

Het effect van het natmaken van tulpenafval op de groei en verspreiding van *Aspergillus fumigatus* en de toepasbaarheid in de praktijk

10-03-2023

Wageningen, 10 maart 2023

Uitgevoerd door:

Léon Jansen¹, Mariana Santos Couta Silva², Sijmen Schoustra², Harry Kager¹ en Bas Zwaan²

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	6
1.1 Aanleiding en doel	6
1.2 Verantwoording	7
2. Aanpak	8
2.1 Experimenteel onderzoek naar de effecten van het natmaken van afvalhopen op de groei en verspreiding van <i>A. fumigatus</i>	8
2.1.1 Methodologie	8
2.1.2 Monsters van het materiaal - protocollen en analyse	9
2.1.2.1 Groei van <i>A. fumigatus</i> op tulpencomposthopen onder verschillende behandelingen .	9
2.1.2.2 Luchtbemonstering	10
2.1.2.3 Bepaling van de waterfractie van elke bewaarhoop	11
2.1.2.4 Temperatuurgegevens van bewaarhopen	12
2.1.2.5 Gewasbeschermingsmiddelen in het percolaat	13
2.1.3 Resultaten & Discussie	13
2.1.3.1 Groei van <i>A. fumigatus</i> in hopen tulpenmateriaal bewaard onder verschillende behandelingen	13
2.1.3.2 Fractie resistentie	15
2.1.3.3 Luchtbemonstering	16
2.1.3.4 Bepaling van de waterfractie van materiaal in bewaarhopen	17
2.1.3.5 Gewasbeschermingsmiddelen in percolaat	19
2.1.4 Voornaamste bevindingen	20
2.2 Interviews met personen van Waterschappen en omgevingsdiensten over de (milieu)risico's van het natmaken van de afvalhopen	21
2.3 Interview met een composteringsexpert over de mogelijkheid van het gebruiken van het natte bollenafval voor compostering	22
3. Synthese van resultaten en conclusies met betrekking tot het protocol	24
4. Samenvatting en advies	25
Bijlage 1 Het temperatuurverloop in de verschillende hopen	27
Bijlage 2: statistische analyse van de vermindering in verspreiding van schimmels naar de lucht.	31

Management samenvatting

Vanaf 1 maart 2021 zijn aan de gebruiksvorschriften 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. Het vorige onderzoek (Het effect van verschillende bewaar-omstandigheden van bollenafval op de groei en verspreiding van *A. fumigatus* en de toepasbaarheid in de praktijk) wees uit dat het protocol niet effectief was in de remming van de groei en verspreiding van *A. fumigatus*, en dat het protocol slecht uitvoerbaar was voor de telers. In dit onderzoek werd een alternatieve behandeling van de afvalhopen getest. Resultaten toonden aan dat wanneer materiaal van lelies en/of gladiolen tweemaal per week wordt natgemaakt de groei van *A. fumigatus* en de verspreiding van sporen tijdens het omzetten van de hoop worden geremd.

In het huidige onderzoek zijn deze bevindingen zijn opnieuw getoetst en bevestigd met tulpenmateriaal. Daarnaast zijn medewerkers van een drietal waterschappen en omgevingsdiensten geïnterviewd om meer inzicht te krijgen in gepercipieerde risico's en knelpunten van het alternatieve protocol. Uit deze gesprekken kwam naar voren dat een opslag met een aaneengesloten bodemvoorziening met dicht gekitte naden en vloeistof opvang (bv bassin) als wenselijk wordt gezien.

Tot slot heeft een composteringdeskundige bevestigd dat het mogelijk is om het natgemaakte bollenmateriaal te gebruiken voor compostering.

1. Inleiding

1.1 Aanleiding en doel

Vanaf 1 maart 2021 zijn aan de gebruiksvorschriften van azoolhoudende middelen die gebruikt worden in de bollenteelt een aantal voorschriften toegevoegd, die erop gericht zijn om het ontstaan en de verspreiding van resistente *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) te voorkomen. Deze voorschriften richten zich op de opslag en verwerking van bloembollenafval en zijn opgenomen in een protocol waar het gebruiksvorschrift naar verwijst. De achtergrond van deze bepalingen zijn de geconstateerde volksgezondheidsrisico's van een 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) geïnterviewd 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.

De belangrijkste bevindingen uit dit onderzoek zijn dat:

- Het bestaande protocol niet helpt om de groei en verspreiding van *A. fumigatus* te verminderen;
- Het bestaande protocol voor veel telers om verschillende redenen moeilijk uitvoerbaar is;
- Een alternatief protocol, gebaseerd op het nat maken van afvalhopen voordat deze worden gecomposteerd/uitgereden of anderszins verwerkt, mogelijk zowel de groei als de verspreiding tijdens het werken met de afvalhoop vermindert.

Het alternatieve protocol is gebaseerd op initiële proeven met tulpenafval en verder onderzoek dat is uitgevoerd met afval van gladiolen en lelies. Dit onderzoek hieraan riep nog enkele vragen op welke in een vervolgonderzoek zijn geadresseerd. Deze rapportage beschrijft de bevindingen van dit vervolgonderzoek en het advies wat daaruit volgt voor het alternatieve protocol.

Hoofddoel van het vervolgonderzoek is het evalueren of een alternatief protocol (bollenafval twee keer per week natmaken) zou leiden tot een lagere groei en lagere verspreiding van *A. fumigatus* in tulpenafval. Ook werd onderzocht wat het effect is van het eenmalig natmaken van de afvalhoop voorafgaand aan beroering in vergelijking met afvalhopen die structureel twee keer per week zijn natgemaakt. Tot slot werden watermonsters van het percolaat genomen om te kijken of er gewasbeschermingsmiddelen werden uitgespoeld met de gedane behandelingen.

Hiernaast is onderzocht of de vochtigheid van de afvalhopen beter te meten was door grotere monsters te nemen of door een vochtigheidsmeter te gebruiken.

Ook zijn drie omgevingsdiensten, drie waterschappen en één composteringsexpert geïnterviewd over respectievelijk hun visie op mogelijke risico's van het natmaken van de hopen op het milieu en de waterkwaliteit en op de mogelijkheid om het afvalmateriaal na de behandeling nog goed te composteren is.

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 2.1), Mariana Silva was de voornaamste praktische uitvoerende.

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.

2. Aanpak

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

1. Experimenteel onderzoek naar de effecten van het natmaken van afvalhopen op de groei en verspreiding van *A. fumigatus* in tulpenmateriaal.
2. Interviews met personen van Waterschappen en omgevingsdiensten over de (milieu)risico's van het natmaken van de afvalhopen
3. Interview met een composteringsexpert over de mogelijkheid van het gebruiken van het natte bollenafval voor compostering.

2.1 Experimenteel onderzoek naar de effecten van het natmaken van afvalhopen op de groei en verspreiding van *A. fumigatus*.

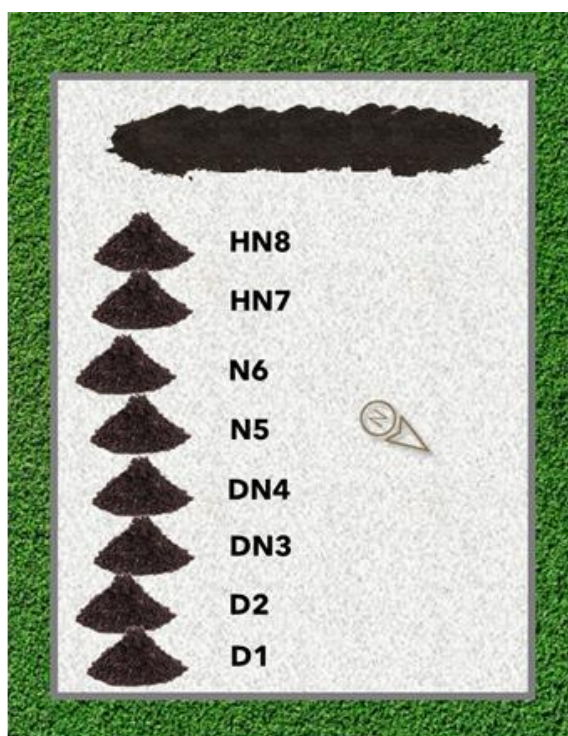
Tijdens het monitoringsprogramma om de effectiviteit van een nieuw protocol voor opslag van bollenmateriaal te onderzoeken, is gevonden dat het natmaken van bollenmateriaal tijdens de opslag zowel de uitgroei van schimmel, als ook de verspreiding van deze schimmel door de lucht vermindert.

Het onderzoek naar natmaken was in dat onderzoek exploratief van aard en met name toegepast op leliemateriaal. Naar aanleiding van de bevindingen dat natmaken een effect kan hebben van verminderde uitgroei en verminderde verspreiding door de lucht is dit aanvullende onderzoek uitgevoerd, nu met tulpenmateriaal en dus ook in een ander seizoen (met andere meteorologische omstandigheden).

Hier presenteren we de resultaten van dit aanvullende onderzoek, dat plaatsvond tussen augustus en oktober 2022.

2.1.1 Methodologie

Experimenten zijn uitgevoerd bij een bollenteler waar dood plantenmateriaal wordt opgeslagen totdat het gecomposteerd wordt. Na het selecteren van deze locatie zijn in de eerste weken van juli afvalhopen gemaakt van tulpenmateriaal. De hopen werden op het noordwesten geplaatst, dicht bij een muur van 50 centimeter die alle compostplaatsen afbakende. Er werd gekozen voor vier behandelingen voor het bewaren van bollenmateriaal, elk in duplo, dus in totaal acht afvalhopen. De behandelingen kunnen worden geclusterd in twee hoofdgroepen - droog en nat - en in vier kleinere groepen, afhankelijk van hoe droog (D en DN) of hoe nat (N en HN) (Figuur 1). De hopen werden 6 weken gevolgd om enerzijds voldoende data te genereren en anderzijds de duur van het experiment niet te lang te maken. De bevochtigingscondities voor elke hoop werden uitgevoerd door een adviseur van de teler. Monsternames van de hopen en het perculaat werden door deze adviseur samen met Léon Jansen uitgevoerd.



