

Naar een milieuvriendelijke en weerbare teelt



Eindrapportage

Met steun van Interpolis

Opgesteld door:

Drs. Olga Patijn, business developer
Peter Oei, voorzitter Stichting ECO Consult

Amsterdam, 26 juli 201

Samenvatting

Stichting ECO Consult heeft sinds 2012 gewerkt aan de selectie van micro organismen, waarmee de ziektedruk in de tuinbouw is te verlagen. Hagelunie heeft werkzaamheden van de stichting in 2016 en 2017 gefinancierd. Deze eindrapportage legt verantwoording af over de uitgevoerde activiteiten en geeft een vooruitblik over het vervolg.

In fase 3 zijn veldproeven bij verschillende bedrijven in de VS, Nederland en Zuid-Afrika uitgevoerd. Kort samengevat lijkt de mix van bacteriën wel succesvol te zijn bij de bestrijding van bacterievlekken en Trichoderma (Groene schimmel) in de fase van compostdoorgroei, maar niet voor de Droge mol. De resultaten van de experimenten zijn niet altijd eenduidig; het meten van effect in bedrijven waar een groot aantal verschillende factoren tegelijk wijzigen, is complex. Op praktijkbedrijven is het logischerwijs niet mogelijk om kunstmatige besmettingen uit te voeren. Voor de natte mol (*Mycogone perniciosa*) ontvingen we eerst meldingen van positieve effecten uit Zuid-Afrika, in een latere fase waren de kwekers van Denny's mushroom minder enthousiast over de werkzaamheid. De 20 pilotproeven met McSubstradd in de Verenigde Staten (additief tegen Trichoderma bij soja supplement) waren deels succesvol, een van de kwekers zou het middel graag direct gaan gebruiken, bij 1 van de 20 proeven is een beperkt negatief effect waargenomen.

Fase 4, het opschalen van de productiemethodiek om betaalbare biostimulanten te kunnen produceren, is succesvol door E-nema afgerond. In vloeibare vorm komt de prijs op 22,50 Euro/kg referentiewaarde uit, in poedervorm op 25,- Euro (deze laatste waarde was de gewenste kostprijs).

In fase 5 is de juridische status uitgewerkt, DNA profielen opgesteld en keuzes gemaakt t.a.v. labelling en claims van de werkzaamheid. Als biostimulant kunnen we wel claimen dat de bacteriën bijdragen aan wittere champignons en verbeterde gewasgezondheid, maar het is niet toegestaan om een claim tegen een bepaalde ziekte te doen. Er is een nieuwe visie met drie mogelijke producten uitgewerkt, die integraal in een van de bijlagen is opgenomen.

Vervolg

In de zomer van 2017 gaat Sylvan, 's werelds grootste leverancier van paddenstoelenbroed, experimenten doen met het mengsel van vier soorten bacteriën in hun laboratoria in de VS. Bij positief resultaat overweegt Sylvan de bacteriën te gaan distribueren.

De Vakgroep Paddenstoelen heeft positief gereageerd op de voortgang en een beperkt ontwikkelingsbedrag in het vooruitzicht gesteld voor het ontwikkelen van de bacteriële reiniger. Naar verwachting gaat dat traject eind van 2017 lopen.

Het ontwikkelen en op de markt brengen van biostimulanten is een langdurig proces; op zich is zes jaar tussen de selectie van geschikte stammen en het op de markt brengen geen slechte score, al is het nog te vroeg om met zekerheid te kunnen stellen dat Sylvan de producten ook daadwerkelijk op de markt gaat brengen.

Inleiding

De chemische gewasbescherming voor paddenstoelen is sterk aan banden gelegd en ziektes worden resistenter tegen de bestaande middelen. Daarom heeft de begeleidingscommissie van de Vakgroep Paddenstoelen van het Productschap Tuinbouw onderzoek gefinancierd, gericht op het versterken van de weerbaarheid van de teelt. Stichting Eco Consult is een non-profit onderzoeksbureau dat milieuvriendelijke innovaties in de paddenstoelenteelt ontwikkelt. Voor dit onderzoek is samengewerkt met de Duitse paddenstoelen onderzoeksinstituten Pilzforum uit Hackenheim, E-Nema uit Schwentinental, McSubstradd en Denny's Mushrooms in Zuid-Afrika

Veldproeven (Fase 3)

Praktijkproeven werden gedaan bij bedrijven die regelmatig kampten met *Verticillium*, *Trichoderma aggressivum*, *Dactylium*, *P. tolaasi* en *P. gingeri* uitbraken. De testen zijn onder meer uitgevoerd bij Franzmann Champignonculturen, drie kwekerijen van Denny's Mushrooms in Zuid Afrika, en 20 bedrijven via McSubstradd in de Verenigde Staten.

