bij telers die het materiaal laten afvoeren of hun materiaal aan broeiers verkopen. Die handeling zal erin moeten groeien. Sommige telers vragen zich af of het gebruik van de Verklaring Organisch Restafval (VOR) nodig is wanneer je zelf het digestaat van de vergisting of de compost terugkrijgt voor het uitrijden over het eigen land. Een passage zou ook in de begeleidingsbrief van het materiaal opgenomen kunnen worden alleen wanneer het materiaal van eigenaar wisselt. Deze brief moet toch al gemaakt worden en door beide partijen ondertekend worden. Om administratieve lasten te verlichten zou overwogen kunnen worden om de Verklaring Organisch Restmateriaal alleen te gebruiken wanneer het materiaal van eigenaar wisselt, of om in het protocol op te nemen dat er een passage in de begeleidingsbrief dient te worden overgenomen.

Uit de gesprekken met telers en bedrijven bleek dat in het algemeen er weerstand is tegen de verwerking van bollenmateriaal door vergisters en composteerders. Dit komt omdat het onzeker is welke ziektes er met het materiaal meekomen en men niet materiaal van anderen wil terugkrijgen wanneer daar ziektes in kunnen zitten. Ook de aanwezigheid van gewasbeschermingsmiddelen is een belemmering voor composteerders om bollenmateriaal mee te composteren. De brancheverenigging (BVOR) raad het af om bollenmateriaal mee te nemen in de vergisting. In de praktijk gebeurt dit ook zeer weinig. Mogelijke ziektes in het materiaal speelt meer bij vergisters, omdat deze met lagere temperaturen weken en minder ziektes afdoden. Ook hebben vergisters moeite met eventuele zandresten en de lage energetische waarde van bollenmateriaal. Daarom vindt vergisting van bollenmateriaal ook niet veel plaats.

3.2 Resultaten kwantitatief onderzoek naar het protocol onder telers

Aan de online enquête hebben 107 respondenten deelgenomen. De KAVB gaf aan dat er ongeveer 500 praktiserende telers lid zijn van de KAVB. Dit betekent dat de respons ongeveer 20% is.

Enkele karakteristieken van de respondenten zijn de volgende:

- 60% komt uit Noord Holland, 15% uit Zuid Holland, 9% uit de Flevopolder of Noordoostpolder;

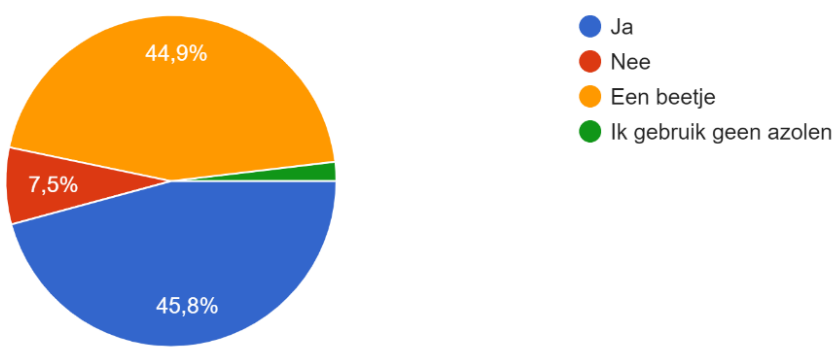
- 61% is alleen bollenteler, 38% heeft er een broeierij bij;
- 56% teelt alleen voorjaarbloeiers; 15% teelt lelies en/of andere najaarsbloeiers; 29% teelt beiden;
- 61% composteert zelf op het bedrijf. Van alle bollentelers doet 43% dit, van de bedrijven die bollen telen en een broeierij hebben is dit 33%. Er is veel motivatie voor zelf composteren om zo de kringloop te sluiten.

3.2.1 Belangrijkste bevindingen uit het kwantitatief onderzoek

De belangrijkste bevindingen van het online onderzoek, aangevuld met mogelijke verklaringen, worden hier weergegeven.

3.2.1.1 Bekendheid met het protocol

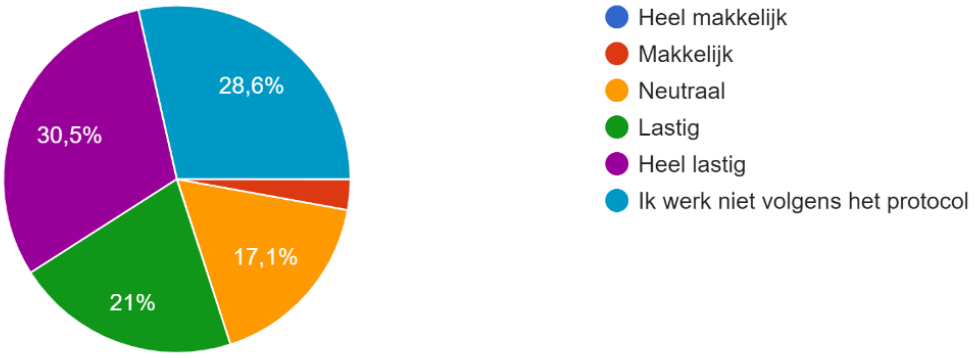
Het grootste gedeelte van de respondenten (91%) is (een beetje) bekend met het protocol. Hierin is er geen verschil tussen bedrijven die wel of niet zelf composteren (Figuur 12).



Figuur 12: Bent u bekend met het protocol mbt afvalmateriaal van bollen behandeld met azolen?

3.2.1.2 Is het lastig om met het protocol te werken?

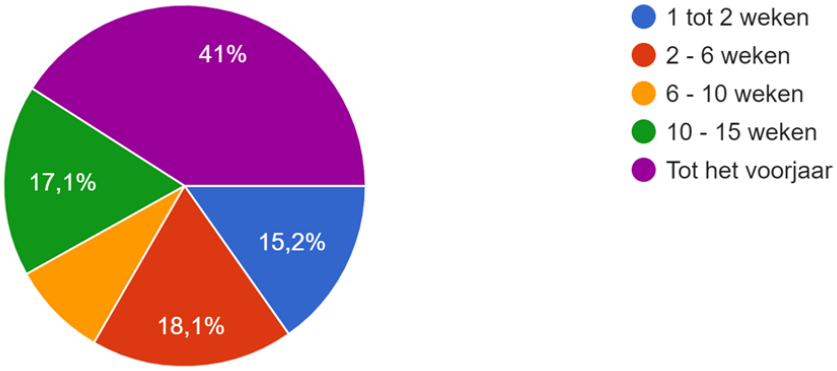
Ruim 28% van de respondenten geeft aan niet met het protocol te werken. Van degene die wel met het protocol werken geeft 72% (55/77) aan dit (heel) lastig te vinden (Figuur 13).



Figuur 13: Hoe makkelijk werkt u met het huidige protocol?

De maximale bewaartijd van twee weken waarna de hoop moet zijn afgevoerd is voor veel telers een probleem. Het merendeel geeft aan dat dit te kort is. Het percentage van de respondenten die het (erg) lastig vinden en zelf hun afval composteren of uitrijden ligt rond de 57%, van degene die het laten afvoeren is dat iets lager (49%). Wanneer je vraagt welke periode meer praktisch is om het afval te bewaren, geeft ruim de helft aan dat dit 10 tot 15 weken of tot het voorjaar zou moeten zijn.

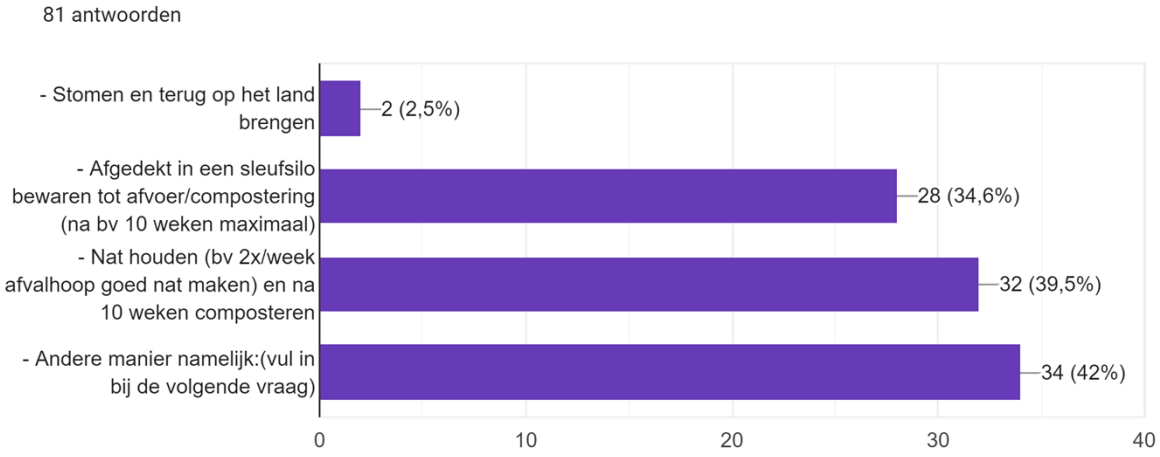
74% van de respondenten van zelf composterende bedrijven heeft de voorkeur voor 10-15 weken of tot het voorjaar. Bij respondenten die niet zelf composteren is dit 49%.



Figuur 14: hoe lang zou u de afval hopen willen kunnen bewaren voordat u ze afvoert/verwerkt?

3.2.1.3 Andere manier van bewaren van de afvalhoop?

Telers werd gevraagd op welke andere manieren van het bewaren van de afvalhopen mogelijk zou zijn. Dit leverde de volgende resultaten op:



Van de 34 personen die andere antwoorden gaven waren dit de meest voorkomende:

- Opslaan in kuubskisten (overdekt) tot het gecomposteerd wordt (8x)
- Langer dan twee weken al dan niet afgedekt opslaan (4x)
- In een sleufsilo opslaan (3x)
- Mengen of afdekken met compost (3x)
- Langere tijd op het land laten liggen (3x)

3.3 Metingen van *A. fumigatus* groei en fractie resistentie in bewaarhopen onder verschillende condities

Op basis van contacten zijn vijf bedrijven bereid gevonden om experimentele bewaarhopen te starten op hun bedrijf. Daarnaast zijn er experimentele bewaarhopen opgezet bij UniFarm, Wageningen Universiteit, waarbij leliemateriaal dezelfde behandelingen kregen als hopen afvalmateriaal bij telers.

Er zijn twee rondes met experimentele bewaarhopen uitgevoerd, één met tulpenafval en één met lelie- en gladiolenafval. In totaal is er per ronde voor vier en soms vijf opslagomstandigheden gekozen waaronder de bewaarhopen zouden worden gehouden, met meerdere herhalingen per omstandigheid bij elk van de telers.

Experimentele bewaaromstandigheden gedurende 10 tot 12 weken:

a) Protocol: Opslag volgens protocol: materiaal afdekken en maximaal 2 weken bewaren. Hierna zijn de bewaarhopen blijven liggen om het verdere verloop te bepalen gedurende 10 tot 12 weken.

b) Controle: Opslag als praktijk voordat het protocol werd ingevoerd: materiaal bewaren in bewaarhopen zonder afdekken of andere verdere behandeling.