Code	Behandeling
Droge behandeling:	
D1 & D2	Droog houden tot en met het omzetten
Droge behandeling:	
DN3 & DN4	Droog bewaren en vlak voor het omzetten 1x nat maken (50L/m³)
Natte behandeling:	
N5 & N6	2 keer per week nat maken met 50L/m³ water
Natte behandeling:	
HN7 & HN8	2 keer per week nat maken met 100L/m³ water

Figuur 1. Opstelling van de bewaarhoppen met tulpenmateriaal voor het experiment en overzicht van behandelingen. Elk van de vier behandeling is in duplo uitgevoerd, er waren in totaal dus acht bewaarhoppen.

2.1.2 Monsters van het materiaal - protocollen en analyse

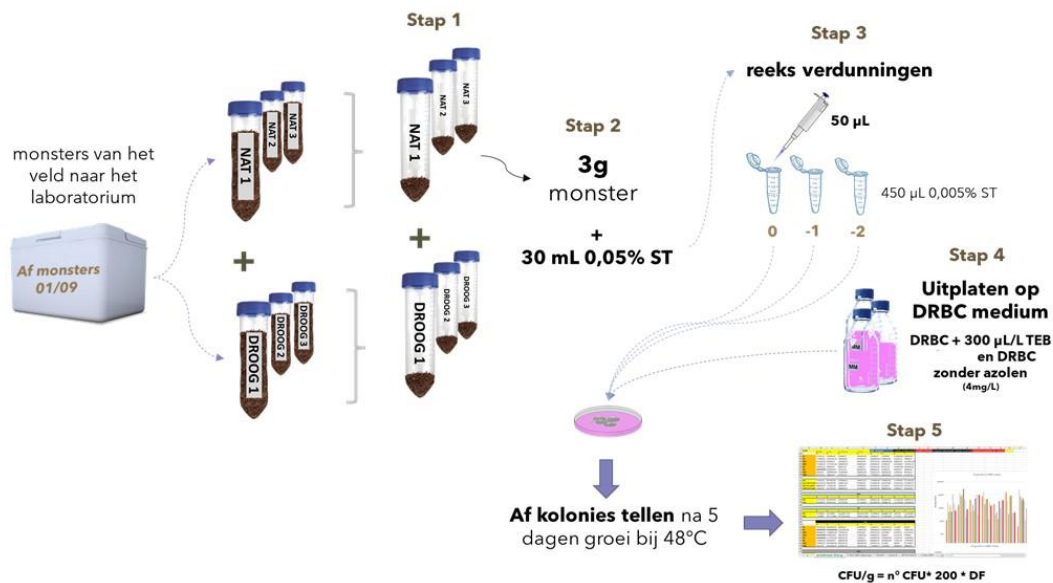
Voor dit onderzoek zijn dezelfde analyse protocollen gevolgd als voor het eerdere onderzoek, met enkele kleine aanpassingen. Hieronder staan nogmaals kort de methoden beschreven. Wekelijks is uit elke hoop een monster genomen op drie plekken elk op een armlengte diepte. Wekelijks werd 1 L monster genomen uit de hoop (in plaats van 50 mL) om het bepalen van een waterfractie mogelijk betrouwbaarder te kunnen uitvoeren dan in het eerdere onderzoek.

2.1.2.1 Groei van *A. fumigatus* op tulpencomposthoppen onder verschillende behandelingen

In het Laboratorium voor Erfelijkheidsleer (WUR) werd het vastgestelde protocol voor de groei-beoordeling van *A. fumigatus* gevolgd door een suspensie van het materiaal in verdunningen uit te platen op Flamingo-medium, zowel met en zonder azolen (4 mg/L tebuconazole) in het medium. Medium zonder azolen zou de totale populatie *A. fumigatus* moeten laten groeien, het medium met azolen alleen de *A. fumigatus* die resistent is. Door de groei op medium zonder en met tebuconazole te vergelijken, is de fractie *A. fumigatus* die resistent is tegen azolen bepaald. Alle monsters worden verdund in een zoutoplossing (0,05%). De monsters met meer *A. fumigatus*-sporen moeten een reeks verdunningen ondergaan (-1, -2, -3...) totdat het mogelijk is om het aantal kolonies, dat op de flamingo-agarplaten groeit, nauwkeurig te tellen (Fig. 2). De flamingo-groeimedia zijn een specifiekere media dan de veelgebruikte DBRC-media en eerder ontwikkeld en gevalideerd door ons fumigatusteam bij het Laboratorium voor Erfelijkheidsleer.

Na alle reeksen verdunningen en uitplaten worden de monsters gedurende 5 dagen bij 48°C geïncubeerd. Dit zijn selectieve groeiomstandigheden voor *A. fumigatus*. Zodra de incubatieperiode voorbij is, werd het aantal kolonies geteld en de respectieve kolonievormende eenheden (CFU) per gram compost berekend met behulp van de volgende formule:

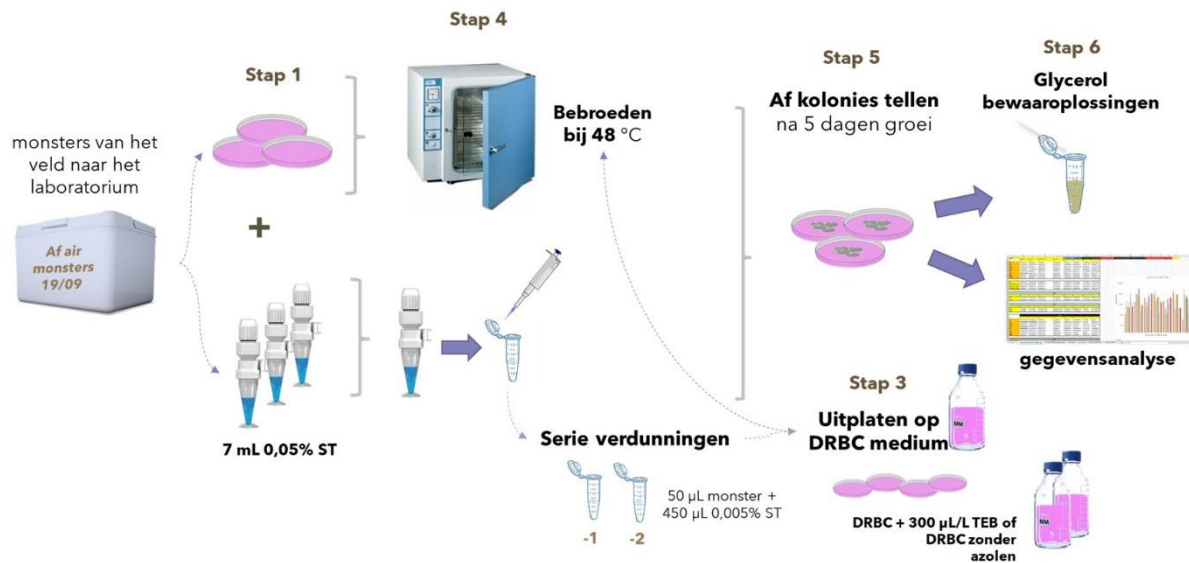
$$\frac{CFU}{g} = n^{\circ}CFUs * 200 * \text{verdunningsfactor}$$



Figuur 2. Methodologie voor de analyse van compostmonsters.

2.1.2.2 Luchtbemonstering

Het luchtbemonsteringsexperiment om de verspreiding van sporen uit de afvalhopen te meten werd uitgevoerd op 19 september 2022. In totaal zijn 11 luchtbemonsteringen uitgevoerd, met elk vier afstanden, waaronder één afstand meer dan in eerdere luchtbemonsteringsexperimenten (5, 10, 15 en 20 meter). Per afstand en per hoop werden drie replica's verzameld door in twee minuten alle schimmelsporen in 400 L lucht af te vangen in een zoutoplossing. De luchtbemonstering was verdeeld in drie hoofdgroepen: voor het omzetten (één serie), tijdens het omzetten (één serie per elk van de acht bewaarhopen) en tussen het omzetten van de bewaarhopen (twee series). Bij het omzetten van de bewaarhopen zijn we bij de natste hopen (HN8 en HN7) begonnen en steeds naar een drogere hoop gegaan. Tussen het meten van de verspreiding bij het omzetten werden extra monsters opgenomen om te controleren of er nog achtergrondsporen in de lucht zijn. In totaal werden 132 monsters verzameld en in het laboratorium geanalyseerd (Figuur 3).



Figuur 3. Methodologie voor de analyse van luchtmonsters.

2.1.2.3 Bepaling van de waterfractie van elke bewaarhoop

Om het watergehalte van elke hoop te bepalen, werd wekelijks een doos met 1L afvalmateriaal verzameld voor analyse. Bij het eerdere onderzoek werden slechts enkele grammen materiaal gebruikt voor deze bepaling, nu 1L materiaal. Verder is hetzelfde protocol gevolgd waarbij het materiaal 24 uur werd gedroogd bij 90°C om al het vocht te laten verdampen. Voor en na het drogen is het gewicht bepaald (Figuur 4 en 5), waarbij het verschil in gewicht de absolute hoeveelheid water in het oorspronkelijke monster is. De waterfractie wordt bepaald door de ratio absolute hoeveelheid water in het monster en het totaal gewicht van het monster voor de droogbehandeling.



Figuur 4. Methodologie voor de schatting van de waterfractie via de 1L verzamelde monsters.

a



b



Figuur 5. Monsternamen van materiaal van bestudeerde bewaarhopen met tulpenmateriaal, voor de evaluatie van hun waterfractie – voorbeeld van materiaal van hopen a) D1 + D2 en b) N5 + N6.