Het doel van de experimenten was om de minimale dosering vast te stellen en effectiviteit en continuïteit van de bacteriën te bepalen op grote schaal. Bij bedrijven waar één van deze ziektes een probleem is, werd een nieuw gevulde cel met twee verschillende doseringen getest worden en daarnaast een controle cel zodat er een duidelijke vergelijking met de onbehandelde bedden mogelijk is. De aantastingen met de ziektes werden op beide proefvlakken geteld.

Resultaten veld proeven:

Condition	Disease tested	Bacillus subtilis	Pseudomonas fluorescens
Compost Field trial France (N=1)	<i>Trichoderma</i>	90% reduction of infection	n.v.t.
Compost field trial America (N=10)	<i>Trichoderma</i>	Deels positief resultaat, deels onbestemd	n.v.t.
Casing soil (4kg small test) (N=4)	<i>Verticillium</i>	30% reduction of infection	40% reduction of infection
Casing soil Field trial (180 m2) (N*=2)	<i>P. tolaasii</i>	80-90% reduction of infection	80% reduction of infection
Casing soil Field trial (180 m2) (N*=2)	<i>Mycogone perniciosa</i>	Initial reduction of infection	Not applied

Conclusie resultaten fase 3

Er zijn resultaten geboekt tegen *Trichoderma* in de compost en Bacterievlekken (*P. tolaasii*) op de dekaarde. De dekaarde proeven gaven bij Droge mol infecties, ondanks dosis verhoging, geen verschil in infectie graad met de controle cel bij de 180m² in tegenstelling tot de kleine 4kg krat experimenten. Een verklaring kan zijn, dat *Pseudomonas* een sterker onderdrukkend effect heeft op *Verticillium* dan de *Bacillus*. De houdbaarheid van *Bacillus* is langer en stabielere vanwege de sporevorming, vandaar dat gekozen is om in eerste instantie met 4 *Bacillus* stammen de veldproeven uit te voeren.

Een andere verklaring kan zijn dat we over gestapt waren naar een poedermix op basis van pure *Bacillus* sporen; daarin is geen metaboliet rijke fermentatie vloeistof meer aanwezig. In de nieuwste fermentatie methodiek van E-nema is deze vloeistof weer geïncubeerd.

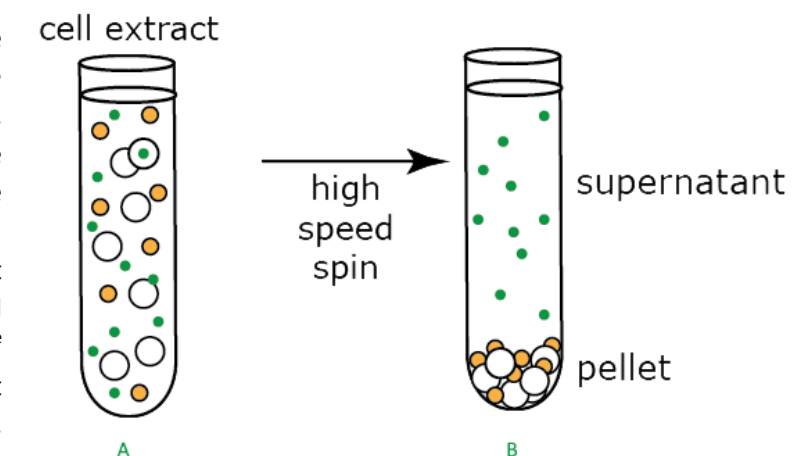
Fase 4 Kostprijs omlaag brengen met een factor 3

Er zijn duidelijke geluiden uit de sector gekomen dat er veel animo is voor een milieuvriendelijke oplossing tegen ziektes. Helaas zijn momenteel de bacteriële biostimulanten en andere groene oplossingen nog te kostbaar voor grootschalige preventieve toepassing. Stichting Eco Consult heeft als missie om de landbouw groener en efficiënter te maken. Een rondvraag bij distributeurs en telers waarbij ze zelf konden aangeven wat het product zou mogen kosten, ervan uit gaande dat er minder chemische bestrijding nodig is, leverde de volgende resultaten op: 200 euro per hectare prei en 2.5 cent per m² voor de champignonsector. Om dit te bereiken moet de kostprijs met een factor 3 omlaag worden gebracht van 75 euro naar 25 euro. Dit vereist optimalisering van de fermentatietechniek.