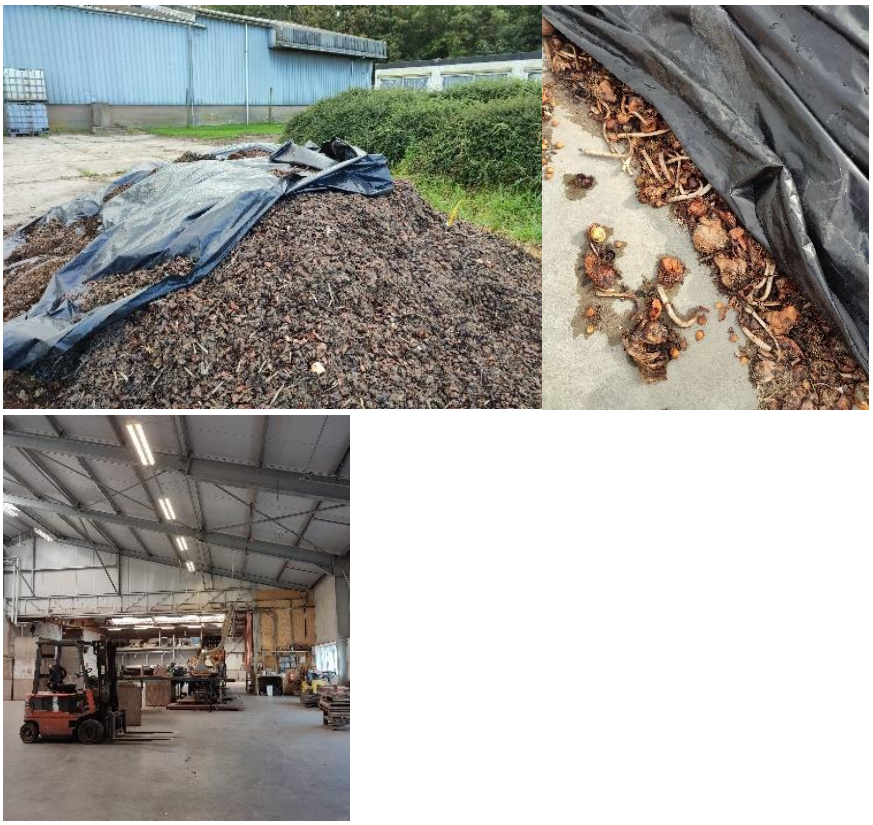
c) Afdekken: Het pas afdekken van de afvalberg na twee weken. Deze wijze is gekozen omdat het praktischer is voor telers om eerst de hopen hoog genoeg te maken en ze daarna pas af te dekken.

d) Nat: Het twee keer per week goed natmaken van de afvalhoop. Wekelijks werd 50L water per m^3 bij tulpen tot 30 L water per m^3 bij lelies aangebracht (zie ook 2.3). Omdat *A. fumigatus* niet goed groeit bij erg natte omstandigheden wordt dit als een mogelijke werkzame en effectieve manier van afvalopslag gezien.

e) Container: het opslaan in een container, afgedekt met een zeil. Deze opslag kan representatief zijn voor de opslag in sleufsilo's, wat een werkbare manier kan zijn bij bedrijven om het afval te bewaren voordat het gecomposteerd wordt.

Bij elk van de bedrijven en bewaaromstandigheden zijn wekelijks monsters genomen en verschillende metingen gedaan. Niet alle bedrijven hadden alle behandelingen ingezet omdat niet op alle bedrijven voldoende afvalmateriaal voorhanden was.

1. Totale hoeveelheid schimmels (sporen per gram materiaal – CFU/g)
2. Fractie van schimmels dat resistent is tegen azolen (% resistente schimmels afgezet tegen totaal aantal schimmels CFU/g)
3. Temperatuur (continue meting)
4. Vochtigheid (voor een selectie van monsters).

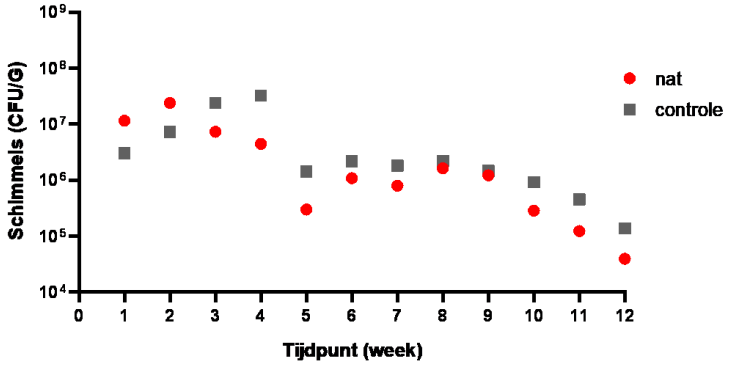


Fotoserie. Voorbeeld van een composthoop van tulpenbollen en de faciliteiten waar ze worden gesorteerd en opgeslagen door het personeel van het bedrijf.

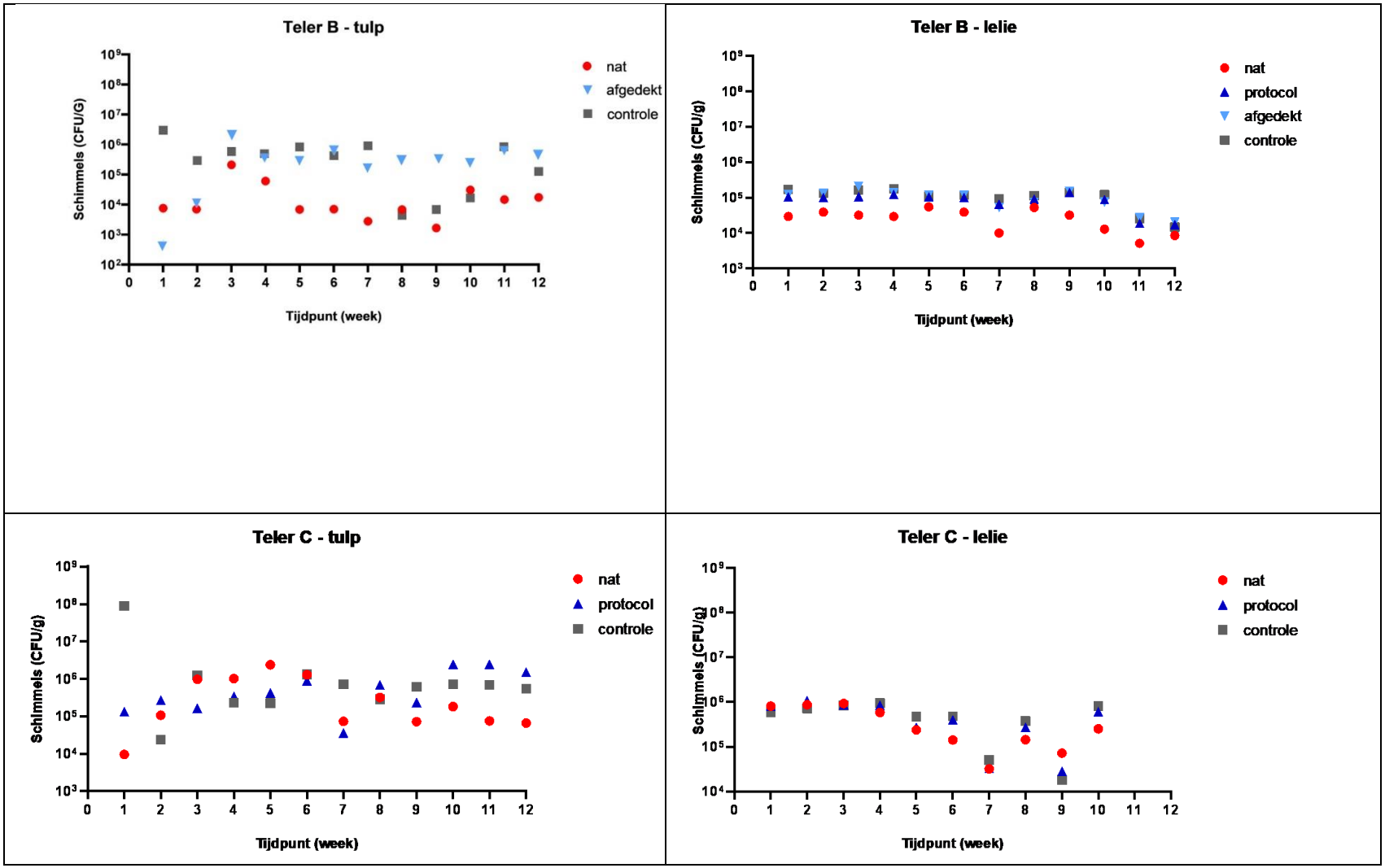
3.3.1.1. Totale hoeveelheid schimmels

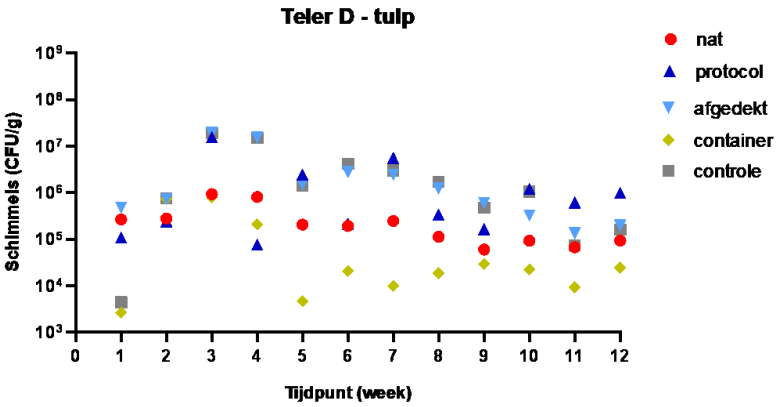
Hieronder staan de resultaten van de metingen van de totale hoeveelheid schimmels (CFU/g materiaal), uitgesplitst per teler (A t/m E) en per soort materiaal (tulp/lelie).

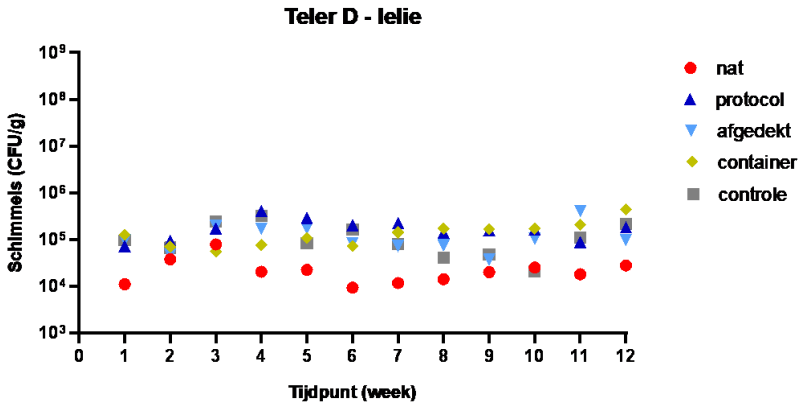
Op de x-as van elke geeft de tijd aan die het experiment liep, tot 12 weken. Wekelijks zijn monsters genomen. Het eerste tijdpunt (t=0) is het moment dat de bewaarhoop was opgezet. Niet elke teler heeft toen een monster genomen. De y-as geeft de hoeveelheid schimmel aan in kolonievormende eenheden (CFU/g). De y-as is een logaritmische schaal, dus per eenheid op de schaal is er een factor 10 verschil. De verschillende punten in de grafiek geven hoeveelheid schimmels door de tijd heen aan, 1 soort symbool per experimentele bewaarmethode. De punten in de grafiek zijn het gemiddelde van de drie monsters die in elke hoop zijn genomen per tijdpunt. Er staan ook foutenbalken die de statistische standaardfout laten zien (dit is de standaardafwijking gedeeld door het aantal waarnemingen). Deze foutenbalken zijn kleiner dan de symbolen en zijn daarom niet te zien.



