



Oriënterend onderzoek naar effectiviteit en toepasbaarheid van een tweetal desinfectiemiddelen

Dr. J.J.P. Baars & Ing. A.J. Rutjens

© 2008 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Productschap Tuinbouw
Louis Pasteurlaan 6, 2719 EE Zoetermeer



PRI projectnummer: 3360629400 (PPO projectnummer: 3262029400)

PT projectnummer 12912

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	3
3. Materiaal en methode.	5
Kweek van sporen	5
Laboratoriumexperimenten	5
Sporen van <i>Agaricus bisporus</i>	5
Sporen van <i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	6
Sporen van <i>Trichoderma harzianum</i>	6
Statistische analyse van de resultaten	7
4. Resultaten	9
Effect op sporen van <i>Agaricus bisporus</i> .	9
Effect op sporen van <i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	10
Effect op sporen van <i>Trichoderma harzianum</i>	11
5. Discussie	13
6. Conclusies	15
7. Suggesties voor verder onderzoek	17
8. Literatuur	19

1. Samenvatting

Ziekten, zoals groene schimmels (*Trichoderma*-soorten) en droge mollen (*Verticillium fungicola* var. *fungicola*), veroorzaken problemen in teelt op champignonteeltbedrijven. Bij de beheersing van deze ziekten zijn preventieve maatregelen van groot belang. Er zijn immers voor beide schimmelziekten slechts beperkte curatieve methoden en middelen beschikbaar. Voor de bestrijding van *Trichoderma* is geen enkel fungicide en voor de bestrijding van droge mollen is er nog slechts een fungicide toegelaten. De toelating voor het fungicide ter bestrijding van droge mollen was nog geldig tot 01-11-2007 en heeft momenteel een "toelating van rechtswege" in het kader van het EU-beoordelingstraject. Dat houdt in dat onduidelijk is hoe lang de praktijk nog van dit ene overgebleven fungicide gebruik kan maken.

Desinfectie neemt daardoor op de champignonteeltbedrijven, maar ook bij de grondstofleveranciers en bij een gedeelte van de collecterende handel een belangrijke plaats in. Hygiëne is van zeer groot belang bij de grootschalige bereiding van grondstoffen, zoals doorgroeide compost. Bij de desinfectie van bijv. tunnelhallen wordt gebruikt gemaakt van formaldehyde.

Zo is ook schoon fust belangrijk. Er wordt slechts een gedeelte van het (meermalige) fust gestoomd of ontsmet met chloor of formaline. Vooral via het niet ontsmette (meermalige) fust kan de verspreiding van droge mollen plaatsvinden.

In het afgelopen jaar is de toelating van de desinfectiemiddelen Aldekol NL, Viro Cid, Fungo-clean en Jet 5 vervallen. Daarnaast staat het gebruik van formaldehyde en ook van chloor vanuit ARBO- en milieu aspecten in toenemende mate onder druk.

In dit project zijn twee alternatieve desinfectiemiddelen (gecodeerd als desinfectiemiddel A en desinfectiemiddel D) onder standaard laboratorium-omstandigheden getest op hun bruikbaarheid in de champignonteelt. Daartoe is gekeken of deze twee alternatieve desinfectiemiddelen effectief zijn.

Effectiviteit

Desinfectiemiddel A:

De resultaten van dit project laten zien dat sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola* in een dosering van 5 % en een inwerktijd van 20 minuten door desinfectiemiddel A worden gedood. Een 10 % dosering en een inwerktijd van 20 minuten is nodig om 100 % van de sporen van *A. bisporus* en *Trichoderma harzianum* te doden. Bij een lagere dosering van 5 % is een (langere) inwerktijd van 40 minuten nodig om sporen van *A. bisporus* en *Trichoderma harzianum* voor 100 % af te doden.

Desinfectiemiddel A doodt dus in een dosering van 10% bij een behandelingstijd van 20 minuten 100% van de sporen van champignon, *Trichoderma harzianum* en *Verticillium fungicola* var. *fungicola* af.