Optimalisatie fermentatie en effectiviteit

Om houdbaarheid te vergroten en kosten te besparen is er in de eerste fermentatie pilot gekozen om de sporen in poedervorm te produceren. In dit proces wordt de fermentatie vloeistof gecentrifugeerd tot er op de bodem een "pellet" van neergeslagen sporen komt. Deze pellet wordt gedroogd en opgemengd met zetmeel tot de juiste concentratie van 1×10^9 cfu/ml (colony forming units) wordt bereikt (situatie B in afbeelding 1). Nadat de veldtesten op het gebied van de dekaarde niet het gewenste resultaat gaven, was er de zorg dat de metabolieten in de fermentatie vloeistof een cruciale rol speelde bij

de ziekte onderdrukkende werking. Daarnaast was de kostprijs van 75 euro de kilo te hoog voor onze doelgroep. Daarom is er overgestapt naar een andere leverancier (E-Nema) en fermentatie techniek, waarbij de metabolieten wel behouden blijven. Dit sluit ook aan op de registratie van Serenade als gewasbeschermingsmiddel in Nederland: feitelijk is de fermentatievloeistof daarbij goedgekeurd met een beperkt aantal sporen.



Figuur 1 De fermentatie vloeistof bevat sporen en metabolieten. Na centrifuge vormen de vaste delen een pellet op de bodem (bacteriën en sporen) terwijl de metabolieten in de vloeistof erboven blijven (het Supernatant)

E-Nema is een fermentatie specialist op het gebied van bacteriën, schimmels en aaltjes die worden toegepast in de horticultuur. Samen met de specialisten E-nema is er een nieuwe fermentatie methode ontwikkeld. Hierbij wordt het fermentatieproces stil gelegd bij het bereiken van de juiste concentratie en de bacteriën in sporen vorm gedwongen terwijl de metabolieten behouden blijven. (Situatie A bij afbeelding 1) Dit gaat uit van een concentratie van 5×10^9 cfu/ml. Daarna worden er stabiliserende middelen aan de vloeistof toegevoegd die 12 maanden houdbaarheid garanderen. De extra kosten van een "nat" product vervoeren worden gecompenseerd door een concentratieverhoging van een factor 5. Daarnaast wordt er energie, tijd en kosten bespaard omdat

de bacterie mix geen droog proces hoeft te doorlopen. Dit maakt het mogelijk om op de markt prijs van 2.5 cent per m² of 200 euro per ha te komen. Met het behoud van de metabolieten verwachten wij ook op de komende niveau goede resultaten te behalen. Daarbij geeft de samenwerking met E-Nema veel mogelijkheden en expertise voor het ontwikkelen van andere bacterie producten voor de tuinbouw.

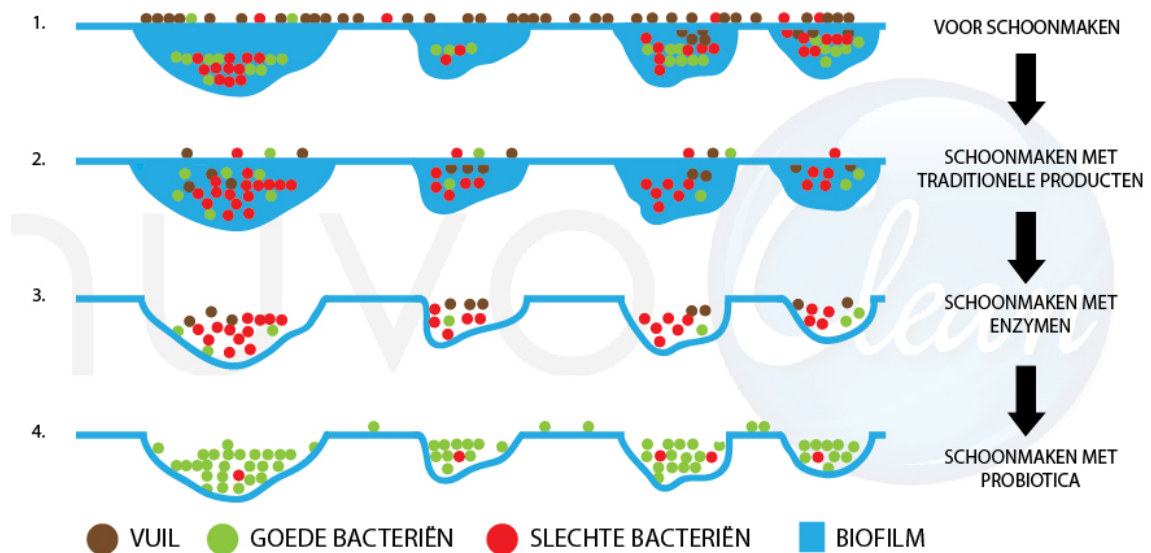
E-nema heeft in 25 liter fermentatoren vier *Bacillus* stammen getest op de mogelijkheden voor grootschalige productie. Tevens heeft E-nema samen met ECO Consult een methodiek ontwikkeld om een kosteneffectieve toepassing voor de toevoeging aan bijvoedmiddel voor compost fase 2 (anti- *Trichoderma* werking) te realiseren. Daarbij gaat het om het sproeien van een supernatant inclusief metabolieten over de gestabiliseerde soja-additieven, zoals McSubstradd die wereldwijd distribueert. Uit de proeven bleek dat drie van de vier stammen goed reproduceerbaar waren. Aandachtspunt is nog wel de vorming van klonten sporen, waardoor de menging minder goed verloopt. Een van de vier stammen is lastig reproduceerbaar. De gewenste kostendaling blijkt in de praktijk realiseerbaar: in vloeibare vorm komt het product uit op 22,5 Euro en in poedervorm op 25,- Euro bij reproductie op schaal van 750 kilo per stam.