2.1.2.4 Temperatuurgegevens van bewaarhopen

Thermosensoren werden gebruikt om informatie te verzamelen over de temperatuur in elke hoop, en de dynamiek ervan gedurende de tijd dat het experiment liep (zeven weken). De sensoren werden in de kern van de afvalhopen geplaatst en de sensoren waren geprogrammeerd om elke 12 uur de temperatuur te meten (Fig. 6).

a



b



c**d**

Figuur 6. Sensoren: a) labelen voordat ze in de bewaarhoop worden geplaatst, b) plaatsen van labels in de hoop, c) label met draad blijft buiten de hoop, d) sensoren worden in het lab schoongemaakt na het laatste veldexperiment, voor uitlezing van de data.

2.1.2.5 Gewasbeschermingsmiddelen in het percolaat

Om de gehalten aan azolen en hun residuen te meten in het percolaat (water dat uit de bewaarhopen stroomt) te meten zijn monsters genomen van dit percolaat (50 mL water) op 11 tijdstippen. Deze monsters zijn aangeboden aan verschillende bedrijven om de analyse uit te voeren. Bij het gereedkomen van dit rapport waren de resultaten van deze analyses nog niet bekend.

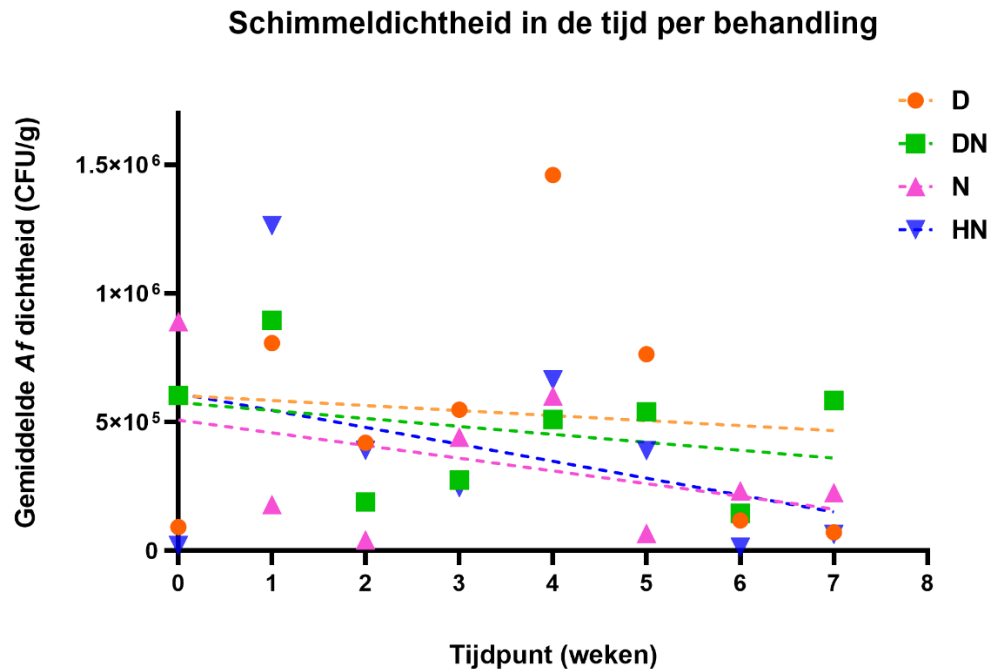
2.1.3 Resultaten & Discussie

2.1.3.1 Groei van *A. fumigatus* in hopen tulpenmateriaal bewaard onder verschillende behandelingen

Om de groei van *A. fumigatus* te meten in de tijd hebben we wekelijks een serie monsters genomen van elk van de vier behandelingen van de bewaarhopen (Figuur 1). Figuur 8 laat de waarnemingen zien per week per soort behandeling. Er is veel spreiding van de resultaten voor alle behandelingen, zowel tussen de drietechnische replica's die zijn genomen in elke hoop op elk tijdpunt als ook tussen de verschillende tijdpunten en tussen de twee hopen die dezelfde behandeling kregen. Dit weerspiegelt de variatie tussen de monsters en de heterogeniteit van het materiaal. Gemiddeld gezien is er in de tijd weinig verschil (niet statistisch significant) tussen de waarnemingen per soort behandeling. Punten die er op het oog dus uitschieten vallen binnen de variatie van alle waardes voor de droge of natte behandeling. Er zijn weinig verschillen tussen de verschillende hopen die droog zijn bewaard (al dan niet met één waterbehandeling net voor omzetten, dus de hopen N-DN). Ook maakt de hoeveelheid water gebruikt bij de waterbehandelingen niet veel uit (50 of 100 liter per m³, behandelingen N-HN).

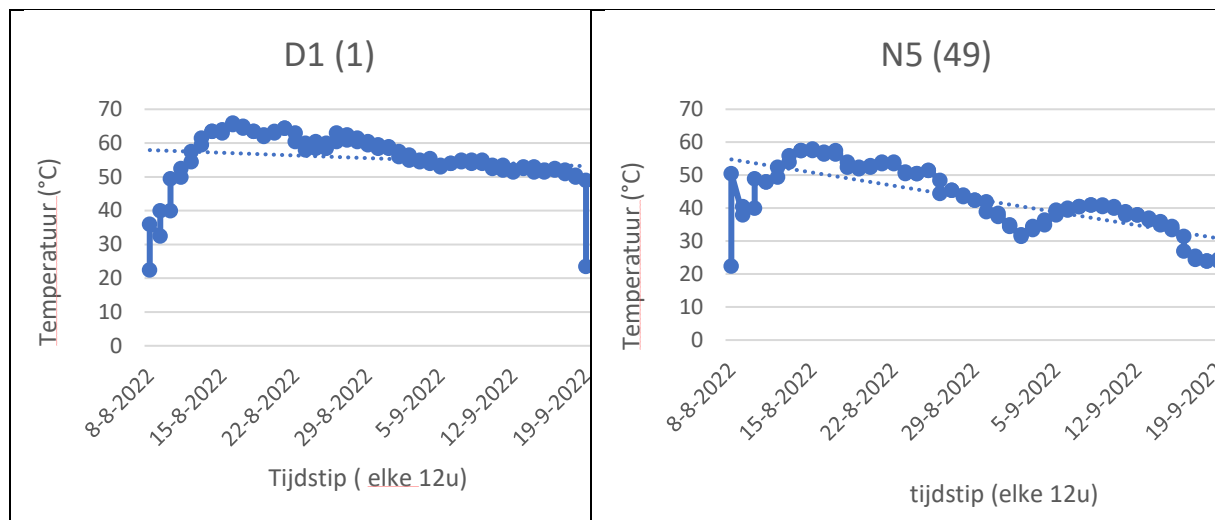
Alle tijdpunten samengenomen is het gemiddelde verschil in schimmeldichtheid tussen D-DN aan de ene kant versus N-HN aan de andere kant een factor 2,5. Dit is dus het gemiddelde van alle gevonden aantallen sporen in alle droge monsters versus alle natte monsters. De gevonden verschillen in uitgroei tussen “droge” en “natte” hopen liggen in dezelfde orde grootte maar zijn kleiner dan in de eerdere ronde metingen met tulpenmateriaal en leliemateriaal. Dit komt mogelijk doordat alle hopen minder lang zijn gevolgd en er dus minder data verzameld zijn in vergelijking met het vorige

onderzoek. Ook zijn in de vorige ronde van het onderzoek niet alle hopen die droog of nat werden bewaard van hetzelfde materiaal uitgangsmateriaal, maar de vergelijking van de vorige ronde van het onderzoek is gedaan tussen meerdere telers die meededen met het onderzoek.



Figuur 8: Schimmeldichtheid (aantal *A. fumigatus* sporen per gram materiaal) in tulpenmateriaal bewaard voor zeven weken onder vier soorten behandelingen. Punten zijn gemiddelden van twee hopen bewaard onder dezelfde condities die elk met drie replicas zijn bemonsterd. Gestippelde lijnen geven de trend aan per soort behandeling.

Met behulp van thermosensoren hebben we het temperatuurverloop in de bewaarhopen gemeten. Figuur 9 laat twee representatieve profielen zien, één van een droge hoop en één van een natte hoop. Deze profielen laten zien dat door de tijd de temperatuur in de droge hopen op de meeste momenten hoger is dan in natte hopen.



Figuur 9. Temperatuurverloop gemeten met thermosensoren. De figuur laat het verloop zien van één representatieve droge (D1) en natte (N5) hoop. Aan het begin van de meetperiode is de sensor in de hoop geplaatst en aan het eind er weer uitgehaald – dit is te zien aan de begin en eind meetpunten die de omgevingstemperatuur van dat moment laten zien. Te zien is verder dat in de eerste week na het aanleggen van de hoop de temperatuur oploopt en daarna langzaam daalt. In droge hopen is de temperatuur hoger en daalt deze langzamer dan in natte hopen.

Duiding van resultaten

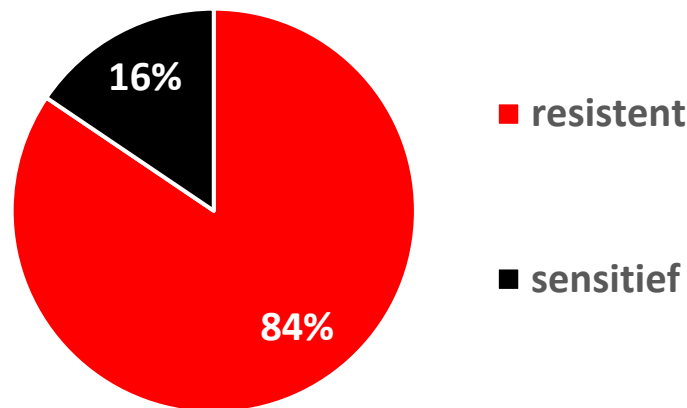
De resultaten laten zien dat het natmaken van het tulpenmateriaal een effect heeft op de uitgroei van *A. fumigatus*. De resultaten laten ook zien dat de groei al snel plaatsvindt en dat na 1 week er al groeiverzadiging optreedt op aantallen rond 5×10^5 schimmelsporen per gram. Deze aantallen komen overeen met de gevonden aantallen in tulpenmateriaal in het vorige onderzoek. Door de tijd heen is er grote variatie in tellingen. Dit is toe te schrijven aan de heterogeniteit van het tulpenmateriaal en ook vergelijkbaar met eerder onderzoek.