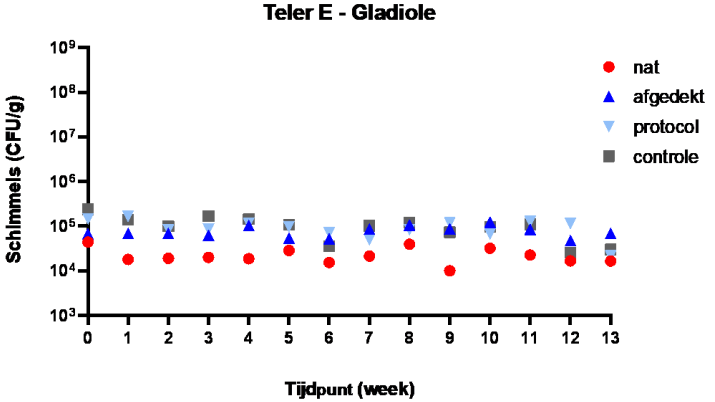
[Lelie niet uitgevoerd op deze locatie]


Teler B - tulp
Schimmels (CFU/G)
Tijdpunt (week)
nat
afgedekt
controle
Teler B - lelie
Schimmels (CFU/g)
Tijdpunt (week)
nat
protocol
afgedekt
controle
Teler C - tulp
Schimmels (CFU/g)
Tijdpunt (week)
nat
protocol
controle
Teler C - lelie
Schimmels (CFU/g)
Tijdpunt (week)
nat
protocol
controle





[Tulp niet uitgevoerd op deze locatie]



Figuur 2: Gemiddelde sporeaantallen uit 3 gram materiaal van afvalhopen met verschillende behandelingen in de tijd die bij 5 telers (a-e) zijn opgezet.

Statistische analyse laat zien (zie losse bijlage) dat er per bewaarmethode geen systematisch verschil is in de gevonden waarden tussen tijdpunten. We hebben toen alle data voor alle tijdpunten samen genomen per behandeling per soort afvalmateriaal. Hierop hebben we gemiddelden en standaardafwijking uitgerekend. Deze staan in de tabel hieronder. Statistische analyse (zie losse bijlage) laat zien dat er een systematisch verschil is in uitgroei tussen behandelingen. Dit betekent concreet dat de behandeling natmaken het laagste aantal uitgroeiende schimmel laat zien.

Tabel 3. Gemiddelden voor gevonden aantallen schimmels (CFU/g) bij elke teler per soort materiaal en per behandeling.

Teler	materiaal	behandeling	gemiddelde	standaardafwijking
A	Tulp	nat	2,42E+06	3,98E+06
		controle	5,88E+06	1,48E+07
B	Tulp	nat	3,12E+04	5,90E+04
		controle	6,25E+05	8,14E+05
		protocol	4,98E+05	5,75E+05
B	Lelie	nat	2,88E+04	2,10E+04
		controle	1,04E+05	6,56E+04
		afgedekt	8,69E+04	4,08E+04
		protocol	1,15E+05	5,85E+04
C	Tulp	nat	5,47E+05	8,89E+05
		controle	7,98E+06	5,74E+07
		protocol	8,88E+05	1,48E+06
C	Lelie	nat	5,30E+05	5,97E+05
		controle	5,32E+05	3,88E+05
		protocol	5,21E+05	4,11E+05
D	Tulp	nat	2,81E+05	4,65E+05
		controle	2,17E+06	5,24E+06
		afgedekt	9,80E+05	1,02E+06
		protocol	4,10E+06	9,42E+06
		container	1,57E+05	3,59E+05
D	Lelie	nat	2,53E+04	3,02E+04
		controle	1,24E+05	1,84E+05
		afgedekt	1,38E+05	2,56E+05
		protocol	1,77E+05	1,82E+05
		container	1,47E+05	1,90E+05
E	Lelie	nat	2,58E+04	1,63E+04
		controle	1,23E+05	6,84E+04
		afgedekt	9,61E+04	4,95E+04
		protocol	8,72E+04	4,59E+04
Unifarm	Lelie	nat	1,02E+05	1,16E+05
		controle	1,87E+05	2,15E+05
		afgedekt	2,00E+05	2,37E+05
		protocol	2,44E+05	2,73E+05

NB. De standaardafwijking in Tabel 3 geeft de variatie aan binnen één monster van de gevonden sporenaantallen. Voor een vergelijking tussen de behandelingen zijn al die n behandelingen bij elkaar gevoegd (tabel 4) en moet ook de standaardafwijking gedeeld worden door √n. Hierdoor kunnen dus wel significante trends worden waargenomen.

Tabel 4. Gecombineerde gemiddelden voor gemeten aantallen schimmels per soort materiaal waarbij alle bedrijven (behalve Unifarm) samengenomen zijn.

Materiaal	Behandeling	Gemiddelde
Tulp	nat	8.21E+05
	controle	4.17E+06
	afgedekt	9.80E+05
	protocol	1.83E+06
	container	1.57E+05
Lelie	nat	1.53E+05
	controle	2.20E+05
	afgedekt	1.17E+05
	protocol	2.25E+05
	container	1.47E+05

3.3.1.2 Duiding resultaten van metingen hoeveelheid sporen in experimentele bewaarhopen.

Resultaten laten zien dat in alle onderzochte bewaarhopen *A. fumigatus* wordt aangetroffen. Afhankelijk van het materiaal en de opslagmethode varieert deze gevonden hoeveelheid van honderdduizend sporen per gram materiaal (10^5 CFU/g) tot tientallen miljoenen (10^7CFU/g). Gemiddeld genomen bevatte tulpenmateriaal meer *A. fumigatus* dan lelie/gladiolenmateriaal. Tulpenmateriaal is van nature veel droger dan leliemateriaal wat schimmelgroei bevordert. De opslagduur had geen effect op de gevonden hoeveelheid *A. fumigatus*. Al binnen een week werden (hoge) dichtheden van *A. fumigatus* bereikt die gedurende de 12 weken van bewaren niet veel meer veranderden. Alleen bij teler E zijn nul-waarden gemeten. In vergelijkbaar uitgangsmateriaal dat gebruikt is voor experimenten in Wageningen (WUR) worden vergelijkbare startwaarden gevonden als bij teler E. Ook bij teler E is er geen toename te zien van de aantallen schimmelsporen en verschilt de nul-meeting al tussen de behandelingen. Dit alles suggereert dat in het startmateriaal groei heeft opgetreden voordat de hopen waren gestart. De hoge aantallen kunnen verklaard worden doordat de schimmel mogelijk al op het land in dode buitenschillen van de bollen groeit. De tijd totdat de afvalhoop wordt gemaakt, wordt bepaald door het rooien, opslaan en selecteren van het afval. Dit proces kan enkele dagen in beslag nemen. In die paar dagen kan de schimmel zich al sterk vermeerderen. De vergelijkbaarheid van de behandelingen blijft mogelijk al zijn niet overal nul-waardes gemeten.

Uit de data werd geconcludeerd dat het aantal gevonden sporen over de tijd gelijk blijft. Met dat gegeven kunnen vergelijkingen gemaakt tussen met alle data van een bepaalde behandeling.

De hoeveelheid sporen in deze reststroom is gelijk aan wat wij eerder vonden gedurende 16 maanden bemonsteren bij drie bedrijven (https://doi.org/10.1128/AEM.02295-20). Een bollenafvalhoop is een plek waar micro-organismen uitstekend gedijen en zo ook A. fumigatus. De focus van ons onderzoek, en het onderzoek van anderen, ligt tot nu toe voornamelijk op de “hotspots”. Daardoor weten we nog niet veel over andere plekken waar A. fumigatus kan

voorkomen, in welke hoeveelheid (sporen) en of wat het niveau van azolenresistentie is. Daarom richten wij ons in het NWO-project ook op die aspecten. Belangrijk voor deze rapportage is dat in een bollenafvalhoop veel sporen kunnen worden gevormd, 1 gram bevat ongeveer 100.000 sporen.

Per bewaarmethode waren er verschillen. Hieronder staan per bewaarmethode de meest opvallende bevindingen.

a) Protocol. Opslag volgens protocol: materiaal afdekken en deze maximaal 2 weken bewaren. We hebben deze hopen ook bewaard tot 12 weken.

Al op het eerste meetpunt (na 1 week) vonden we afhankelijk van het materiaal al hoge aantallen. Niet alle telers hebben een monster genomen direct na het aanleggen van de bewaarhoop, in dat geval is de eerste meting dus pas genomen op week 1. De aantallen schimmels waren na 2 weken niet hoger dan na 1 week. Dit wijst erop dat het verse materiaal dat is gebruikt voor het aanleggen van de hopen al binnen een week uitgroei van schimmels laat zien. Het verder bewaren van deze hopen gedurende 10 tot 12 weken leidt niet tot verdere vermeerdering van schimmels. Er werd geen verschil met de controle hopen gevonden, hetgeen erop duidt dat het protocol niet effectief is in de reductie van de groei van de schimmel.

b) Controle. Opslag als praktijk voordat het protocol werd ingevoerd: materiaal bewaren in bewaarhopen zonder afdekken of andere verdere behandeling.

De resultaten bij deze bewaarmethode lijken op eerdere onderzoeken waarbij hopen met deze standaard en gangbare methode ook werd gevolgd. Er is fluctuatie over de tijdpunten die komt door heterogeniteit van materiaal en het exacte punt waar vanuit de bewaarhoop de monsters zijn genomen. Tulpenmateriaal bevat veel hogere aantallen *A. fumigatus* dan leliemateriaal. Dit komt waarschijnlijk omdat het leliemateriaal veel natter was dan het tulpenmateriaal.

c) Afdekken. Het pas afdekken van de afvalberg na twee weken. Deze wijze is gekozen omdat het praktischer is voor telers om eerst de hopen hoog genoeg te maken en ze daarna pas af te dekken.

Het afdekken heeft geen remmend effect op de groei van *A. fumigatus* in vergelijking met de gangbare methode van niet afdekken.

d) Nat. Het twee keer per week goed natmaken van de afvalhoop. Wekelijks werd 50 tot 30 L water per m^3 materiaal aangebracht. Omdat *A. fumigatus* niet goed groeit bij erg natte omstandigheden wordt dit als een mogelijke werkzame en effectieve manier van afvalopslag gezien.

De behandeling nat maken is bij de tulpen niet altijd optimaal uitgevoerd. In de eerste drie weken van de proeven met tulpenmateriaal regende het hard. In de 3 weken daarna is door telers B en D vergeten de hopen goed nat te maken. Daarom is na 6 weken ingegrepen en zijn de hopen alsnog goed nat gemaakt voor aanvullend 6 weken. Daarom duurde de proef hier 12 weken in totaal. De drie weken, waarin was vergeten nat te maken, bleken geen effect te hebben op het totale resultaat van de proeven.