Conclusie

Het doel van fase 4 blijkt in de praktijk haalbaar: het gewenste kostenniveau is voor drie van de vier geselecteerde *Bacillus* stammen te bereiken.

Nieuw product: Probiotisch schoonmaakmiddel

In tegenstelling tot chemische schoonmaakmiddelen en pesticiden kunnen bacteriele schoonmaakmiddelen, milieuvriendelijk en hypoallergeen zijn waardoor ze veilig zijn voor mens en geen residuen geven in het oppervlaktewater. Met de overstap naar vloeibaar is het ook mogelijk om naast een biostimulant ook een schoonmaakmiddel te produceren op basis van bacteriën en een ontvetter. Deze kan gebruik worden voor de vloeren, tools en personeelsruimtes. Ziekteverwekkers hechten zich graag aan de voedselrijke vloeren, machines en gereedschappen en ziektes kunnen zo worden geïntroduceerd in schone ruimtes. Door een beschermende laag bacteriën te gebruiken, verlaagt de teler de besmettingskansen. Hierbij profiteert de teler van het zogenaamde verdringingsproces. Naast dat onze bacteriën deze ziektes aanvallen, verdringen ze ook de ziektes door concurrentie op het gebied van ruimte en voeding. Door het behandelen van voedingsrijke risicogebieden zoals vloeren met een probiotisch schoonmaakmiddel kunnen deze voorzien worden van een beschermende laag “goede bacteriën” terwijl het personeel en milieu er geen hinder van ondervindt. In tegenstelling tot traditionele schoonmaakmiddelen blijven de bacteriën minimaal 3 dagen na het aanbrengen nog actief in de afbraak van vuil en pathogenen.



Figuur 2 Schematische illustratie van de afbraak van biofilm bron: Nuvoclean

Fase 5 EU Wetgeving

Momenteel is het niet raadzaam om ziekte-dodende werking te claimen omdat dit de middelen dan onder de gewasbeschermingswet brengt. Omdat de wetgeving voor biostimulanten binnenkort zal veranderen, onderzochten we ook het juridisch kader en EU beleid. In 2018 zal de EU waarschijnlijk nieuwe regelgeving rond biostimulanten introduceren. Totdat de wetgeving wordt aangepast verkennen wij de optie om het in de sector te introduceren als biostimulant. Deze mag vrij worden ingezet tijdens elk moment van de teelt en heeft geen negatieve invloed op het afvalwater.

Productcategorie analyse EU

Het bestrijden van ziekten met behulp van een mix van effectieve bacteriën heeft verschillende uitdagingen voordat de *Bacillus* mix op de markt kan komen. Een belangrijke uitdaging is de claim en productcategorie. Als geclaimd wordt dat de mix een gewasbeschermers is, moet er een meerjarig pesticide registratieprotocol doorlopen worden, om de toxiciteit en veiligheid vast te stellen. Dit zou veel tijd en geld kosten en weinig waarde toevoegen gezien de aard van de mix: niet gemodificeerde bodembacteriën die veilig genoeg zijn voor mens en dier om nota bene als probiotica te worden ingezet. Omdat er steeds meer “natuurlijke” ziekte bestrijdingsopties beschikbaar komen is de EU-wetgeving aan het veranderen. Per productcategorie zijn er verschillend patenten actief en claim restricties. De huidige en nieuwe productcategorieën worden onderstaand vergeleken.