De temperatuurmetingen laten zien dat het verloop van temperatuur verschilt tussen droge en natgemaakte hopen. In de droge hopen blijft de temperatuur langer op een hoger niveau dan in de natgemaakte hopen. Of dit ligt aan de microbiële activiteit die in de natte hopen wordt geremd of door het koelend effect van water zelf, is niet duidelijk.

Eerder onderzoek toonde aan dat compostering *A. fumigatus* afdoodt. De grens van 60 graden voor afdoding is niet heel exact aan te geven omdat subtiele variatie en heterogeniteit de doorslag geven. Bij composteren wordt de composthoop regelmatig omgezet om de hoge temperatuur uniform te krijgen in de hoop. Bij bewaarhopen is dat niet het geval.

2.1.3.2 Fractie resistentie

Van alle monsters hebben we de fractie resistente *A. fumigatus* tegen tebuconazole bepaald. Dit hebben we gedaan door de dichtheid van *A. fumigatus* te meten op groeimedum met tebuconazole en dit te vergelijken met dichtheid gemeten op medium zonder azolen. De resultaten laten geen verschillen zien in de tijd en ook niet tussen behandelmethoden. Over het geheel genomen, vonden we dat de fractie resistente *A. fumigatus* rond 84% is (Figuur 10).



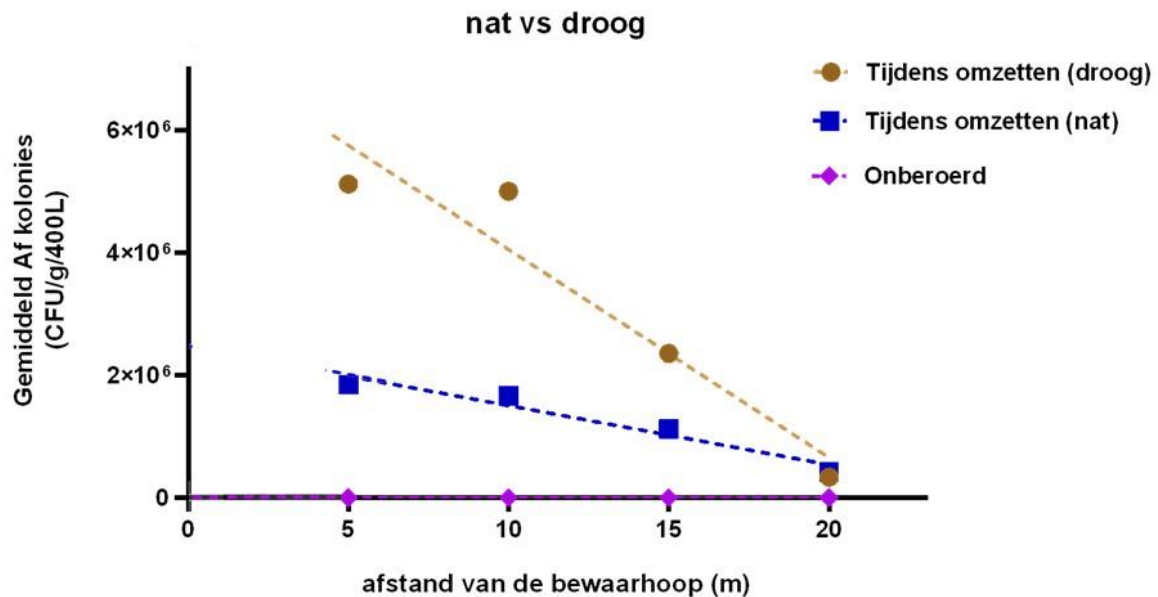
Figuur 10: Fractie van schimmelsporen die resistent zijn en die gevoelig (=sensitief) zijn tegen tebuconazole. De waarden varieerden tussen 55% en 100%.

Duiding van resultaten.

We vinden een resistentiefractie die ongeveer gelijk is voor alle tijdpunten en behandelmethoden. Deze fractie is vergelijkbaar met de fractie die in eerder onderzoek werd gevonden. Dit laat zien dat de schimmels die het materiaal koloniseren waarschijnlijk al voor een bepaalde mate uit resistente types bestaan. Tijdens de bewaring van de afvalhoop groeien de resistente varianten sneller uit waardoor een hoog percentage resistentie wordt gevonden. Het is onwaarschijnlijk dat de resistentie zelf in deze korte tijd in de afvalhoop ontstaat.

2.1.3.3 Luchtbemonstering

Aan het einde van de zeven weken bewaarperiode hebben we alle bewaarhopen één voor één omgezet gedurende 15 minuten. Hierbij hebben we op vier afstanden luchtmetingen verricht, door op elke afstand in drievoud de aantallen *A. fumigatus* in 400 L op te vangen in zoutoplossing om het aantal te kunnen bepalen. Ook zijn metingen verricht voordat de hopen werden verstoord. Natte bewaarcondities laten een lagere verspreiding van sporen zien dan droge bewaarcondities en als hopen niet beroerd zijn, verspreiden er nauwelijks sporen naar de lucht (Figuur 11). Van de vier hopen die droog zijn bewaard (D1, D2, DN3, DN4) waren er twee die net voor het omzetten nagemaakt zijn. We vonden geen verschillen in verspreiding naar de lucht tussen deze vier hopen. Van de vier hopen die tweemaal wekelijks natgemaakt zijn, kregen twee hopen 50 L/m³ en twee hopen 100 L/m³. We vonden geen verschillen tussen de hopen die een verschillende hoeveelheid water kregen. In Figuur 11 zijn alle gegevens van de droge hopen enerzijds en de natte hopen anderzijds gecombineerd. De bemonstering op vier afstanden van de hoop maakt het mogelijk om een schatting te maken van de verschillen in verspreiding op 0 (nul) meter van de hoop. Deze schatting gebaseerd op de proefopzet laat dan zien dat er ongeveer een factor 3,5 verschil in verspreiding is tussen natte en droge hopen. Dit is van belang voor de medewerkers die met deze hopen werken.



Figuur 11. Resultaten van luchtbemonstering uitgevoerd voor en tijdens het omzetten van hopen tulpenmateriaal bewaard onder droge of natte omstandigheden. Luchtmonsters zijn genomen tijdens het omzetten van elke hoop op vier afstanden en elke meting is in drievoud gedaan. Er waren vier hopen bewaard onder droge omstandigheden waarvan er twee vlak voor omzetten éénmalig nat zijn gemaakt. Er waren vier hopen bewaard onder natte omstandigheden waarbij er twee meer water kregen. We vonden geen verschillen tussen de vier hopen bewaard onder droge omstandigheden en ook niet tussen de vier hopen bewaard onder natte omstandigheden. Deze zijn elk samengenomen in deze grafiek.

Duiding van resultaten

De resultaten van luchtmetingen bij bewaarhopen die al dan niet zijn natgemaakt tijdens opslag laten zien dat het natmaken van bewaarhopen tijdens opslag een duidelijke vermindering in de verspreiding naar de lucht veroorzaakt. Het vlak voor omzetten natmaken van hopen die verder onder droge condities zijn bewaard heeft geen effect op de verspreiding van *A. fumigatus* sporen naar de lucht. Ook vinden we geen verschillen tussen de twee verschillende behandelingen van natmaken voor de verspreiding van schimmelsporen naar de lucht (50 of 100 liter water per m³ materiaal). Onberoerde hopen laten geen noemenswaardige verspreiding van sporen zien (tussen 0 en 200 sporen per 400L lucht). De metingen tussen verschillende omzettingen van hopen door lieten zien dat er in een rustsituatie geen noemenswaardige aantallen sporen in de lucht aanwezig waren.

2.1.3.4 Bepaling van de waterfractie van materiaal in bewaarhopen

Met de methode van drogen van materiaal en het wegen van materiaal voor en na drogen hebben we een grote variatie in waterfractie per monster waargenomen, in de tijd en tussen de behandelingen. De verschillen waren zo groot, dat er geen systematische verschillen tussen bewaarmethoden is gemeten met deze meetmethode. In totaal werden 44 monsters geanalyseerd, met de nadruk op monsters van de hopen N5, N6, HN7 en HN8. De hopen D1, D2, DN3 en DN4 werden bemonsterd in het eerste (T0) en laatste tijdstip (T7). Van het materiaal werd 1 liter na inwegen gedroogd om al het vocht te laten verdampen. Na drogen werd het gewicht opnieuw gemeten.

Naast het meten van de vochtigheid door het vocht eruit te laten verdampen, is ook geprobeerd om met een apparaat het vocht te meten. De selectie van een apparaat hiervoor is moeilijk omdat het materiaal wat gemeten moet worden erg heterogeen van samenstelling is. Apparaten met twee meetpunten hebben daarom snel de kans om gedeeltelijk in lucht of in water te zitten waardoor dit onbetrouwbare resultaten geeft. Na overleg met verschillende fabrikanten van vochtigheidsmeters hebben we een apparaat aangeschaft met één meetpunt welke geschikt is om in meer heterogene materialen zoals strobalen het vochtgehalte en de temperatuur te meten. Helaas voldeed dit apparaat ook niet omdat de vochtigheidsgehaltenes hoger dan het meetbereik van het apparaat bleken te zijn.