Het natmaken van de hoop leidt tot lagere aantallen *A. fumigatus*. Dit was het meest zichtbaar in het tulpenmateriaal dat veel droger is en waar natmaken dus een groot verschil in groeiomstandigheden geeft. Hier daalde het aantal schimmels gemiddeld met ongeveer 80% ten opzichte van de controle (van 4.17 miljoen naar 821 duizend, een reductie van 3.25 miljoen) in vergelijking met de hopen bewaard onder standaardcondities. Het leliemateriaal was van zichzelf al veel natter dan het

tulpenmateriaal. Dit komt doordat lelieafval van zichzelf al veel meer vocht bevat en omdat het werd bewaard in de winter tijdens een periode met erg veel regen. Mede hierdoor zijn de aantallen over de hele linie lager in leliemateriaal dan in tulpenmateriaal. De behandeling natmaken leidde bij leliemateriaal tot een reductie van 30% ten opzichte van de controle (van 220 duizend naar 153 duizend).

e) Container. Het opslaan in een container, afgedekt met een zeil. Deze opslag kan representatief zijn voor de opslag in sleufsilo's, wat een werkbare manier kan zijn bij bedrijven om het afval te bewaren voordat het gecomposteerd wordt.

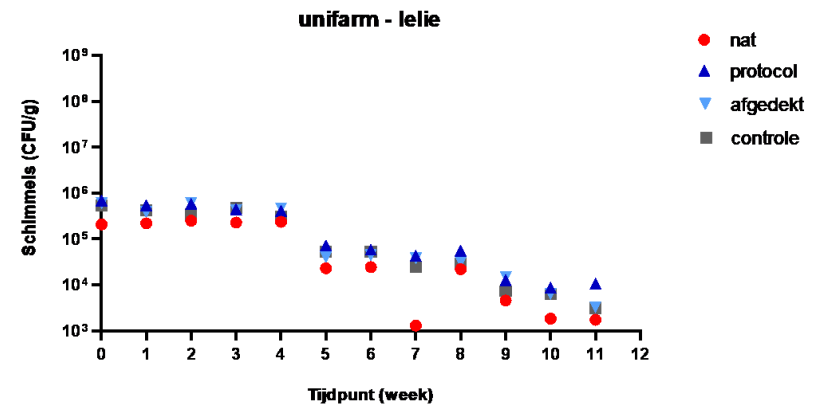
Deze bewaarmethode is slechts twee keer uitgevoerd. Deze methode kan bij nader inzien vergeleken worden met nat maken, omdat het materiaal erg nat is aan het begin en er minder vocht uitloopt. Vocht, wat door warmte verdampt uit de hoop, condenseert tegen het zeil en drupt terug op de hoop. Tijdens de wekelijkse monstername bleek dat het materiaal in deze hoop erg vochtig bleef. Waar deze is uitgevoerd, hebben we geen duidelijke verschillen gezien tussen de aantallen schimmels bij deze bewaarmethode en de natte bewaarmethode.

Verschillen tussen tulpen-, lelie en gladiolenmateriaal. De experimenten zijn uitgevoerd in verschillende tijden van het jaar. Het is lastig om concreet aan te geven hoeveel meer/minder regen en verdamping er geweest is tussen de verschillende periodes dat de experimenten zijn uitgevoerd. Echter, tijdens de experimenten met tulpen in juli-september was er zeer waarschijnlijk meer verdamping en minder regen dan in november-januari toen de lelie/gladiolen experimenten liepen. Januari 2022 was een uitzonderlijk natte maand met veel regen. Leliemateriaal is van zichzelf natter dan tulpenmateriaal. Gladiolenmateriaal zit daar tussen in. Hierdoor heeft het natmaken relatief minder effect in leliemateriaal en zijn de gevonden aantallen schimmels in lelie/gladiolen-materiaal lager dan in tulpenmateriaal. De buitentemperatuur lijkt niet van veel invloed omdat ook in januari in bewaarhopen temperaturen tot 50 graden worden gehaald; hier zijn geen duidelijke verschillen tussen de zomer en winter periode.

3.3.1.3 Aantallen gevonden schimmelsporen in experimentele opstelling voor leliemateriaal uitgevoerd bij Wageningen Universiteit.

De veldomstandigheden voor het leliebewaarproces werden nagebootst bij Unifarm, waar houten kisten werden geplaatst om de door de boeren uitgevoerde behandelingen te simuleren en te vergelijken (Fig. 11). De opstelling werd gestart in november 2021, met het materiaal dat van de compostplaats werd gebracht. De eerste monsters werden verzameld op 15 november 2021.

UniFarm bevindt zich aan de achterkant van het Radix-gebouw van WUR-faciliteiten en maakt daarom een nauwkeurigere en praktischere evaluatie van de compost mogelijk. Er werd in elke hoop één temperatuursensor geplaatst om het verloop van de temperatuur tijdens de bemonsteringsperiode te volgen.



Figuur 3: Verloop van sporenaantallen in lelie-afval in houten kratten die op verschillende manieren zijn behandeld.







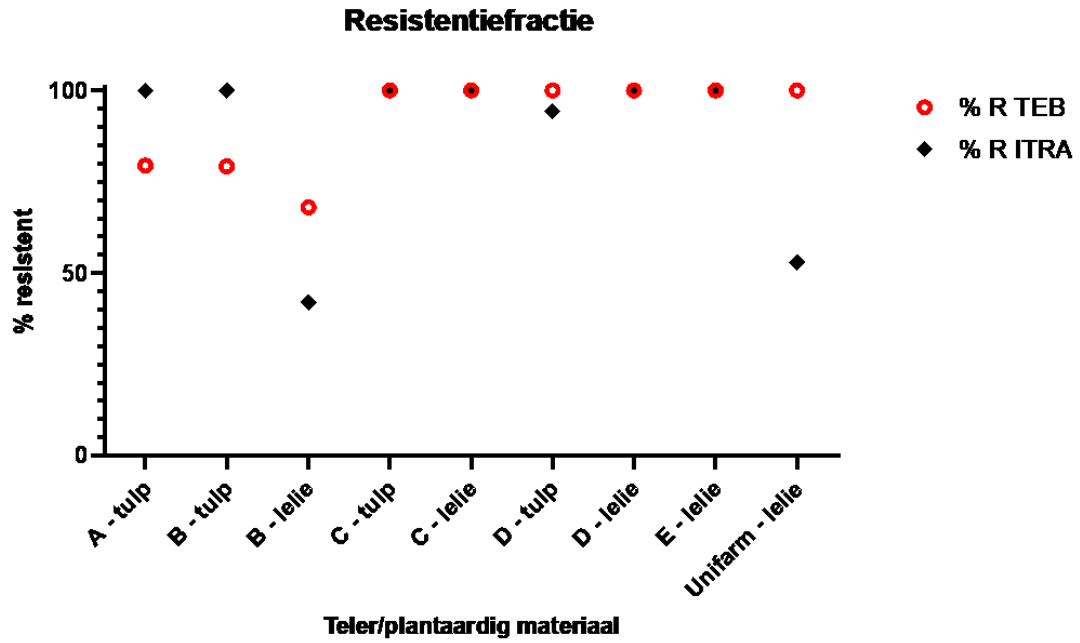
Figuur 4 Unifarm- opstelling van leliecompost bij WUR-faciliteiten.

3.3.1.4 Duiding van resultaten

Bij deze metingen is een reductie over de tijd te zien van de uitgroei van A*. fumigatus*. De experimenten zijn uitgevoerd in een periode met overvloedige regen. We hebben een uitgroei van schimmel gemeten die vergelijkbaar is met gevonden waarden bij experimentele hopen bij telers. Leliemateriaal is van zichzelf nat. Er is een lagere uitgroei van schimmels zoals gemeten bij de bewaarhopen met tulpenmateriaal uitgevoerd bij telers. Tijdens de metingen hebben we vastgesteld dat het materiaal van de behandeling “controle” en de behandeling “nat” ongeveer gelijk waren en dat het afgedekte materiaal droger was. Deze resultaten bevestigen de notie dat natmaken van materiaal leidt tot een lagere uitgroei van schimmels.

3.3.2.1 Fractie resistentie

Voor alle monsters hebben we hoeveelheid *A. fumigatus* bepaald dat resistent is tegen twee verschillende azolen, steeds uitgedrukt als fractie van het totale aantal *A. fumigatus*. Hiervoor gebruikten we twee azolen, itraconazool (medisch azool) en tebuconazool (landbouwazool). Er was geen duidelijk verschil in fractie resistentie tussen behandelingen, tijdstippen en telers. In alle bewaarhopen bij alle deelnemende bedrijven en bij alle bewaarmethoden en alle tijdpunten vonden we dat de fractie *A. fumigatus* dat resistent is tegen azolen tussen de 75% en 100% ligt, met één uitzondering waar de fractie resistentie tussen 45% en 70% ligt. Er waren geen duidelijke verschillen tussen tulpen- en lelie/gladiolenmateriaal, noch tussen de verschillende bewaarmethoden. De resistentiefractie is gemeten als resistentie tegen twee verschillende azolen, het landbouwazool tebuconazool (TEB) en het medische azool itraconazool (ITRA). Er zijn geen duidelijke systematische verschillen tussen de resistentie gemeten tegen een van beide azolen.



Figuur 5 Azoolresistentie gedetecteerd per teler, gemiddeld over alle behandelingen en alle tijdstippen. Resistentiefractie is bepaald tegen twee indicatorazolen, het landbouwazool tebuconazool (TEB) en het medische azool itraconazool (ITRA), dit is weergegeven met verschillende symbolen.

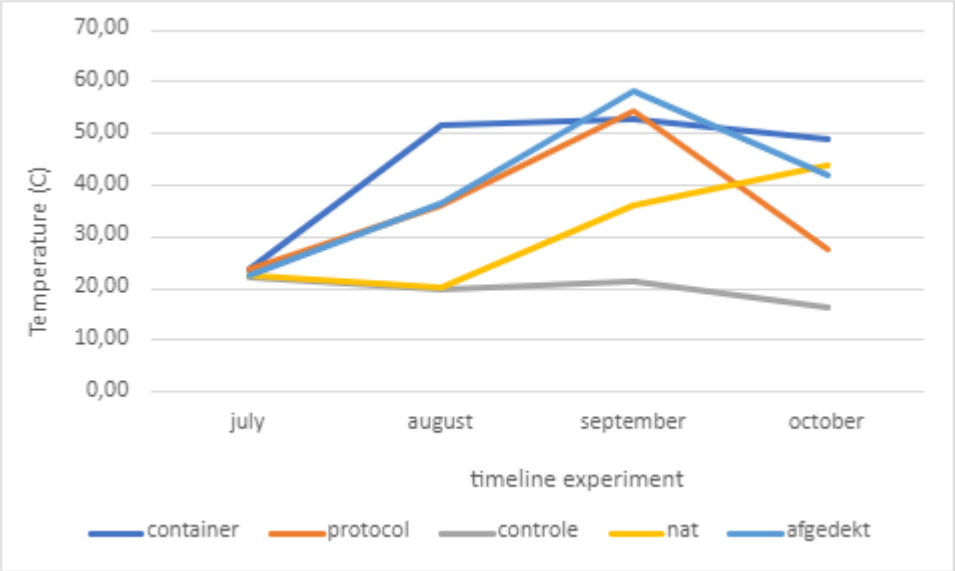
3.3.2.2 Duiding van resultaten fractie resistentie

In alle bewaarhopen bij alle deelnemende bedrijven en bij alle bewaarmethoden en alle tijdpunten vonden we dat de fractie *A. fumigatus* dat resistent is tegen azolen tussen de 75% en 100% ligt. Er waren geen duidelijke verschillen tussen tulpen- en lelie/gladiolenmateriaal, noch tussen de verschillende bewaarmethoden.