Gewasbeschermers

Er zijn verschillende microbiële gewasbeschermers op de markt. Ze hebben het omvangrijk registratie- en onderzoeksproces met dierproeven doorlopen. De producenten hebben het recht om te claimen dat deze producten ziektes remmen of doden. Als er voor deze route gekozen worden moet er een nieuwheidsonderzoek worden uitgevoerd omdat er al reeds op *Bacillus* gebaseerde gewasbeschermers voor plantenziektes op de markt zijn. Via “green deals” probeert de Nederlandse overheid de wetgeving passender te maken voor deze productcategorie.

Bodemverbeteraar

Er is momenteel nog geen aparte productcategorie voor microbiële bodemverbeteraars. Ze vallen momenteel nog in een bijlage van de mestwet voor algemene bodemverbeteraars en er zijn geen specifieke regels voor de productie of houdbaarheid van levende micro-organisme. Dit gaat binnenkort veranderen; dan kunnen antagonistische bacteriën onder 2 verschillende categorieën vallen: biostimulanten of biocontrole.

Biostimulant/Organic soil improvers

De Europese Commissie heeft aangegeven de mestwetgeving (EC) No 2003/2003 aan te passen en te verbreden. De nieuwe wet heeft als doel om alle soorten kunstmest, organische mest, kweek substraten, organische bodemverbeteraars en planten biostimulanten een juridisch kader te bieden. (Competitiveness Proofing - Fertilising Materials 2013). De *Bacillus* heeft het vermogen om de rhizosfeer (het milieu rond de wortel) te verbeteren en weerbaarder te maken tegen infecties. In de plantenteelt dit momenteel een populair en groeiend onderzoeksveld dat een deur opent naar een serie milieuvriendelijke opbrengst verbeteringen in de landbouw. Voor paddenstoelen is er nog veel onontgonnen terrein waar Stichting Eco Consult grote ontwikkelingsslagen kan maken met de antagonistische bacteriën.

Biologische controle

Een voorbeeld van biologische controle is het inzetten van sluipwespen in een kas om plagen te bestrijden. Momenteel vallen dierlijke natuurlijke vijanden van plagen en ziektes er wel onder maar microbiële natuurlijke vijanden nog niet. De EU streeft naar verantwoord pesticide gebruik waarbij het doel is de afhankelijkheid van chemische bestrijdingsmiddelen te verminderen. Voordat pesticiden worden ingezet moet er eerst gekeken worden naar biologische en fysieke middelen. (Directive 2009/128/EC). Het ministerie van EZ ondersteunt dit door onder andere Greendeals aan te bieden die kijken naar een alternatieve vorm van de pesticidewetgeving, die beter aansluit bij de eigenschappen van het product.

Advies Helma Verberkt (Beleidsspecialist |
Programmamanager Plantgezondheid LTO Glaskracht):

‘ Voor biostimulanten is momenteel nog geen centraal beleid. Het gekozen micro-organisme, de *Bacillus subtilis*, wordt al reeds op grote schaal ingezet in de land- en glastuinbouw. Het ctgb inschakelen is kostbaar en zal waarschijnlijk tot dezelfde conclusie komen. Als het *Bacillus* product als een biostimulant zonder claim op de markt wordt gebracht door een derde partij voorzie ik geen directe wettelijke complicaties. ‘

Juridisch kader t.o.v. micro-organismen per categorie

‘ De chemische gewasbescherming wordt sterk aan banden gelegd. In 2018 geldt een verplichte zuivering voor restwaterstromen om de emissie naar sloten en het riool te verminderen. Het aantal normoverschrijdingen in het oppervlaktewater moet dan met 50% zijn gedaald. Ondernemers bereiden zich nu massaal voor op deze nieuwe wetgeving. Daarom is de land- en tuinbouwsector sterk aan het inzetten op alternatieve vormen van bestrijding die geen residu veroorzaken. Biostimulanten en biologische gewasbescherming zijn een van de oplossingen waar momenteel op ingezet wordt.’ (bron: website LTO glaskracht afdeling plant gezondheid)

EBIC (European Biostimulant Industrial Council) POSITION PAPER

Acknowledging the Multiple Identities of Component Substances and Microorganisms Is Critical to Innovation in Biostimulants. In deze paper wordt er voorzigt gediscussieerd over de duale functie van bodemverbeteraar en gewasbescherming. Hieronder staat de tabel die de EBIC als conclusie aanhoudt. Ons product zou in de bovenste categorie vallen(Final version 8 April 2016)