Visuele inspectie en bepalingen van de vochtigheid van de hopen met de hand lieten zien dat natgemaakte hopen meer vocht bevatten dan droge hopen. Op 40 cm diepte werd uit een hoop een hand materiaal genomen. Deze hand vol materiaal werd dichtgeknepen. Materiaal uit droge hopen viel bij het openen van de hand weer uiteen. Bij natgemaakte hopen viel het materiaal niet uiteen en kwam er na (hard) knijpen water uit.



Figuur 12. Verschil van het uiteenvallen van een hand materiaal na het dichtknijpen tussen een droge hoop (a) en een natte hoop (b). Natter materiaal blijft meer aan elkaar geplakt zitten.

Duiding van resultaten

De grote variatie in gevonden waterfracties tussen replica monsters uit dezelfde hoop laten zien dat het materiaal erg heterogeen is en dat dit gevolgen heeft voor de herhaalbaarheid van deze metingen op het niveau van een bewaarhoop. Visuele inspectie van de hopen laat zien dat de natgemaakte hopen veel water bevatten waardoor het materiaal in de hand na het samenknijpen niet uit elkaar valt. Materiaal van droge hopen daarentegen valt uit elkaar nadat het in een hand is samengeknepen. Dit laat zien dat natgemaakte hopen wel degelijk meer vocht bevatten dan droge hopen.

De bepaling van de vochtigheid met de hand lijkt daarom een meer betrouwbare methode om te kunnen vaststellen dat hopen natgemaakt zijn. Er zou hiervoor een schaal gemaakt kunnen worden met visuele voorbeelden van nat en droog materiaal zodat hiermee gehandhaafd zou kunnen worden. Er is dus geen duidelijke cijfermatige waarde te noemen en te meten om aan te geven of de afvalhoop voldoende nat is. Wel is gebleken dat met de huidige behandeling de groei en de verspreiding van *A. fumigatus* wordt geremd en dat het met deze knijpproef met materiaal uit de hoop is vast te stellen of de hoop voldoende nat is gemaakt.

2.1.3.5 Gewasbeschermingsmiddelen in percolaat

Door middel van GC-MS hebben we de concentraties van gewasbeschermingsmiddelen bepaald in het percolaat (het water dat afvloeit van de bewaarhoop). Resultaten staan in Tabel 1. De azolen die gedetecteerd zijn, zijn prothioconazole-desthio en prochloraz. Daarnaast zijn enkele andere bestrijdingsmiddelen (multi-pesticiden) gedetecteerd (Tabel 1). De hoogste concentratie prothioconazol-desthio (0,55 mg/kg) werd gedetecteerd bij de bemonstering van week 1 (10 augustus). De gevonden waarden liggen lager dan gangbare MIC (minimal inhibitory concentration) waarden voor azolen (van 1-4 mg/L). De waarden liggen in dezelfde orde grootte als eerder gevonden in bollenmateriaal waar azolen zijn toegepast.

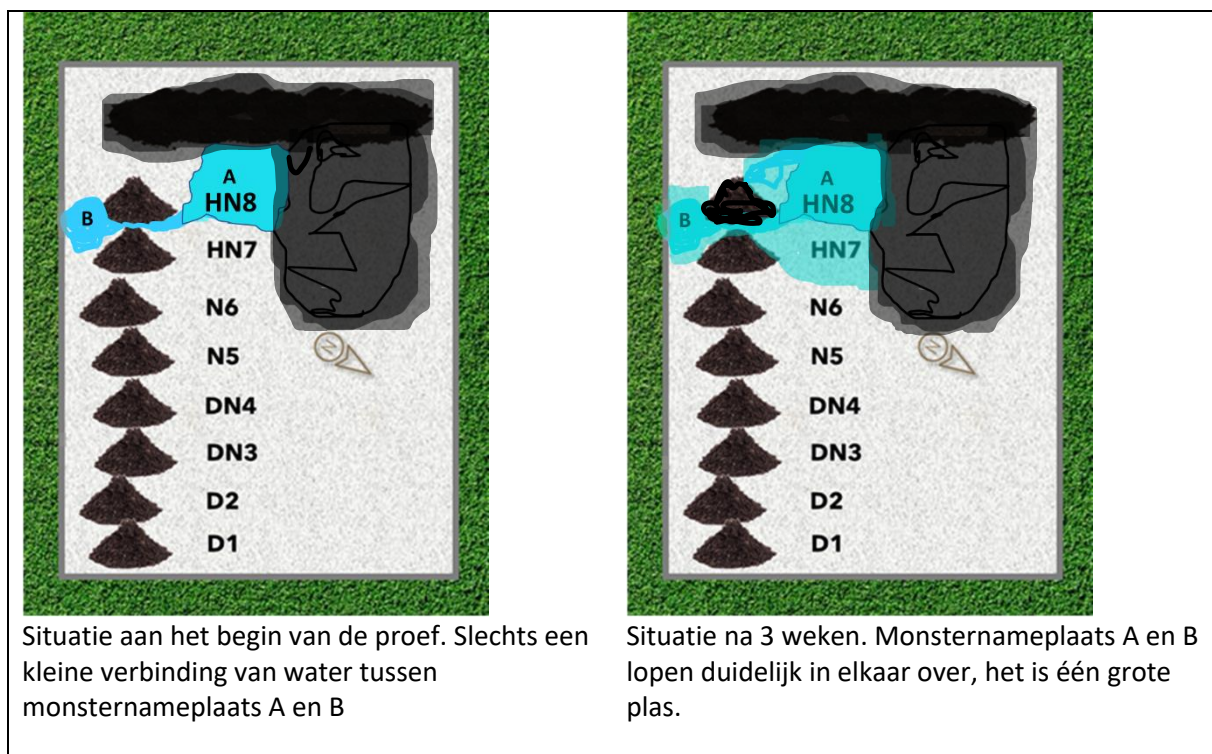
Tabel 1. Concentratie van pesticiden in percolaat (in mg/kg). Naast twee azolen (gemarkeerd met #) zijn ook verschillende andere pesticiden aangetroffen. De meetfout is 50%.

Monster (datum en locatie meetpunt)	Prothioconazole- desthio#	Prochloraz#	fluopyram	carbendazim	thiofanate- methyl	BTS 44595	BTS 44596	clofentezine
10/8 A	0,055	0,021	0,140	*	*	0,013		0,073
17/8 A	0,019	*	0,059	*	0,066	*		*
24/8 A	0,018	*	0,076	0,037	*	*		*
24/8 B	0,038	*	0,140	*	*	*		0,12
7/9 A	0,041	*	0,140	*	*	*		*
7/9 B	0,023	0,018	0,092	*	*	0,014	0,026	*
14/9 A	0,028	*	0,150	*	*	*	*	0,040
19/9 A	0,014	*	0,056	*	*	*	*	*
19/9 B	0,014	*	0,051	*	*	*		0,013
MAX	0,055	0,021	0,150			0,014		0,12
MIN	0,014	0,018	0,051			0,013		0,013
gemiddeld	0,028	0,020	0,100			0,014		0,062

* niet gedetecteerd (detectielimiet is 0,01 mg/kg), # dit middel behoort tot de azolen.

Figuur 13 laat zien waar de monsters van het percolaatwater zijn genomen op de locatie waar de veldproef plaatsvond. De monsters zijn genomen op punt A en op punt B (zie ook Tabel 1). Naast de experimentele bewaarhopen die zijn bemonsterd voor *A. fumigatus* lagen ook andere hopen met materiaal. Door regen zijn grote plassen ontstaan rondom de bewaarhopen. Het opgevangen percolaat is afkomstig van meerdere hopen, niet alleen van de experimentele bewaarhopen die onderdeel waren van de studie. Hierdoor is het niet duidelijk of het percolaat en de gevonden pesticiden het gevolg zijn van experimentele behandelingen van natmaken of van uitspoeling door regenval.

Uit eerdere metingen van eerder onderzoek is bekend dat niet alle azolen uitspoelen, er zijn ook azolen aangetroffen in bollenmateriaal na meerdere weken van opslag.



Figuur 13. Situatieschets van monstername van percolaat water. Op hetzelfde afgesloten terrein lag meer bollenmateriaal dan gebruikt voor de veldproef. Door regen zijn grote plassen ontstaan waardoor het opgevangen percolaat een mengsel is van uitspoeling door onze waterbehandelingen en uitspoeling door regenval.

2.1.4 Voornaamste bevindingen

De aanleiding van dit onderzoek was de eerdere bevinding dat het natmaken van bollenmateriaal in vergelijking met droog materiaal een vermindering in uitgroei van *A. fumigatus* en een vermindering in de verspreiding naar de lucht laat zien. Dit eerdere onderzoek is uitgevoerd met lelie- en gladiolenmateriaal. Het huidige onderzoek, nu systematisch uitgevoerd met tulpenmateriaal, bevestigt de resultaten van dit eerdere onderzoek.

Het natmaken van materiaal gaf in dit onderzoek met tulpenmateriaal een groeireductie van een factor 2,5 en een reductie van verspreiding met 3,5. Wanneer er een factor 2,5 minder sporen in het materiaal zit (60% reductie = 0,4) en deze verspreiden zich ook nog eens een factor 3,5 minder (66% reductie = 0,33), zal er in totaal bij de omzetting van een hoop afgerond een factor 7 minder sporen verspreiden ($0,4 \times 0,33 = 0,132$ is ongeveer 85% reductie of $1/7e$). Samengenomen is dit dus een reductie met een factor zeven, ofwel ongeveer 85%. Deze reductie is ook statistisch significant (t-toets, $P < 0,001$; zie bijlage 2 voor statistiek tabel).

Tulpenmateriaal is droger dan leliemateriaal. Dit vervolgonderzoekonderzoek is uitgevoerd in augustus- september onder ideale groeiomstandigheden voor *A. fumigatus*. Dit benadrukt dat natmaken een remmend effect heeft op groei en verspreiding, ook in deze voor de schimmel goede groeiomstandigheden.

Het onderzoek bevestigt eerdere bevindingen dat onberoerde hopen nauwelijks verspreiding van sporen naar de lucht veroorzaken en ook dat de bewaarduur van de hoop niet van invloed is op schimmeldichtheid.