Aangezien we bij de eerste tijdpunten al hoge aantallen resistentie vinden, is het aannemelijk dat de resistentie niet in de hopen is ontstaan door nieuwe genetische veranderingen in sensitieve schimmels. Het is aannemelijk dat de resistente schimmels, die in (lage aantallen) aanwezig zijn in het milieu, de hoop koloniseren (samen met de sensitieve stammen) en dat resistente stammen bij de uitgroei een selectief voordeel hebben boven sensitieve stammen door de aanwezigheid van azolen. Dit koloniseren kan via schimmelsporen in de schillen van bollenmateriaal waardoor bij het aanleggen van bewaarhopen de schimmel al in lage aantallen binnen in de hopen wordt verspreid. Dit is mogelijk een combinatie van sensitieve en resistente schimmels. Deze kunnen dan binnen enkele dagen uitgroeien tot de aantallen die we hebben gemeten als CFU/g. Ook kunnen bewaarhopen worden aangelegd door materiaal van verschillend afvalmateriaal te mengen, waarbij sommige materialen al hoge aantallen schimmels bevatten die dan door een snelle uitgroei tot hogere aantallen kunnen leiden.

3.3.3.1 Temperatuur

In bewaarhopen is elke 12 uur de temperatuur gemeten met drie sensors per hoop. Hieronder staat een grafiek die illustratief is voor gevonden resultaten. De lijnen laten gemiddelden zien gemeten per experimentele conditie. Het voorbeeld hieronder is van tulpenmateriaal in de periode van het onderzoek dat liep van juli (week 0) tot oktober (week 12), gemeten bij teler D.



Figuur 6: Verloop van de gemiddelde temperatuur in de verschillende hopen met tulpenmateriaal bij teler D.

3.3.3.2 Duiding van resultaten temperatuurmetingen

De temperatuur kan oplopen tot 50 graden of iets daarboven. Dit is in lijn met verwachtingen op basis van eerdere metingen. De temperatuur is niet structureel boven 60 graden geweest – dan zou er afdoding van schimmels plaatsvinden. De temperatuur in de bewaarhopen lijkt niet af te hangen van de tijd van het jaar. Het experiment met tulpenafval liep van juli tot oktober. De warmere juli maanden hebben niet geleid tot een hogere temperatuur.

Niet alle sensoren waren goed (diep genoeg) in de hoop geplaatst, sommige zijn door onbekende oorzaak erg aan de buitenkant gekomen. We denken dat dit de reden is dat bijvoorbeeld bij de controle behandeling vooral de omgevingstemperatuur is gemeten. Hierdoor is er het lastig om een duidelijk verband tussen schimmelgroei en temperatuurverloop vast te stellen.

3.3.4.1. Vochtgehalte

Aangezien eerder is aangetoond dat vochtigheid van het materiaal een effect kan hebben op de uitgroei van schimmels zoals *A. fumigatus*, (Dedesko en Siegel 2015) hebben we van een selectie van monsters het drooggewicht en waterfractie gemeten, waarbij we evenredig een kwart van alle monsters hebben gebruikt voor de metingen voor drooggewicht. We hebben een gestandaardiseerde hoeveelheid materiaal gedroogd en het gewicht bepaald voor en na drogen. Hiermee konden we de waterfractie bepalen.

3.3.4.2 Duiding van resultaten vochtgehalte

De resultaten laten geen duidelijk beeld zien, er lijkt een zeer grote variatie tussen metingen van dezelfde bewaarhoop die dus dezelfde vochtigheid zouden moeten hebben. Dit wijst erop dat onze meetmethode om vochtgehalte te meten met 3 gram materiaal niet geschikt was. Dit heeft zeer waarschijnlijk te maken met de intrinsieke heterogeniteit van het materiaal. We denken dat het meten van vochtigheid met veel grotere volumes en/of steekproeven had moeten plaatsvinden om eenduidige conclusies te kunnen trekken. Dit laat onverlet dat onze waarnemingen van het materiaal duidelijk lieten zien dat het tulpenmateriaal duidelijk droger was dan lelie- en gladiolenmateriaal, en

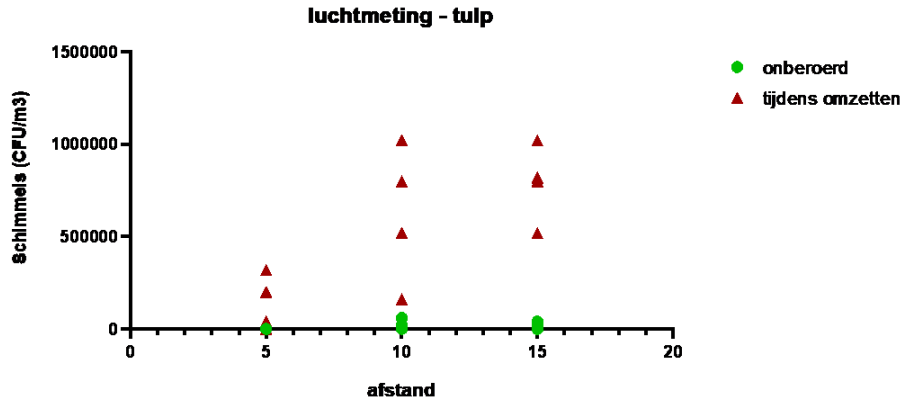
dat natgemaakte hopen duidelijk natter zijn dan hopen die niet natgemaakt zijn. Onze metingen hebben dit echter niet kunnen kwantificeren. Vervolgproeven lopen nu om met grotere volumes en met een hydrometer te onderzoeken of de vochtigheid op andere manieren betrouwbaarder te meten is.

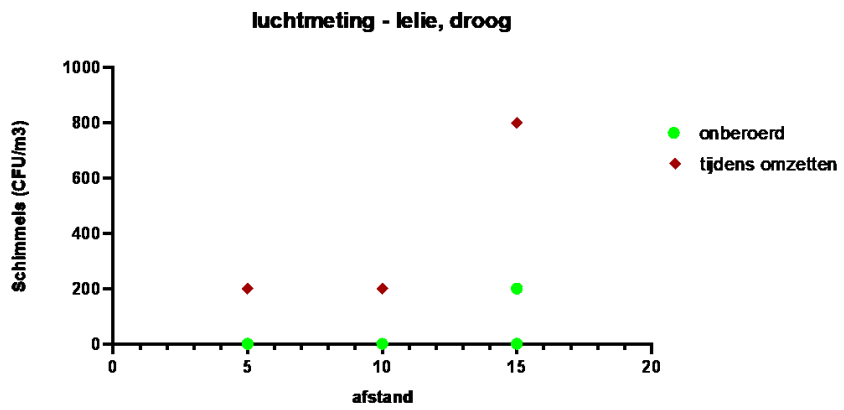
3.4.1 Verspreiding van *A. fumigatus* door de lucht.

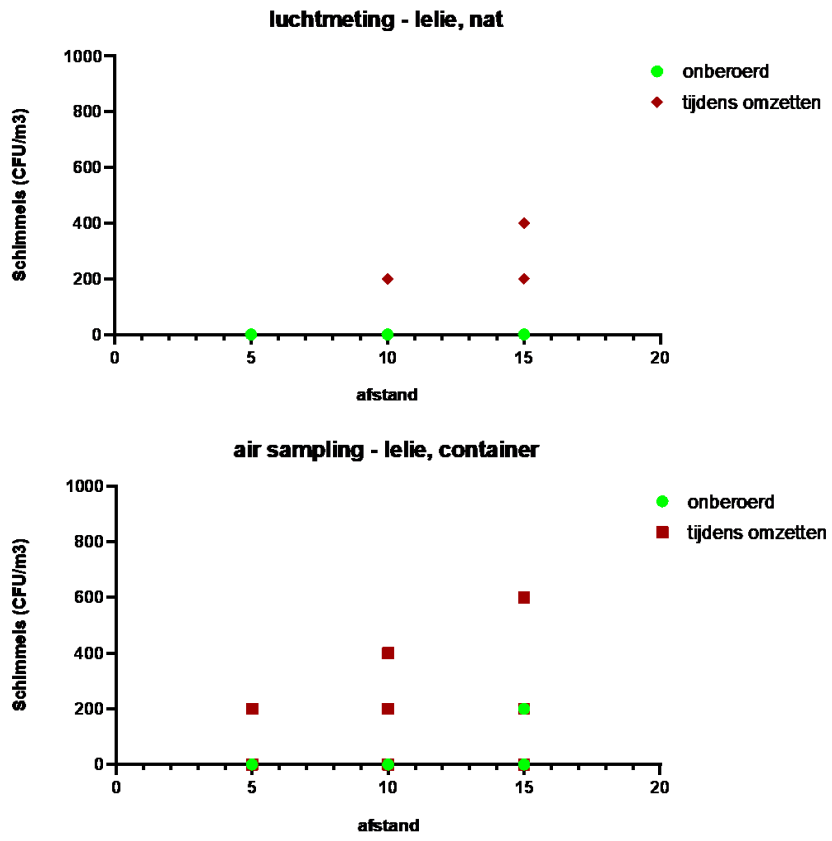
Aspergillus-soorten zijn alomtegenwoordige schimmels die enorme hoeveelheden sporen in de lucht kunnen afgeven. Ander onderzoek suggereert dat (resistente en niet-resistente) *A. fumigatus* zich via de lucht verspreidt vanuit bollenmateriaal (Schoustra et al 2019). Eerdere pilots hebben gesuggereerd dat verspreiding van *A. fumigatus* sporen vooral plaatsvindt tijdens het omzetten van de bewaarhoop. In dit onderzoeken hebben we luchtmetingen gedaan bij bewaarhopen voor en tijdens omzetten. Ook hebben we dichtheid van *A. fumigatus* in de bewaarhopen bepaald voor en direct na omzetten.

Dit onderzoek is uitgevoerd bij in totaal vier bewaarhopen, één met tulpenmateriaal en drie met leliemateriaal.

De bemonstering bestond uit het vangen van de sporen op drie verschillende afstanden (5, 10 en 15 meter) van de bewaarhoop met vijf replica's per hoop per afstand. Bij één bedrijf (bedrijf C) zijn ook binnen in het gebouw werden ook sporenmonsters genomen, op een plek waar de bollen door het personeel van het bedrijf worden gesorteerd en opgeslagen. Op het moment van de metingen waren er geen bollen aanwezig en was er geen activiteit. Het totaal aantal sporen dat is opgevangen door 200 liter lucht door te meten is bepaald. Deze gegevens staan in de grafieken hieronder. De schaal van de aantallen zijn anders voor tulp en leliemateriaal, bij tulpmateriaal waren de aantallen rond een factor 1000 hoger dan voor leliemateriaal. Alle waarden staan in de elektronische bijlage.







Figuur 7: sporenaantallen in luchtmonsters voor/tijdens het omzetten van verschillende hopen.. Bij tulpenmateriaal is alleen een droge hoop (controle behandeling) gemeten, bij leliemateriaal materiaal van drie soorten behandelingen.

Ook is de fractie *A. fumigatus* dat resistent is tegen azolen gemeten. Vrijwel alle opgevangen sporen (tussen 95% en 100%) waren resistent tegen beide azolen.