PRODUCT • Physico-chemical properties (i.e. formulation, concentration, etc.) • Mode of application (including placement, timing, frequency and rate/dosage, etc.) • Main effects of the formulation	Examples	Data requirements	Permitted marketing claims
	Only biostimulant effects are claimed for the final product	Conformity assessment related to both safety and quality aspects of biostimulants and the other fertilising material(s) according to the provision of the future regulation on fertilising materials.	Biostimulant effects only
	Claims for the final product include biostimulants effects and effects as another sort of fertilizer material (e.g. inorganic fertiliser)	Conformity assessment related to both safety and quality aspects of biostimulants and the other fertilising material(s) according to the provision of the future regulation on fertilising materials.	- Biostimulant effects - Other fertilising material effects (in this case, supplying specific nutrients)
	Both biostimulant and PPP effects are claimed as main effects of the final product (a dual-function product)	- Registration and authorisation of the PPP product under Reg (EC) 1107/2009 - Conformity assessment related to biostimulant effects according to the provision of the future regulation on fertilising materials.	- Biostimulant effects - PPP effects
	Only PPP effects are claimed for a final product that is known to also have biostimulants effects	Registration and authorisation of the PPP product under Reg (EC) 1107/2009	- PPP effects - Should the producer ever want to claim biostimulant effects, the product would also need to undergo conformity assessment related to biostimulant effects according to the provision of the future regulation on fertilising materials.

Gewasbeschermings- en meststoffenwetten en wetten met speciale relatie tot micro-organismen:

Biostimulanten worden voor het eerst genoemd in de **meststoffen wetgeving 2003/2003 bijlage Aa** en er ligt een advies om ze mee toenemen en uit te bereiden naar de nieuwe meststoffen wet. Op **17 maart 2016** is er een vanuit de EU **proposal** gedaan voor de **nieuwe meststoffenwet**. Hierbij wordt de volgende definitie voor biostimulant aangehouden:

"plant biostimulant*" means a product stimulating plant nutrition processes independently of the product's nutrient content with the sole aim of improving one or more of the following characteristics of the plant:

- nutrient use efficiency;
- tolerance to abiotic stress;
- crop quality traits."

Certain substances, mixtures and micro-organisms, commonly referred to as plant biostimulants, are not as such nutrients, but nevertheless stimulate plants' nutrition processes. Where such products aim solely at improving the plants' nutrient use efficiency, tolerance to abiotic stress, or crop quality traits, they are by nature more similar to fertilizing products than to most categories of plant protection products. Such products should therefore be eligible for CE marking under this Regulation and excluded from the scope of Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council²¹. Regulation (EC) No 1107/2009 should therefore be amended accordingly.

Dit houdt in dat biostimulanten nog steeds onder de meststoffen wetgeving blijven vallen en binnen een vaste productcategorie verhandeld kunnen worden.

De Verordening 2009/128 Geïntegreerde gewasbescherming maakt geen specifieke referentie van biostimulanten of bodemverbeteraars maar meldt wel specifiek dat in gebied waar kwetsbare groepen, komen er zo veel mogelijk biologische bestrijding moet worden gebruikt.

Biocide verordening 528/2012 noemt geen biostimulanten of bodemverbeteraars maar wel microbiële gewasbescherming. Deze moeten voldoen aan een serie eisen en aan Richtlijn **2000/54/EG**

Richtlijn 2000/54/EG van het Europees Parlement en de Raad van 18 september 2000 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk. **Alle bacillus soorten op de QPS lijst (Qualified presumption of safety van de EU) vallen in een risicogroep te laag om aan in aanmerking te komen voor deze wet.**

Advies 2014 van de Technische bodem commissie die de regering adviseert voor de nieuwe meststoffen wet.*

De 'Verordening (EG) 2003/2003 van het Europees parlement en de raad van 13 oktober 2003 inzake meststoffen' regelt het vrij verhandelen van anorganische meststoffen (kunstmest) in de EU. De EC wil het bereik van de verordening uitbreiden naar handel van alle soorten meststoffen en producten die niet van dierlijke oorsprong zijn en mogelijk ook naar afvalstoffen die als (grondstof voor) meststoffen kunnen worden gebruikt. In de studie die men heeft uitgevoerd ter onderbouwing van deze uitbreiding zijn de volgende producten beschouwd: meststoffen, bodemverbeteraars, groeimedia, andere specifieke producten en '**biostimulantia**'. In de discussies over de wijziging van de verordening 2003/2003 is voorgesteld om de productnormen voor contaminanten in organische

bodemverbeteraars, zoals compost, op hetzelfde niveau vast te stellen als de **EoW-criteria**. (Bron TCB A092(2014))

Samenvatting veiligheidseisen meststoffen EoW-criteria en Nederlandse criteria compost