Hoewel visuele inspectie en resultaten van schimmelmetingen duidelijk laten zien dat de hopen nat gemaakt zijn, was dit lastig te meten met onze meetmethode. Er werd een grote variatie gevonden in de tijd en tussen duplo's. Het met de hand uitknippen van materiaal om zo vast te stellen of hopen natgemaakt zijn, lijkt een betere optie en het is onze aanbeveling dit verder uit te werken en te valideren (bijvoorbeeld het ontwikkelen van een schaal met een "ijklijn" waarmee de vochtigheid kan worden afgelezen).

2.2 Interviews met personen van Waterschappen en omgevingsdiensten over de (milieu)risico's van het natmaken van de afvalhopen

Op basis van het vorige onderzoek is er een alternatief protocol vastgesteld om de groei en verspreiding van *A.fumigatus* in hopen van bollenafval te verminderen. Dit alternatieve protocol behelst het twee keer per week natmaken van de afvalhopen met 50L/m³ afval. Deze behandeling bleek de groei en de verspreiding tijdens het omzetten van een hoop te verminderen.

Het natmaken van de hopen met water roept echter een aantal vragen op die we hebben geprobeerd te beantwoorden door een drietal omgevingsdiensten en waterschappen te interviewen. We hebben gesproken met specialisten van Waterschap Zuiderzeeland, Waterschap Drents Overijsselse Delta en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (HHNK) en van de omgevingsdiensten Flevoland & Gooi en Vechtstreek; Midden-Holland en Noord-Holland Noord.

De belangrijkste vragen die naar aanleiding van het alternatieve protocol waren gerezen, waren de volgende:

- a) Ziet de respondent problemen met betrekking tot de herkomst van het water wat voor het natmaken van de hopen wordt gebruikt?
- b) Ziet de respondent problemen met betrekking tot het percolaat wat ontstaat door het natmaken van de hopen?
- c) Wat voor systeem ziet de respondent als optimaal voor het natmaken van de hopen?

Hieronder geven we de samengevatte resultaten van de interviews.

a) Herkomst van het water

Vooral in gebieden met een lagere waterstand in de zomer kunnen er twijfels zijn of het handig is hiervoor grondwater te gebruiken. Ook in de kustgebieden zou er bij voorkeur niet veel oppervlakte/grondwater onttrokken moeten worden. De respondenten denken dan ook dat een recirculatiesysteem met opvang van het gebruikte water en ook van neerslag een oplossing kan zijn om te voorkomen dat er veel grondwater gebruikt moet worden. Het onttrekken van grondwater werd niet als een erg groot probleem ervaren. Als het echter anders kan door gebruik te maken van recirculatie, dan heeft dat duidelijk de voorkeur.

b) Percolaatwater

Percolaatwater van bollenafval kan nutriënten (stikstof, fosfaat) en gewasbeschermingsmiddelen (gbm) bevatten. Het is onwenselijk dat deze in het oppervlaktewater terechtkomen. In de huidige regelingen staat dat voor langere opslag de afvalhopen op een niet-doorlatende laag of op een stuk grond met een minimaal organische stofgehalte (een absorberende laag) geplaatst mag worden. Respondenten vinden het over het algemeen beter wanneer het percolaat wordt opgevangen en later eventueel over het land wordt uitgereden. Overigens schatten omgevingsdiensten het risico van aanwezige gewasbeschermingsmiddelen in het percolaat als minder risicovol in dan medewerkers

van Waterschappen. Een opslag met een aaneengesloten bodemvoorziening met dicht gekitte naden en vloeistof opvang (bv. bassin) wordt als wenselijk gezien. Dit mede omdat in de nieuwe omgevingswet, die per 1 juli 2023 ingaat, een dergelijke opslag voor organisch afval wordt geëist wanneer het langer dan zes maanden wordt opgeslagen. Het besluit activiteiten leefomgeving meldt het volgende:

Artikel 4.882 (bodem: opslag groenafval)

- 1. Met het oog op het voorkomen van verontreiniging van de bodem wordt niet-houtachtig groenafval, dat meer dan veertien dagen wordt opgeslagen, op een aaneengesloten bodemvoorziening opgeslagen.*
- 2. Als de opslag van groenafval op een locatie niet meer dan zes maanden duurt en tegen inregenen is beschermd, is een absorberende laag die voorkomt dat vloeistoffen in de bodem treden voldoende.*

Wanneer afval korter dan zes maanden wordt opgeslagen, mag dit afgedekt op een absorberende laag gebeuren. Dit is voor het protocol niet werkzaam omdat het natmaken essentieel is om de groei en verspreiding van de schimmel tegen te gaan. Het ligt daarom voor de hand om voor de eerste optie te kiezen voor het nathouden van de afvalhopen.

Voordeel van de aaneengesloten bodemvoorziening met wateropvang is, dat het water dan gerecirculeerd kan worden en neerslag wordt opgevangen, wat weer gebruikt kan worden voor het natmaken. Dit past in de visies betreffende kringlooplandbouw en teelt met nagenoeg geen emissie.

c) Optimaal systeem

Alle respondenten zien een systeem met een aaneengesloten bodemvoorziening met dicht gekitte naden en een opvangreservoir voor het water (en percolaat) als het ideale systeem. Dit omdat het

- De emissie van nutriënten en gewasbeschermingsmiddelen voorkomt
- Het water opvangt waardoor het hergebruikt kan worden
- Het water bespaart doordat het ook neerslag opvangt
- Het past in de visies met betrekking tot kringlooplandbouw en beperking van emissies
- Het aansluit bij komende wetgeving met betrekking tot opslag van organisch materiaal.

Een kanttekening die hierbij gemaakt moet worden is, dat volgens de huidige regelgeving het afval, dat langere tijd bewaard wordt, afgedekt moet worden tijdens de opslag. Dit is volgens de uitkomsten van het eerdere onderzoek niet praktisch en niet effectief tegen de schimmelgroei. Afdekken van de hoop stimuleerde zelfs de groei. De regelgeving met betrekking tot het verplicht afdekken botst dus met de effectieve en uitvoerbare handelswijze die uit dit en het vorige onderzoek volgt.

Qua terminologie dient nog te worden afgestemd wat men verstaat onder een composthoop en wat een afvalhoop of wachthoop is. Verschillende medewerkers van omgevingsdiensten gaven aan dat hopen waarin microbiële activiteit aanwezig is, al beschouwd worden als composthoop. In de beleving van telers is dat niet het geval. Ook voor wat betreft de groei van *A. fumigatus* en omzettingsprocessen is hier duidelijk een verschil tussen.

2.3 Interview met een composteringsexpert over de mogelijkheid van het gebruiken van het natte bollenafval voor compostering.

Met een ex-medewerker van de Wageningen Universiteit is gesproken over de mogelijkheid om het materiaal dat nat gemaakt is, weer te gebruiken voor compostering. Eerder hadden professionele

composteerders bevestigd dat dit mogelijk is. De projectgroep wilde echter meer zekerheid hierover. Uit het gesprek kwam naar voren dat het belangrijkste is dat de composthoop structuur heeft waardoor er lucht door kan stromen. Hiervoor moeten structuur gevende ingrediënten aan het materiaal voor de composthoop worden toegevoegd. Dit kan in de vorm van takken, stro, houtsnippers of bermafval. Met deze structuur gevende ingrediënten wordt verzekerd dat er een aeroob proces van compostering plaatsvindt. Hij verwachtte dat de meeste telers die zelf composteren hier wel van op de hoogte zijn en dit veelal al doen. Na inzet van de compostering zal de hoop opdrogen en überhaupt al gemiddeld droger zijn door menging met andere materialen zoals stro. De bacteriële activiteit zal daardoor toenemen, de temperatuur zal stijgen en het vochtgehalte zal dalen.

3. Synthese van resultaten en conclusies met betrekking tot het protocol

Op basis van bovenstaande bevindingen trekken wij de volgende conclusies:

- In alle bewaarhoppen is *A. fumigatus* aangetroffen in aantallen tussen 10^5 tot 10^7 CFU/g. Deze aantallen komen overeen met verwachtingen op basis van eerder onderzoek met bollenmateriaal.
- Zoals aangetoond in eerdere proeven met leliemateriaal zorgt nathouden van tulpenmateriaal ervoor dat er minder *A. fumigatus* groeit dan in materiaal dat niet nat gemaakt is. Deze behandeling vermindert de groei van *A. fumigatus* tot ongeveer 40% ten opzichte van droog tulpenmateriaal. In leliemateriaal vonden we lagere aantallen *A. fumigatus* tijdens het bewaren in het winterseizoen waar er meer regen valt en het materiaal dus ook al natter is.
- De temperatuurmetingen laten zien dat de temperatuur in de hoppen variabel was. In de droge hoppen blijft de temperatuur langer op een hoger niveau dan in de natgemaakte hoppen. Of dit ligt aan de microbiële activiteit die in de natte hoppen wordt geremd of door het koelend effect van water zelf, is niet duidelijk.
- De fractie van *A. fumigatus*- sporen die resistent is tegen azolen is hoog, gemiddeld ongeveer 84%, overeenkomend met eerder onderzoek. Aangezien al bij de eerste tijdpunten hoge fracties resistentie worden gevonden is het aannemelijk dat de resistentie al in het milieu aanwezig en dat de resistentie niet in de afvalhoop zelf ontstaat. De resistente stammen groeien dan selectief uit in de afvalhoop wat leidt tot een hoog percentage resistentie.
- Tenzij opslaghoppen worden verstoord, detecteren we *A. fumigatus* slechts in lage aantallen in de lucht rond opslaghoppen, ook als in deze bewaarhoppen hoge aantallen *A. fumigatus* aanwezig zijn. Het is aannemelijk dat deze aantallen de achtergrond hoeveelheden zijn van de sporen die in de lucht zitten. Als de bewaarhoppen worden omgezet, vinden we wel grotere hoeveelheden *A. fumigatus* in de lucht. Bovendien treffen we in onze metingen minder *A. fumigatus* aan in de lucht als materiaal uit de natte hoppen worden omgezet dan als droog materiaal wordt omgezet. Dit wijst op een effect van natmaken op de verspreiding. Dit is een bevestiging van het eerdere onderzoek met leliemateriaal.
- Als we het effect van het natmaken op de groei en de daaropvolgende verspreiding in de lucht combineren dan is de reductie met tulpenmateriaal minder dan met het leliemateriaal, maar wel in dezelfde orde grootte. Dit onderzoek bevestigt met tulpenmateriaal dat de hoeveelheden schimmels al na één week hoog kunnen zijn en niet significant veranderen gedurende opslag over 6 weken. Eerder onderzoek toonde aan dat de aantallen ook over 12 weken niet meer significant veranderden. Luchtmetingen laten zien dat als hoppen onberoerd zijn, lage aantallen *A. fumigatus* in de lucht worden gevonden.