3.4.2 Duiding van resultaten voor luchtmetingen

Onder normale omstandigheden ademen mensen rond 100 schimmelsporen per uur in. We verwachten dus in al onze metingen schimmels te detecteren. Onze luchtmetingen waren pilot onderzoek en we hebben onze meetmethode niet met een standaard uitgevoerd die het mogelijk maakt om onze gevonden aantallen te vergelijken met literatuur. Wel kunnen we vergelijkingen maken tussen de onderlinge metingen omdat deze steeds zijn uitgevoerd met dezelfde methode.

Bij hopen die onberoerd zijn, hebben we lage aantallen schimmelsporen gemeten in de lucht. Dit gold voor alle onberoerde hopen, ook hopen waar we hoge (10^7 CFU/g) aantal *A. fumigatus* in de hoop zelf hadden gemeten. Ook hebben we binnen in de hal van het bedrijf C waar we hebben gemeten geen schimmelsporen gemeten.

Tijdens het omzetten hebben we in hopen met tulpenmateriaal *A. fumigatus* gevonden in de lucht. Dit was materiaal bewaard onder standaardcondities waar hoge aantallen *A. fumigatus* in zaten. Dit laat zien dat *A. fumigatus* zich kan verspreiden door de lucht en dat het omzetten van de hoop verspreiding van sporen door de lucht mogelijk maakt.

Bij nat leliemateriaal hebben we tijdens omzetten lage aantallen, een factor 10.000 lager dan voor tulpen materiaal, *A. fumigatus* gemeten in de lucht. Leliemateriaal bevatte rond 10^5 CFU/g

schimmelsporen; minder (factor 10 lager) schimmelsporen dan in het tulpenmateriaal, maar het leliemateriaal bevat wel aanzienlijke aantallen die in principe de lucht in hadden kunnen verspreiden. Aangezien we hier vrijwel geen verspreiding in de lucht gemeten laat dit zien dat het natmaken van de hoop de verspreiding naar de lucht van de sporen kan remmen.

Analyses van behandelingen van de afvalhopen van tulpenmateriaal (bv natmaken) op de verspreiding in de lucht ontbreken nog. Deze proeven zijn recentelijk ingezet en luchtmonsters worden in september genomen.

3.5 Synthese van resultaten en conclusies

Op basis van bovenstaande bevindingen kunnen we de volgende conclusies trekken:

- In alle bewaarhopen op alle bedrijven onder alle bewaaromstandigheden en met alle soorten materiaal zijn *A. fumigatus* aangetroffen in aantallen rond 10^5 tot 10^7 CFU/g. Deze aantallen komen overeen met verwachtingen op basis van eerder onderzoek met bollenmateriaal.
- Opslag langer dan 14 dagen heeft geen invloed op het aantal sporen van *A. fumigatus* in opslaghopen - er is geen significante toename of verandering in het aantal *A. fumigatus* gedurende opslag voor 1 tot 12 weken. De maximale dichtheid van schimmelgroei is afhankelijk van voedingsstoffen en groeiomstandigheden, blijkbaar is dit maximum al na een periode van 1 tot 2 weken gehaald.
- Het afdekken van opslaghopen vermindert de groei van *A. fumigatus niet* en kan de groei verhogen.
- In nat materiaal groeit beduidend minder *A. fumigatus* dan in opgeslagen materiaal dat niet nat gemaakt is. Deze behandeling vermindert de groei van *A. fumigatus* met ongeveer 80% ten opzichte van droog tulpenmateriaal. In leliemateriaal dat van zichzelf al nat is vinden we lage aantallen *A. fumigatus*.
- De temperatuurmetingen laten zien dat de temperatuur in de hopen variabel was tussen 20 en 50 graden. Deze verschillen in temperatuur hebben niet geleid tot duidelijke verschillen in aantal schimmels. In geen van de hopen zijn periodes van meerdere dagen met temperaturen gemeten boven de 60 graden. Deze waarden worden normaal wel gehaald bij het proces van stro inbrengen, omzetten en composteren. Temperaturen boven de 60 graden gedurende enkele dagen leiden tot afdoding van *A. fumigatus.* Het meten van temperatuur is niet goed verlopen omdat sensoren niet altijd goed geplaatst waren. Hierdoor hebben we niet eenduidig een verband tussen temperatuur in de bewaarhoop en uitgroei van schimmel kunnen bepalen. Wel hebben we gezien dat ook in koudere jaargetijden de temperatuur in de hopen kan oplopen tot 50 graden. Verder vonden we geen systematisch verschil tussen uitgroei in hopen van dezelfde behandeling door de tijd. Voorlopig leiden we hieruit af dat temperatuur in de bewaarhopen of eventuele verschillen daarin geen essentieel verschil heeft gemaakt in onze bevindingen. De verwachting is dat bij compostering de temperatuur hoger oploopt dat in de semi-optimale omstandigheden in een afvalhoop en dat daarbij dus wel de 60 graden wordt gehaald. Een praktijkproef van compostering met temperatuurmetingen zou uitsluitsel hierover kunnen geven.
- De fractie van *A. fumigatus*- sporen die resistent is tegen azolen is tussen de 40% en 100%, ongeacht het bedrijf, de behandeling of de duur van de opslag. Aangezien al bij de eerste

tijdpunten hoge fracties resistentie worden gevonden is het aannemelijk dat de resistentie al in het milieu aanwezig is en dat resistente stammen selectief uitgroeien. Resistentie lijkt niet per se te ontstaan in bewaarhopen. Dit weerspreekt eerdere suggesties dat resistentie zou moeten ontstaan in bewaarhopen om een probleem te vormen.

- Tenzij opslaghopen worden verstoord, detecteren we *A. fumigatus* slechts in lage aantallen die kunnen worden gezien als achtergrond in de lucht rond opslaghopen, ook als in deze bewaarhopen hoge aantallen *A. fumigatus* aanwezig zijn. Als droog materiaal met hoge aantal *A. fumigatus* wordt omgezet, vinden we wel *A. fumigatus* in de lucht. Als nat materiaal met iets lagere aantallen *A. fumigatus* dan in droog materiaal wordt omgezet, treffen we in onze metingen geen *A. fumigatus* aan in de lucht. Dit wijst op een effect van natmaken op de verspreiding; uit nat materiaal verspreidt de schimmel zich beduidend minder dan uit droog materiaal.

Dit betekent dat het nieuwe protocol (bewaarhopen maximaal 2 weken bewaren met afdekken) niet het beoogde effect heeft van het voorkomen van het ontstaan en het voorkomen van het tot hoge aantallen uitgroeien van *A. fumigatus*. De aantallen *A. fumigatus* zijn al na 1 week opslag hoog en vrijwel alle *A. fumigatus* is resistent tegen azolen.

Op basis van de resultaten van dit onderzoek lijkt de bewaarduur irrelevant. Hoeveelheden schimmels kunnen al na één week hoog zijn en veranderen niet veel gedurende opslag over 10 tot 12 weken. Luchtmetingen laten zien dat als hopen onberoerd zijn, we geen verhoogde aantallen *A. fumigatus* meten in de lucht.

Nat maken heeft twee effecten die elkaar versterken. Ten eerste is de uitgroei van schimmels in de hopen verminderd, ten tweede verspreiden aanwezige schimmels zich minder uit nat materiaal dan uit droog materiaal. Als natte bewaarhopen waar nog steeds aanzienlijke hoeveelheden *A. fumigatus* in zitten worden omgezet, kunnen we geen verspreiding meten in de lucht. Als drogere bewaarhopen worden omgezet, meten we wel verspreiding in de lucht.

Recent is onderzoek uitgevoerd naar andere mogelijke hotspots voor verspreiding van resistente *A. fumigatus*, zoals uien, aardappels, houtverwerking en groenafval. In deze hotspots zijn vergelijkbare en soms lagere aantallen *A. fumigatus* gevonden. Het is aan beleidsmakers om te beoordelen hoe belangrijk de hotspot bollenteelt is in de context van andere gevonden hotspots (voor en) na het nemen van beheersmaatregelen die de groei van schimmels en de verspreiding naar de lucht verminderen.

3.6 Open vragen, toekomstig onderzoek

3.6.1 Nat maken, wat is precies het effect of groeivermindering en het effect of verminderde verspreiding naar de lucht?

Onze resultaten laten een tweeledig effect zien zijn van natmaken, het remt de uitgroei en daarnaast vermindert het de verspreiding vanuit de bewaarhoop door de lucht. Het onderzoeken van het effect van natmaken was één van de mogelijke alternatieven voor het protocol en is uitgevoerd op pilot schaal.

Het effect van natmaken op uitgroei hebben we kunnen meten (ca 80% reductie bij tulpenmateriaal) Het precieze kantelpunt van wanneer iets nat is en remmend werkt op de groei hebben we niet gemeten. We hebben geprobeerd de vochtigheid van de monsters te bepalen om daarmee goed te kunnen beschrijven hoe nat een hoop moet zijn om de groei van *A. fumigatus* te remmen. De

metingen gaven echter een grote spreiding aan tussen monsters die dezelfde vochtigheid zouden moeten hebben, wat waarschijnlijk te wijten is aan de grote heterogeniteit van de afvalhopen. Om beter te kunnen bepalen wat de vochtigheid van de afvalhopen moet zijn om de groei van *A. fumigatus* te remmen, zou een nieuwe meting gedaan moeten worden met daarbij mogelijke vochtbepalingen met ofwel veel groteren monsters van het materiaal, of door gebruik te maken van vochtigheidsmeters, zoals bv voor de grond wordt gebruikt. Deze metingen met een apparaat zou misschien ook gebruikt kunnen worden door de boeren en inspecteurs om te bepalen of de hoop nat genoeg is gehouden.

Het effect van verminderde verspreiding van schimmelsporen naar de lucht is gebaseerd op 4 series van luchtmetingen. Op basis van deze metingen is er een duidelijke aanwijzing dat nat materiaal een factor 1000 minder sporen laat verspreiden dan droog materiaal. Het natte leliemateriaal bevatte tussen een factor 10 minder schimmels dan tulpenmateriaal en de verspreiding in de lucht vanuit het natte leliemateriaal was 1000 keer lager dan vanuit het tulpenmateriaal. Bij elkaar suggereert dit dat het gecombineerde effect van natmaken (verminderde groei en verminderde verspreiding) een reductie van 10000-voud zou kunnen bewerkstelligen. Deze waarde is een ruwe en voorlopige schatting op basis van pilot onderzoek en zou verder gevalideerd moeten worden.

Deze validatie kan gebruikt worden om vast te stellen hoe nat het materiaal moet zijn om dergelijke reducties in groei en luchtverspreiding te bereiken. Het effect van verminderde verspreiding hebben we afgeleid uit de metingen met lelieafval dat heel nat was. Ander (ongepubliceerd) onderzoek bij de WUR laat ook zien dat nat materiaal uitgroei vermindert. Validatie moet systematische experimenten bevatten met droog materiaal dat nat is gemaakt in verschillende gradaties om zo meer direct het effect van natmaken op de uitgroei en de verspreiding naar de lucht te meten. De praktische uitvoerbaarheid van methoden van natmaken moet ook onderdeel zijn van validatie. Wanneer in het bewaarproces moet precies nat gemaakt worden, tijdens het hele bewaarproces om groei te remmen of is natmaken direct voor omzetten voldoende om verspreiding naar de lucht en daarmee verspreiding naar de omgeving afdoende af te remmen?