Stof	Nederland: maximale waarde compost ¹⁷ in mg/kg droge stof	EU: concept-EoW criteria ¹⁸ in mg/kg droge stof
Minimum organische stof gehalte	Minimaal 10% op basis van droge stof gewicht	Minimaal 15% op basis van droge stof gewicht
arseen	15	geen norm
cadmium	1	1,5
chroom	50	100
kwik	0,3	1
lood	100	120
nikkel	20	50
koper	90	200
zink	290	600
organische microverontreinigingen	voor ca 30 stoffen normen ¹⁹ (uitgedrukt in mg per kg van het desbetreffende waardegevend bestanddeel, bijvoorbeeld N, P en K.)	Normen voor PCBs, PAK, PCDD/F en PFC (som van PFOA en PFOS)
pathogenen	geen norm (producteisen voor 'Keurcompost' ⁹ = gelijk aan EoW criteria)	geen <i>Salmonella</i> <i>Escherichia coli</i> : In 25 gram monster 1000 kve ²⁰ /g
Plantpathogenen: levensvatbare onkruidzaden of kiemen	geen norm (producteisen voor 'Keurcompost' ⁹ = gelijk aan EoW criteria)	2 levensvatbare zaden of kiemen per liter compost of digestaat.

Voor een uitgebreidere toelichting zie: Establishing ecological criteria for the award of the Communityeco-label to soil improvers* and growing media (notified under document number C(2001) 2597) (Text with EEA relevance) (2001/688/E)

*De term biostimulant bestaat nog maar een paar jaar, daarvoor werd microbiële bodemverbeteraar of meststof gebruikt. De erkenning en categorie toewijzing van de term biostimulant in proposals is van groot belang voor de wettelijke categorieën waar het straks onder valt.

Bijlage 1: Cell counts poederdosering

De cell counts hebben een overdosering van gemiddeld een factor twee:

B4I10 – 2.2E+09

B4I11 – 1.8 E+09

B215 – 2.1 E+09

B327 – 2.3 E+09

De cell counts zijn gemeten volgens de volgende methode:

Assay :

4.1 Procedure :

a Sample Preparation :

- Weigh 1.0 gram of sample, transfer to 250ml sterile standard volumetric flask and add approximately 150 ml of sterile sodium chloride solution (0.9%) and Sonicate for 10 minutes.
- After completion of sonication dilute up to the mark with sterile sterile sodium chloride solution. Shake well and use it for further serial dilution (Stock solution).
- Transfer 1 ml of this stock solution into 9.0 ml of sterile sterile sodium chloride solution in a sterile test tube and mix thoroughly.
- Continue serial dilution to get colonies between 20- 250 cfu in test solution.

b Plating:

- Set out sterile petri plates, five for each sample to be tested. Add 1 ml of final dilution into each petri plate and then pour 15 ml of Nutrient Agar molten medium and mix thoroughly.
- The solidified plates are incubated in an inverted position at 37°C for 24 hours.

c Counting:

- Count the no.of colonies in each petri plate and take the average number of colonies.

*Note: Perform all the dilutions in the vicinity of Uni directional Air Flow Unit

*Note: Vortex all the serial dilutions, while performing the assay.

Bijlage 2: DNA identificatie 4 stammen *Bacillus subtilis*

(B2I5) Seq Length 1139

GCACGGGTACCCGTC AAGTCGTGCAAGTTTGATCGGAAGACGGGAGCTTGCTCACTGATGTCAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT
GCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAC
CGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG
GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTAAGTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCG
GGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG

(B327) Seq Length 1213

TAAAGGATACTTGC GGGAACATAAGTGTGAAGTGACATGGCTATAACGTCGTAACAGGGTAACCGTAGAGT
TTGATATTGGTT CAGGACTCGTAACAGGGTAACCGGTACCGTTACATTGGAATTTGGGTCTAAAACCGGA
AACC GGAAACCGGTACATGGTTAATATTTAAAAGGTGGCTTCAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC
CGTTC AATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGGTAGAGATGTGGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCT
GGTCTGTAAGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC
GTTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTTAACGCATTAAAGCA
CTCCCGCCCTGGGGGAGTACGGGTCGCAAGGACTGAAACTCAAAGGAATTTGACCGGGGGGCCCCGCAC
AAAGCGGTGGGAGCCATGTGGTTTAAATTTGAAAGCAACCGCGAAAGAAACCTTACCAGGGTCTTTGACC
ATCCCTCCTGACCAATCCCTACGAGGATAGGGACGGTCCCCCTTTCGGGGGGGCAAAAGTTGACCAAGGTGG
GTTGCAATGGGGTTGGTTCGTTCCCTTCGTTGTTTCATTGAAAAATGGTTGGGGTTTAAAGTTCCGCAGC
CAACCGAAGCCGCCAACCCCCCTTGGATTGTTAATTTTGCCCAAGCATATTCTATTCTTGG