Nat maken heeft twee effecten die elkaar versterken. Ten eerste is de uitgroei van schimmels in de hoppen verminderd, ten tweede verspreiden aanwezige schimmels zich minder uit nat materiaal dan uit droog materiaal. Dat is met tulpenmateriaal in dit onderzoek bevestigd. Als natte bewaarhoppen waar nog steeds aanzienlijke hoeveelheden *A. fumigatus* in zitten worden omgezet, kunnen we

minder verspreiding meten in de lucht. Als drogere bewaarhopen worden omgezet, meten we meer verspreiding in de lucht.

Dat de gemeten reducties in tulpenmateriaal nu iets lager zijn komt mogelijk doordat deze zomer de groeiomstandigheden voor de schimmel optimaal waren met af en toe een bui en verder relatief hoge temperaturen. Dat er zelfs bij deze optimale omstandigheden voor *A. fumigatus* groei en verspreiding een reductie met bijna een factor 100 wordt gevonden interpreteren de onderzoekers als hoopgevend en als een duidelijk effect van het natmaken van de afvalhopen, waarmee een substantiële reductie van verspreiding van *A. fumigatus* wordt bewerkstelligd.

4. Samenvatting en advies

De gevonden aantallen sporen in de hopen varieerden van 1×10^4 tot 1×10^7 . Dit komt overeen met eerdere bevindingen. Er werden ook weer hoge percentages resistentie tegen azolen in deze sporen gevonden. 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 nat maken van de hopen heeft een remmend effect op de groei van *A. fumigatus*. Dit effect werd nu ook onder ideale groeiomstandigheden met goed materiaal voor de schimmel gevonden. Proeven met luchtmonsters bevestigen, 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 komen er significant minder sporen vrij. Het eenmalig natmaken van een hoop vlak voor het omzetten heeft geen effect op de verspreiding van de sporen.

Het is goed om te realiseren dat de gevonden waardes van de vermindering afhangen van onder andere de experimentele opzet, de omstandigheden in het veld en de manier van bemonsteren. Deze verschillen in dit onderzoek met het vorige onderzoek. Daarom is het mogelijk dat de exacte factoren van reductie van de groei en/of verspreiding van *A. fumigatus* tussen de proeven verschillen. Wel is het duidelijk dat de groei en verspreiding van *A. fumigatus* significant door het natmaken van de hopen worden gereduceerd in beide onderzoeken. Tezamen vinden de onderzoekers daarom dat deze resultaten laten zien dat het regelmatig natmaken van bewaarhopen een goede manier is om de uitgroei en de verspreiding van *A. fumigatus* substantieel te verminderen.

Het meten van de vochtigheid met een apparaat of door indroging van materiaal uit de afvalhopen lijken beiden niet betrouwbaar. De grote heterogeniteit van het materiaal en de verdeling van vocht in de hopen is hiervoor waarschijnlijk verantwoordelijk. Een visuele inspectie in combinatie met het toetsen of het materiaal aan elkaar plakt als het wordt samengeknepen kan mogelijk wel als een controle voor het natmaken dienen.

Navraag bij een ex-composteringexpert van Wageningen Universiteit bevestigt dat het natte materiaal gebruikt kan worden voor verdere compostering. Dit hadden enkele telers en een professionele composteerder al eerder aangegeven. Volgens de expert is het vooral van belang dat er voldoende structuur gevend materiaal in de (natte) hoop aanwezig is, zodat er lucht doorheen kan stromen. Telers en een composteerder gaven eerder al aan dat het materiaal sowieso gemengd moet worden met andere materialen (bv stro of maaisel) om de goede samenstelling te krijgen voor het composteringsproces. De toevoeging van water lijkt dus geen probleem voor de compostering.

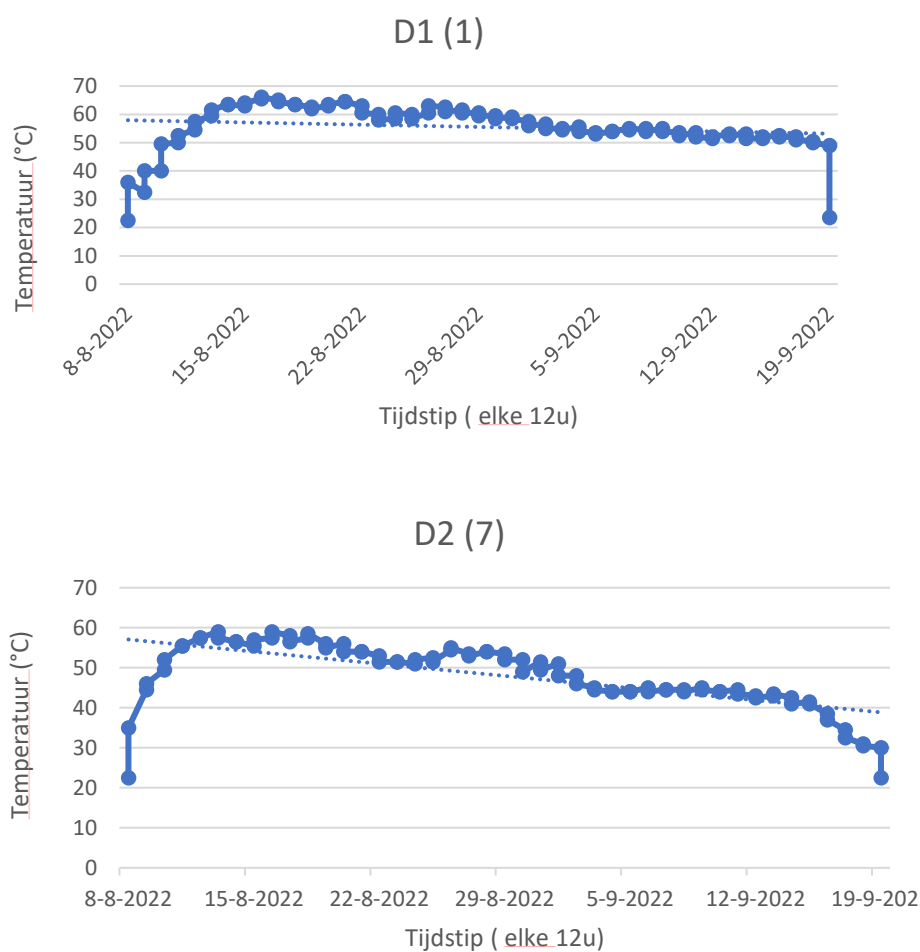
Interviews met leden van Waterschappen en omgevingsdiensten wijzen in de richting dat het beter is om een aaneengesloten bodemvoorziening te hebben waarop het afval wordt opgeslagen en

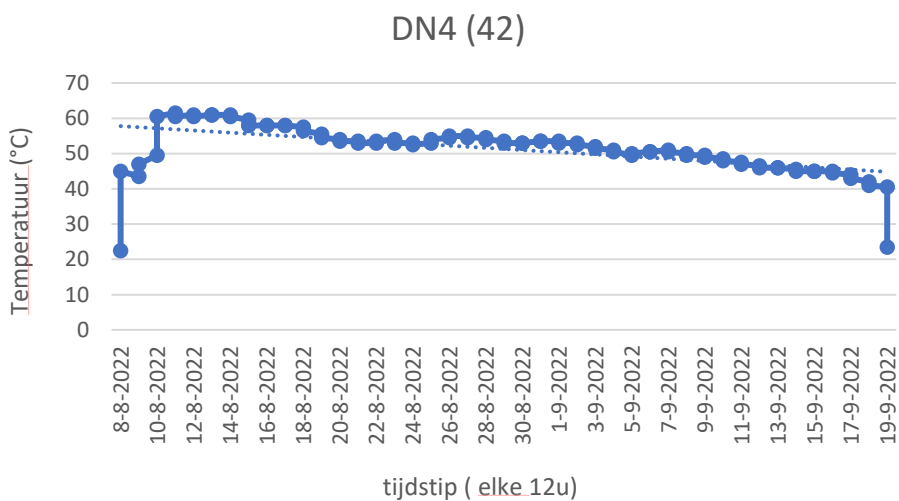
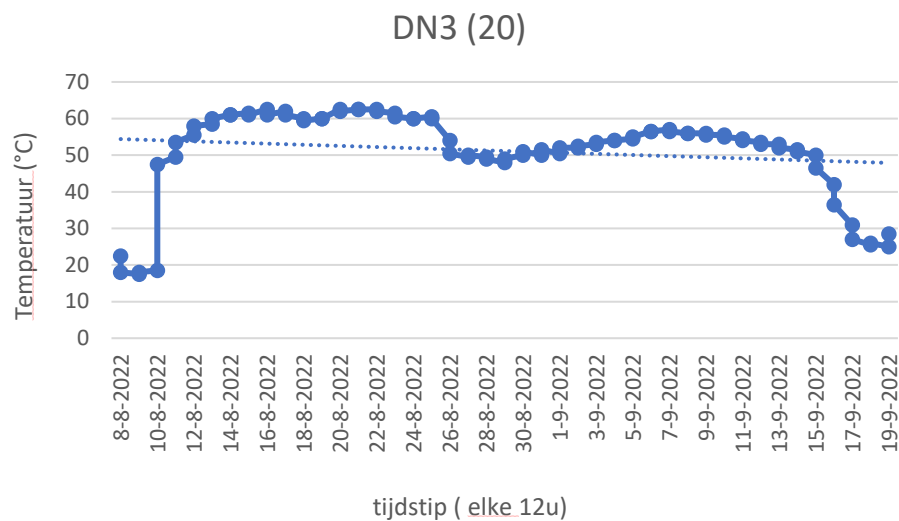
waarvan het percolaat (incl. eventuele neerslag) wordt opgevangen. Voor opslag van groenafval gedurende meer dan zes maanden wordt dit volgend jaar verplicht in de omgevingswet. Voor korter durende opslag wordt in het besluit activiteiten leefomgeving (BAL) een opnemende onderlaag gevraagd, maar dan moet het afval ook afgedekt worden. Dit laatste is niet in lijn met de gevonden oplossingsrichting om de groei en verspreiding van de schimmel te remmen.