Het hier beschreven onderzoek is uitgevoerd in de praktijk (behalve de proeven op UniFarm). Dit betekent dat het niet exact gecontroleerd is zoals bij een wetenschappelijk experiment gebruikelijk is. Het is wenselijk om meer in een experimentele setting de natmaakproeven systematisch te herhalen om zo beter te valideren data te verkrijgen. Dit onderzoek toont wel aan wat de mogelijk te behalen reducties in de praktijk kunnen zijn.

Validatie moet ook standaardmetingen bevatten voor luchtmetingen om context te geven aan de gevonden hoeveelheden schimmels rond bewaarhopen. Dit kan door steeds op dezelfde manier luchtmetingen te verrichten op een breed scala aan locaties, inclusief mogelijke hotspots en coldspots.

3.6.2 Transmissieroutes

In meer algemene zin laat dit huidige onderzoek zien dat het verder in kaart brengen van transmissieroutes essentieel is om de effecten van mogelijke beheersmaatregelen op de verspreiding van (resistente) *Aspergillus fumigatus* naar patiënten te beoordelen. Het voorkómen van het ontstaan van resistentie lijkt namelijk irrelevant omdat in hopen die nog maar kort (1 week) zijn bewaard al hoge resistentiefracties gevonden zijn. Een transmissieroute begint bij de bron van (resistente) *A. fumigatus* in de omgeving. Waar precies komt *A. fumigaties* in welke aantallen voor en hoe zijn de resistentiefracties op verschillende locaties, inclusief plekken aangeduid als hotspots en als coldspots. De bevinding van het huidige onderzoek dat resistente stammen van buiten een bewaarhoop al heel snel deze hoop kunnen koloniseren en hoge fracties resistentie onder alle

schimmels kunnen geven laat zien dat er ook in de omgeving resistente stammen voorkomen. Een recent rapport over hotspots buiten de bollensector laat dit ook zien. Door de gevonden aantallen schimmels en resistentiefractie gevonden in de bollenteelt af te zetten tegen gevonden aantallen in de omgeving en andere hot/cold-spots kan een beleidsmatige afweging worden gemaakt over gewenste beheersmaatregelen in specifieke sectoren en/of generieke maatregelen.

3.7 References

Al Hosni, A. S., Pittman, J. K., & Robson, G. D. (2019). Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic. Waste Management, 97, 105-114.

Dedesko, S., Siegel, J.A. Moisture parameters and fungal communities associated with gypsum drywall in buildings. Microbiome 3, 71 (2015). https://doi.org/10.1186/s40168-015-0137-y

Hokken, M. W., Zoll, J., Coolen, J. P., Zwaan, B. J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. (2019). Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. BMC genomics, 20(1), 1-17.

Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clinical microbiology reviews, 12(2), 310-350.

Maceková, L. (2012). 1-wire-the technology for sensor networks. Acta Electrotechnica et Informatica, 12(4), 52.

Millner, P. D., Bassett, D. A., & Marsh, P. B. (1980). Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from sewage sludge compost piles subjected to mechanical agitation in open air. Applied and environmental microbiology, 39(5), 1000-1009.

Schoustra, S. E., Zhang, J., Zwaan, B. J., Debets, A. J. M., Verweij, P. E., Buijtenhuijs, D., & Rietveld, A. G. (2019). New insights in the development of azole-resistance in Aspergillus fumigatus *RIVM Letter report 2018-0131*. Utrecht: RIVM.

Schoustra, S. E., Debets, A. J. M., Rijs, A. J., Zhang, J., Snelders, E., Leendertse, P. C., . . . Verweij, P. E. (2019). Environmental Hotspots for Azole Resistance Selection of Aspergillus fumigatus, the Netherlands. *Emerging Infectious Disease journal, 25*(7). doi:10.3201/eid2507.181625

Shelton, J. M., Collins, R., Uzzell, C. B., Alghamdi, A., Dyer, P. S., Singer, A. C., & Fisher, M. C. (2021). Citizen-science surveillance of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in UK residential garden soils. bioRxiv.

Verweij, P. E. (2017). Azole-resistance selection in Aspergillus fumigatus *Report on research commissioned by Netherlands Minstries of Health and of Agriculture*. Utrecht: Radboudumc, Wageningen University, CLM, RIVM.

Zhang, J., Lopez Jimenez, L., Snelders, E., Debets, A. J., Rietveld, A. G., Zwaan, B. J., ... & Schoustra, S. E. (2021). Dynamics of *Aspergillus fumigatus* in azole fungicide-containing plant waste in the Netherlands (2016–2017). Applied and environmental microbiology, 87(2), e02295-20.

Zhang, J., Debets, A. J., Verweij, P. E., & Schoustra, S. E. (2021). Selective Flamingo Medium for the Isolation of *Aspergillus fumigatus*. Microorganisms, 9(6), 1155.

4. Samenvatting en advies

Allereerst dient gezegd te worden dat de hier gepresenteerde resultaten van de experimenten gebaseerd zijn op experimenten die soms pas één keer zijn uitgevoerd. De hoeveelheid data voor deze experimenten en behandelingen is wel groot en extensief. De data betreffen onderzoek met tulpen-, lelie- of gladiolenmateriaal. Eerst is onderzoek met tulpen materiaal uitgevoerd. De resultaten daarvan zijn vervolgens bevestigd door het onderzoek met gladiolen- of leliemateriaal.

De gevonden aantallen sporen in de eerste monsters van de hopen varieerden van 1 x 10^4 tot 1 x 10^7. Het is onduidelijk of dit komt doordat het startmateriaal van de hopen al één of enkele dagen op een hoop lag, of dat de bollen al een tijdje van het land af waren gehaald. Er werden hoge percentages resistentie tegen azolen in deze sporen gevonden. Het is aannemelijk dat de resistentie van de schimmel al was ontstaan voordat deze de hoop koloniseerde, al zou de resistentie ook steeds opnieuw in de hopen kunnen ontstaan door nieuwe genetische veranderingen. Onze interpretatie van de resultaten is dat de gemuteerde variant van de schimmel overal voorkomt. Door aanwezigheid van azolen zal de resistente vorm snel uitgroeien in de afvalhopen en wordt de groei van de niet-resistente schimmel geremd. Hierdoor is het percentage resistente schimmel al snel hoog. Het zou interessant zijn om het percentage resistente schimmels op verschillende andere locaties te meten, zowel in hotspots als in niet-hotspots of in het algemene milieu. Dat kan een betere inschatting van de problematiek geven.

De eerste set aan experimenten geven aanwijzingen dat de afdekking van de hoop de groei van de schimmel in ieder geval niet remt. Het afdekken kan zelfs stimulerend werken op de groei van de schimmel. Het afdekken van de hoop kan de verspreiding van sporen door de wind tegengaan. Om dit te checken zijn luchtmonsters genomen wind afwaarts van hopen die wel of niet werden omgezet. Proeven met luchtmonsters wijzen uit dat er uit de niet-afgedekte hoop weinig sporen vrijkomen wanneer de hoop niet beroerd wordt. Bij het omgooien komen wel sporen vrij. Wanneer de hoop nat is gehouden/gemaakt komen er veel minder sporen vrij. Uit de online enquête en het kwalitatieve onderzoek blijkt daarnaast dat een aanzienlijk deel van de telers moeite heeft met het continu afdekken van de hoop.

Het nat houden van de hopen vermindert de groei van de schimmel aanzienlijk. De hoge vochtigheid kan de oorzaak hiervan zijn. De proeven met lelie- en gladiolenafval bevestigen het beeld dat de schimmelgroei in hopen die twee keer per week werden natgehouden, aanzienlijk lager is dan in de niet-natgemaakte hopen. Het nathouden van de hopen is een simpele manier om toe te passen. Een voordeel is dat het vochtig houden ook de verspreiding van sporen tijdens het omgooien van de hoop verminderd. Navraag bij enkele telers en een professionele composteerder bleek uit te wijzen dat zij geen problemen met de compostering verwachten wanneer de hoop nat is gehouden tijdens de tijdelijke opslag. Het materiaal moet zo wie zo al gemengd worden met andere materialen (bv stro, maaisel) om de goede samenstelling te krijgen voor het composteringsproces. Toevoeging van 50 L/kuub materiaal (1 kuub is ongeveer 400 kg bij tulpen) komt neer op 12% extra vocht. Voor een goede compostering moet het vochtgehalte tussen 40 en 60% liggen. De toevoeging van water is dus geen probleem.

De groei van de schimmel lijkt bij een langere bewaring van de hopen niet te leiden tot extra hoge sporenaantallen. Al na enkele dagen kunnen erg hoge sporenaantallen gevonden worden in het materiaal en dat vermeerdert niet erg veel meer na die twee weken. Om verschillende redenen is de maximale opslagtijd van de hopen van twee weken voor veel telers niet praktisch. Afvoer van de kleine hoeveelheden kost relatief veel geld omdat containers dan nog niet vol zijn. Ook compostering

is lastig vanwege tekort aan ruimte en tijd om iedere twee weken een nieuwe hoop te moeten inzetten.

Voor de meerderheid van de telers die zelf composteren lijkt het zelf meten en registreren van de temperatuur in de composthoop geen probleem. Dit geven de telers in ieder geval zelf aan.

Tot slot wordt in het protocol een administratieve verplichting benoemd met betrekking tot het doorgeven van een Verklaring Organisch Restmaterialen. Uit overleg met het Ctgb en NVWA blijkt dat weinig telers deze verklaring kennen en ook dat het onduidelijk is wie in de keten deze verklaring wel of niet moet gebruiken. Dit komt mede omdat de stromen van bollen(afval) onduidelijk zijn. Vanuit het oogpunt dat er weinig sporen ontsnappen uit tijdelijke afvalhopen die onberoerd blijven en/of natgemaakt zijn, zou een dergelijke verklaring niet nodig hoeven zijn. Eventueel zou een passage op de begeleidingsbrief kunnen worden opgenomen wanneer er afval van bollenteelt naar derden wordt vervoerd. Hierin kan gemeld worden dat het afval van bollenteelt betreft waarin azolen zijn toegepast end at daarom voor de opslag en verwerking van het afval het daarvoor bestemde protocol gevolgd moet worden.

De volgende conclusies met betrekking tot het protocol kunnen getrokken worden op basis van het uitgevoerde onderzoek:

- Het afdekken van de tijdelijke afvalhopen remt niet de schimmelgroei en kan zelfs de groei bevorderen. Het continue afdekken wordt ervaren als niet praktisch.
- Het moeten verwerken van de afvalhopen binnen twee weken leidt niet tot lagere sporenaantallen in het materiaal. Al na enkele dagen kunnen zeer hoge sporenaantallen gevonden worden die daarna weinig meer verhogen (tot 12 weken). De limitering van twee weken lijkt daarom niet effect te hebben. De variatie in het sporenaantal in het uitgangsmateriaal in het begin van de hopen is groot, ongeacht een nulmeting of niet. Dat is de praktijksituatie (zie ook 3.3.1.2). Het twee weken afdekken daarna voorkomt niet de groei en sporenproductie van de schimmel. Deze twee wekengrens wordt wel als erg onpraktisch ervaren door zowel telers die zelf composteren als kleinere telers die het materiaal moeten afvoeren.
- Een verklaring van organische restmaterialen lijkt moeilijk te controleren en te handhaven, mede door de onduidelijkheden wie nu wel of niet een dergelijke verklaring moet meesturen. Wanneer afvalhopen niet beroerd worden of voldoende natgemaakt worden voor beroering, lijkt de verspreiding van sporen beperkt te kunnen blijven. De vraag is of dan een dergelijke verklaring van toegevoegde waarde is.
- De hopen minimaal twee keer per week voldoende nat maken remt de groei van *A. fumigatus*. Het voldoende natmaken van een hoop zorgt voor een verminderde verspreiding van de sporen uit deze hoop wanneer de hoop wordt omgezet. Tezamen leidt natmaken tot een reductie van de verspreiding van (resistente en niet-resistente) *A. fumigatus* vanuit afvalhopen.