(B4I10) Seq Length 1112

GAAGTGGACCCTCACGAGTTGAAAGTTTATCCGTAAGACGGGAGCTGGCTCCGTGATGTTGTAGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATG
GTTGTTTGAACCGCATGGTTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGC
CGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG
GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCG
GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCATG

(B4I11) Seq length 1224

AGAACGGGACCTGCACGCAAGGAAATCGGACGGCAGCACGGACTTCGGTACTGGTGGCGAGTGGCGAACG
GGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCTAGTAGCGGGGGATAACTACGCGAAAGCGTAGCTAATACCGCATACG
CCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCACTATTAGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGG
TGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGACAGAGTGGGGAATTTTGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCAT
CCCCGCTGTGCGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACCTTTTGGCAGGAAAGAAACGTCATGGGTAAATACC
CCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTCGGAAGAAAGATGTGAAATCCCA
GAGCTTAACCTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTCAGAGGGAGGTGGAATTCGCGGTGA
GCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTC
ATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGC
TGTTGGGGCCTTCGGGCCTTAGTAGCGCAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
TTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAA
AAACCTTACCTACCTTGACATGTCTGGAATTCGGAAGAGATTTGGAAGTGCTCGCAAGAGAACCAGGAACACA
GGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
CATTAGTTGCTACGAAAGGGGACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGGGGGGAAGACA
ACCAAGTCCTCCCGGGCCCCATGGGGAGGGGGTTACACGCCTAACAAAGGTGGGGGAAGAAAGGTGCTC
TCA

Bijlage 3 Engelse toelichting drie type producten

Resilient compost and casing soil

Eco Consult foundations mission is to research and implement sustainable innovations in the mushroom industry. In the past years' pesticide use was discouraged by both governments and NGO's. In addition to pressure groups, it is also the modern consumer who prefers food which has no chemicals. In response to these developments Eco Consult has been working on an environmental friendly way to suppress pathogenic fungi and bacteria in the compost and casing soil by using the natural enemies of diseases since 2011. After screening more than 600 soil samples, 15 microbial strains were found that had disease suppressing qualities. These could be split into two groups: *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. Both performed well at *in vitro* level against the top 5 mushroom diseases: Green mold (*Trichoderma*), dry bubble (*Verticillium*), Bacterial blotch (brown and orange), Wet bubble (*Mycogone*) and Cobweb disease (*Dactylium/Cladobotryum dendroides*). Because the *Bacillus spp* group has the ability to form stable spores it was the first to be tested for mass production. With this *Bacillus* mix Eco Consult has envisioned the following 3 products.

1 Compost improver

By adding the *Bacillus* mix to the supplement, spawn or phase 2 compost, suppression of *Trichoderma* infections can be observed which lead to better yields. Field trails in compost have been very successful so far. A set of large compost trials to suppress *Trichoderma* at 10 different mushroom farms in America will start this summer. There is already a similar product on the US market called Jazz from Bayer. It is classified as a pesticide and is not allowed in the EU. Because our product will be classified as a biostimulant fertilizer rather than a pesticide, it will be used and shipped under the fertilizer law giving us a distinctive edge compared to Jazz. For this product we already have a large customer that will be discussed in the trade agreement paragraph on the next page.

2. Microbial cleaning agent for mushroom growing rooms

Microbial cleaning agents based on *Bacillus subtilis* have been around for more than 10 years and are mainly used to remove organic material and to prevent biofilm formation. Through this mechanism they remove the available food sources and growing space for the pathogens. Trials with disease suppression on hospitals floors have been very successful although the protection is heavily diminished once the floor is dry and the bacilli return to spore form or die. The *bacillus* mix from Eco Consult has two main advantages compared to traditional *Bacillus* based cleaning agents:

1. The mushroom growing cells walls and floors are often moist and temperature stable. They provide a suitable niche for bacilli to be active until all the food sources are gone.
2. The *Bacillus* mix of Eco Consult contains micro-organisms that have been selected from 156 different *Bacillus* samples, based on their strong fungicidal and antimicrobial properties directed specifically against mushroom pathogens.

From a production point of view, this product is relatively easy to develop, as the same spores are used as in product 1.

3. Resilient Casing soil

The casing soil in mushroom beds is plagued by a much larger range of diseases than the compost. By adding the bacterial mix preventively to the casing soil right after the pH shift from 4 to 7 or just

after filling of the cells the diseases can be kept at bay longer than in the control cells. Alternatively, it can be applied curative between flushed to suppress bacterial blotching with great success (80-90% reduction in infection in multiple farms).