Bijlage 1 Het temperatuurverloop in de verschillende hopen

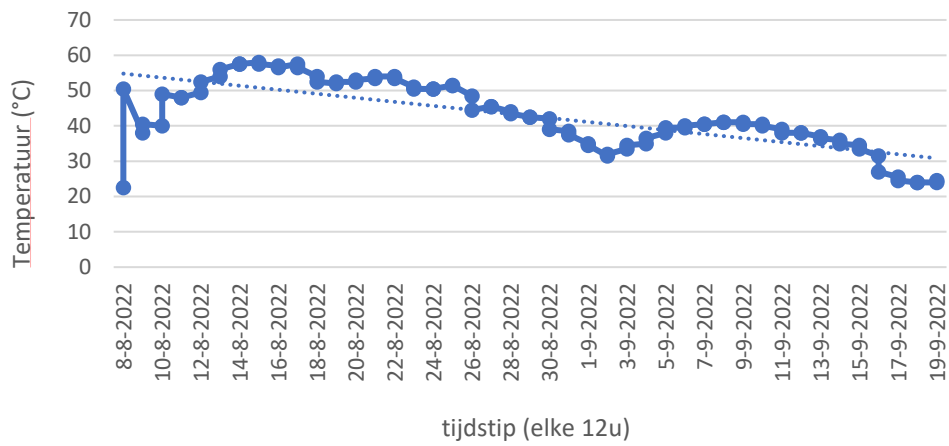
In de bewaarhopen zijn temperatuursensoren geplaatst op een diepte van ongeveer 30 centimeter die elke 12 uur de temperatuur gemeten hebben in de hoop. De grafieken hieronder laten het temperatuurverloop zien gedurende de 7 weken bewaarperiode. Aan het begin en eind van de meetperiode zit de sensor niet in de hoop en geeft deze de temperatuur van de omgeving aan.

Te zien is dat droge hopen (D1, D2, DN3, DN4) een hogere temperatuur bereiken gedurende een langere periode dan natte hopen (N5, N6, HN7, HN8). Dit suggereert dat er in droge hopen meer microbiële activiteit (van bacteriën en schimmels waaronder *A. fumigatus*) plaatsvindt dan in natte hopen. Deze bevinding is in lijn met de gevonden hogere aantallen schimmelsporen in droge hopen vergeleken met natte hopen.

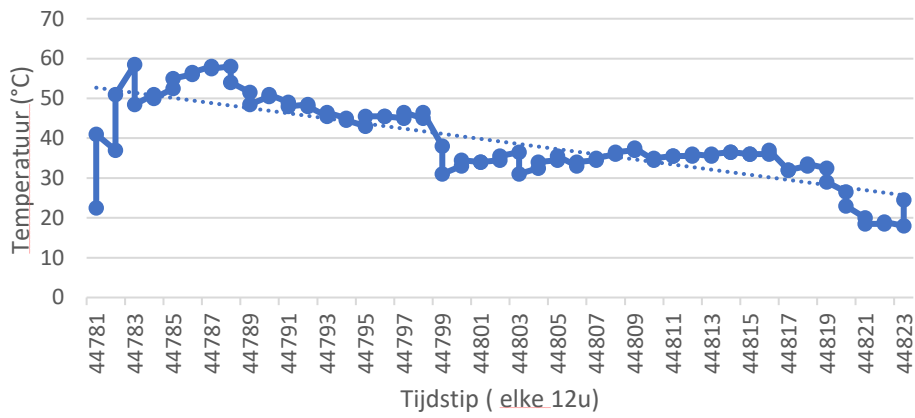


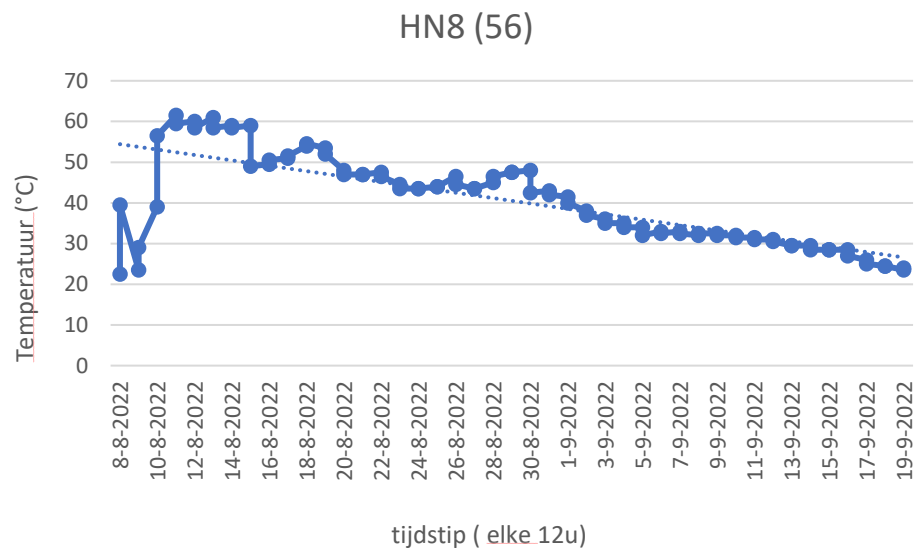
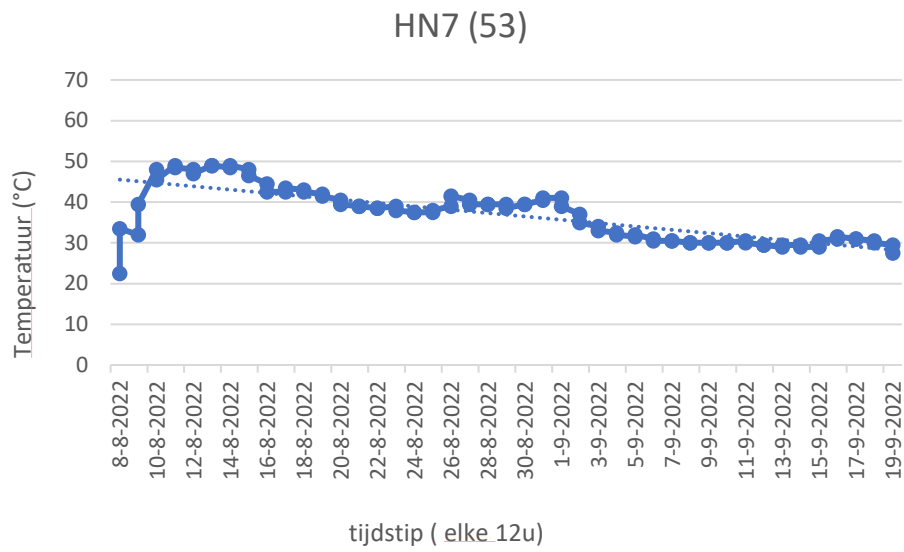


N5 (49)



N6 (51)





Bijlage 2: statistische analyse van de vermindering in verspreiding van schimmels naar de lucht.

We hebben gevonden dat droge hopen een hogere verspreiding van schimmelsporen naar de lucht veroorzaken dan natte hopen. Deze hogere verspreiding is een combinatie van een hogere dichtheid van schimmels in het plantenmateriaal met een grotere verspreiding van sporen naar de lucht tijdens omzetten. Deze twee effecten hebben we gecombineerd door vermenigvuldiging en vervolgens een statistische toets gedaan om te zien of de grotere verspreiding vanuit droog materiaal ook statistisch significant is. De statistische toets staat hieronder en laat zien dat de grotere verspreiding uit droge hopen ook statistisch significant is ($P < 0,05$).

Statistische toetsen laten zien dat gevonden verschillen in aantallen sporen in bewaarhopen door de tijd heen en op het eindpunt niet systematisch van elkaar verschillen per soort experimentele behandeling. Statistische methoden die we hebben gebruikt zijn onder andere lineaire regressie en t-toetsen. Bollenmateriaal is zeer heterogeen en net als bij voorgaande onderzoeken vinden we als gevolg van deze heterogeniteit dat er veel spreiding is tussen de verschillende biologische en technische replica's. Dit leidt tot relatief beperkte statistische resolutie en verklaart waarom een verschil uitgerekend als gecombineerd effect van uitgroei en verspreiding wel statistisch significant is, maar de afzonderlijke effecten niet.

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>Variabele 1 (droog)</i>	<i>Variabele 2 (nat)</i>
Gemiddelde	501270,8333	102216,6667
Variantie	3,86988E+11	23072643950
Gewogen variantie	2,0503E+11	
Verschil onder nul hypothese	0	
Vrijheidsgraden	62	
t Statistiek	3,525192992	
P-waarde ($T \leq t$) tweezijdig	0,0008	