Deze conclusies zijn verwerkt in een concept alternatief protocol welke te vinden is in bijlage 5.

De resistente vorm van *A. fumigatus* kan makkelijk door recombinatie ontstaan en deze vorm is wijdverspreid aanwezig in Nederland. Het niet meer gebruiken van azolen zal deze aanwezigheid zeer beperkt beïnvloeden omdat de resistente vorm net zo goed groeit in afwezigheid van azolen als de niet-resistente vorm. Om het probleem met de resistentie vorm beheersbaar te maken is het dus zaak om de groei in en verspreiding uit hotspots te verminderen. Geconcludeerd kan worden dat door middel van het nathouden van de afvalhopen de groei van *A.fumigatus* in bollen afvalhopen en de verspreiding bij het omzetten substantieel wordt gereduceerd. Daarmee kan op een eenvoudige wijze dit probleem bij de bollensector beheersbaar worden en lijkt het in dezelfde orde te komen als het voorkomen en de verspreiding van *A. fumigatus* in andere sectoren.

In welke mate dit protocol werkzaam is voor andere sectoren, is onduidelijk. Dit hangt af van de aanwezigheid van de schimmel in het materiaal wat op die afvalhopen komt en de vochtigheid en temperatuur van die hopen. Het verdient de aanbeveling om dit eerst te onderzoeken alvorens het protocol ook voor andere sectoren te gebruiken.

De vochtigheid van de afvalhoop is cruciaal voor de beheersing van de groei en de verspreiding tijdens omzetting. De controle op de vochtigheid is beperkt wanneer alleen een papieren controle van de data en volumina van bewatering wordt vastgelegd op papier of digitaal. Een betere manier van controle kan zijn door een minimaal vochtigheidspercentage van de hoop te definiëren. Wat dit percentage moet zijn en hoe je dit het beste kan meten is nog niet duidelijk. Dit zou onderzocht moeten worden. De metingen die met de huidige hopen zijn gedaan gaven aan dat er veel variatie zit in metingen op één moment in één hoop. Dit komt door de heterogeniteit van het materiaal van de afvalhopen. Er zou daarom ook een meetprotocol ontwikkeld moeten worden dat beschrijft hoe je een betrouwbare indruk van de vochtigheid van de afvalhoop kunt meten. Hierin zou opgenomen kunnen zijn hoeveel monsters per hoop van 100 m^3 genomen moeten worden, op welke diepte en met welk soort meter. Ook zou de meter speciaal voor dit materiaal gekalibreerd moeten zijn. Dit kunnen telers dan ook gebruiken om zelf te meten of ze weer moeten bevochtigen of niet. Het protocol en het minimale vochtigheidspercentage zou dan mogelijk ook gebruikt kunnen worden in andere sectoren. Het is onzeker of dergelijke meters beschikbaar zijn. Hier zou onderzoek naar moeten worden verricht.

Bijlage 1 Informatieblad voor telers

Poster verspreid onder de telers om hun de procedures van monstername en behandeling uit te leggen.

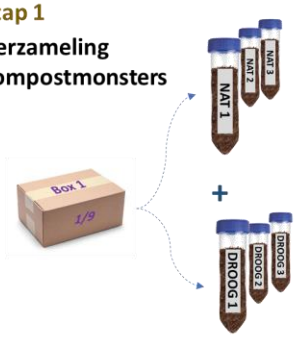


WAGENINGEN UNIVERSITY & RESEARCH Schuttelaar & Partners

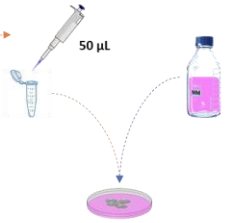
Effectieve praktijk maatregelen voor veilige verwerking van organisch materiaal dat residuen van azolen bevat afkomstig uit de bollenteelt

Stap 1

Verzameling compostmonsters



3g of monster



Het is belangrijk om de buis vol te sturen om er zeker van te zijn dat we genoeg materiaal hebben voor de laboratoriumanalyse

kolonies tellen na 3 dagen groeien bij 40°C

Methode A

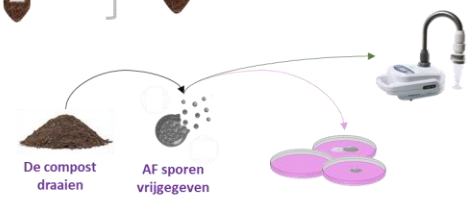
Gefilterd op **Coriolis luchtmonsternemers** (3 per hoop)

Methode B

Rechtstreeks op **DRBC-mediaplaten**

Stap 2

Vangst van AF sporen *in situ*



Bijlage 2 Vragenlijst on-line onderzoek

Vragenlijst kwantitatief onderzoek bollenafval

Dank u voor het meedoen aan deze enquête. Uw deelname is van belang om de tijdelijke regels voor het afdekken en verwerken van bollenafval goed te evalueren. De KAVB, Nefyto, LTO en het ministerie van I&W willen zo tot een effectief en praktisch protocol komen. We beginnen met enkele algemene vragen over het protocol.

1. Kent u het protocol hoe u moet omgaan met bollenafval van bollen die met azolen zijn bespoten/behandeld? (https://www.ctgb.nl/documenten/collegebesluiten/2021/02/24/bollen-azolen-protocol)

Ja,

een beetje,

nee

Ik gebruik geen azolen

2. Als u volgens het protocol werkt, hoe ervaart u dit?

heel makkelijk,

makkelijk,

neutraal,

lastig,

heel lastig

Ik werk niet volgens het protocol

3. Als u (heel) lastig volgens het protocol kunt werken, met welk aspect(en) heeft u moeite?

Open vraag

Hierna komen enkele vragen over specifieke aspecten van het protocol.

Het protocol zegt het volgende: Het organisch restmateriaal afkomstig van bloembol- en bloemknolgewassen waarbij azolen-bevattende gewasbeschermingsmiddelen zijn gebruikt wordt na aanvang van de opslag ten hoogste twee weken opgeslagen. Binnen twee weken moet het afval

- Gebruikt zijn voor een compostering;
- Worden uitgereden over het land; of
- Worden vervoerd naar een afnemende partij die het verwerkt door verbranden, vergisten of composteren.

4. Wat doet u gewoonlijk met uw bollenafval? Meerdere antwoorden mogelijk

Afvoeren naar professionele vergister

Afvoeren naar professionele composteerder

Op eigen bedrijf composteren

Uitrijden over het land

5. In hoeverre is het maximaal twee weken op uw bedrijf bewaren van het afval voor u mogelijk, voordat u het volgens zelf composteert?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

Neutraal

Lastig

Heel lastig

Niet van toepassing/dit doe ik niet

6. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

7. In hoeverre is het maximaal twee weken bewaren van het afval voor u mogelijk, voordat u het volgens zelf uitrijdt over het land?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

Neutraal

Lastig

Heel lastig

Niet van toepassing/dit doe ik niet

8. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

9. In hoeverre is het maximaal twee weken bewaren van het afval voor u mogelijk, voordat u het volgens afvoert / laat afvoeren naar een afnemer?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

Neutraal

Lastig

Heel lastig

Niet van toepassing/dit doe ik niet

10. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

11. Kunt u aangeven hoe lang u het afval zou willen kunnen bewaren voordat u het verwerkt/afvoert?

1 tot 2 weken

2 - 6 weken

6 - 10 weken

10 - 15 weken

Tot het voorjaar

Het protocol zegt het volgende: Gedurende de gehele bovengenoemde opslagperiode dient het organisch restmateriaal volledig afgedekt te worden opgeslagen (bijvoorbeeld in afgesloten containers of afgedekt met deugdelijk landbouwplastic) en mag niet gekeerd worden in deze periode.

12. In hoeverre is het volledig afgedekt houden van de afvalhoop, vanaf de start van aanleggen hoop, voor u mogelijk?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

neutraal

Lastig

Heel lastig

13. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

14. Heeft u een suggestie hoe anders de afvalhoop zoveel mogelijk afgedekt kan worden?

Open vraag

15. Welke andere manieren voor het bewaren en verwerken zou mogelijk zijn voor u (meerdere antwoorden mogelijk):

- Stomen en terug op het land brengen
- Afgedekt in een sleufsilo bewaren tot afvoer/compostering (na bv 10 weken maximaal)
- Nat houden (bv 2x/week afvalhoop goed nat maken) en na 10 weken composteren
- Andere manier namelijk: ……

Het protocol zegt: De temperatuur van het composterend materiaal moet aantoonbaar minimaal gedurende twee periodes van drie aaneengesloten dagen boven de 60 ^{o}C zijn. Tussen deze twee periodes van metingen dient het materiaal te zijn omgezet. De twee periodes van drie dagen waarin

wordt gemeten kunnen vrij worden gekozen, zolang tussen beide periodes maar een omzetting heeft plaatsgevonden. Shredderen en zeven worden niet als omzetten beschouwd.

16. Composteert u uw afvalmateriaal op uw bedrijf?

Ja

Nee: ga door naar vraag 22

17. Kunt u zelf metingen (laten) uitvoeren aan het begin en eind van een periode van 3 dagen wanneer de composthoop meer dan 60 graden is?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

Neutraal

Lastig

Heel lastig

18. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

19. Kunt u zelf een registratie bijhouden waarin u de dagen en temperaturen vastlegt van de composthoop en de momenten van omzetting, zodat u kunt aantonen dat u hierin het protocol volgt?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

Neutraal

Lastig

Heel lastig

20. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

Het protocol zegt dat de composthoop minimaal drie keer moet worden omgezet. Voor en na een omzetting moet de compost minimaal drie dagen 60 graden zijn.

21. Kunt u aangeven of deze werkwijze voor u mogelijk is?

Heel goed mogelijk

Mogelijk

neutraal

Lastig

Heel lastig

22. Indien u in de vorige vraag aangaf dat dit (heel) lastig is, kunt u aangeven waarom dit lastig is?

Open vraag

Tot slot hebben we nog enkele vragen over uw bedrijf.

23. Teelt u bollen of heeft u een broeierij?

Bollen

Broeierij

Beiden

24. Welke bollen kweekt u?

Voorjaarsbloeiers (bv Tulp, narcis, hyacint)

Lelie

Beiden

25. Hoeveel kubieke meter bollenafval van bollen waarbij azolen zijn toegepast produceert u?

Open vraag

26. Teelt u naast bloembollen andere gewassen, waarvan het afval ook op de hoop komt?

Nee

Ja

27. Indien u in de vorige vraag ja antwoordde, kunt u aangeven om welke gewassen dit gaat?

Open vraag

28. In welke regio ligt uw bedrijf?

Noord-Holland

Zuid-Holland

Flevoland/noordoost polder

Overijssel/Drenthe

Limburg

Anders

29. Heeft u nog opmerkingen en/of suggesties ten aanzien van restmateriaal en azolen?

Open vraag

30. Heeft u nog opmerkingen?

Open vraag