Desinfectiemiddel D:

Sporen van *A. bisporus* worden door desinfectiemiddel D in een 10 % dosering en een inwerktijd van 20 minuten onvoldoende afgedood. Ook in een dosering van 5 % en een inwerktijd van 40 minuten is er nog steeds onvoldoende afdoding.

Sporen van *Trichoderma harzianum* worden door een 1% dosering en inwerktijd van 20 minuten al afgedood. Voor de volledige afdoding van sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola* is een zeer lagere dosering van slechts 0,1 % bij een inwerktijd van 20 minuten nodig.

Toepassingsmogelijkheden

Er is gekeken naar de vraag of deze potentiële desinfectiemiddelen toepasbaar zijn voor bijvoorbeeld fustontsmetting, ontsmetting van tunnelhallen en lege teeltruimten resp. materialen (machines en gereedschappen). Daarnaast speelt de vraag of er ook toepassingen mogelijk zijn bij bijvoorbeeld de bestrijding van bacterievlekken, droge mollen of groene schimmels.

Omdat desinfectiemiddel A beperkt houdbaar is en er bovendien speciale bereidingsapparatuur nodig is kan het perspectief bieden voor toepassing op tunnelbedrijven en bij fustontsmetting.

Op teeltbedrijven zou de toepassing op de dekgrond na het afdekken een optie kunnen zijn. Gezien de aanschafkosten, is er een kans dat niet elk teeltbedrijf zich deze bereidingsapparatuur kan veroorloven. Een centrale

bereiding zou in dat geval een optie kunnen zijn. Gezien de beperkte houdbaarheid van het bereide product zal een goede en betrouwbare logistiek in dat geval onontbeerlijk zijn.

Desinfectiemiddel D lijkt vanwege de effectieve afdoding in lage doseringen van met name van sporen *V. fungicola* var. *fungicola* en *Trichoderma harzianum* perspectief te bieden voor toepassingen op de dekgrond na het afdekken en/of tussen de vluchten. De toepassing, dosering en neveneffecten onder praktijkcondities zullen nader onderzocht moeten worden.

Uit dit project komt naar voren dat de twee desinfectiemiddelen A en D geschikt lijken voor de verdere ontwikkeling tot een commercieel toepasbaar middel. Beide middelen passen in een chemisch middelenvrije teelt. Echter, beide desinfectiemiddelen hebben op dit moment nog geen toelating voor toepassing in de champignonenteelt. Er is enerzijds overleg nodig met de fabrikanten van deze desinfectiemiddelen om te bezien of de ontwikkeling tot toepassingen in de champignonenteelt economisch haalbaar zijn. Daarnaast is nader onderzoek noodzakelijk om te komen tot in de champignonenteelt toepasbare desinfectiemiddelen. Daarbij moet gedacht worden aan de beantwoording van vragen zoals:

- Wat zijn de effecten van de desinfectiemiddelen op de teelt en de ontwikkeling van de champignons? Daarbij valt te denken aan effecten op de invloed van teelthandelingen, zoals CAC-en en opruwen (wat doet dat met het strakke teeltschema dat in de praktijk wordt gevolgd?).
- Wat zijn de effecten op andere pathogenen van de champignon?
- Beïnvloeding van de smaak van champignons.
- Effecten op champost (Levert toepassing van het nieuwe desinfectiemiddel een probleem bij de afzet van champost).

2 Inleiding

In de champignonteelt worden in de teelt op de champignonteeltbedrijven problemen veroorzaakt door schimmelziekten zoals groene schimmels (*Trichoderma*-soorten) en droge mollen (*Verticillium fungicola* var. *fungicola*). Bij de beheersing van deze ziekten zijn preventieve maatregelen van groot belang, omdat er slechts beperkte curatieve methoden en middelen beschikbaar zijn (zie voor meer informatie Baars, 2007, Baars & Zijlstra, 2007, Baars, Rutjens & de Kogel, 2008 en Baars, 2008). Voor de bestrijding van *Trichoderma* is geen enkel fungicide en voor de bestrijding van droge mollen is nog slechts een fungicide toegelaten. Deze toelating was nog geldig tot 01-11-2007 en heeft momenteel een "toelating van rechtswege" in het kader van het EU-beoordelings-traject. Ook is het nog maar de vraag of de toelatinghouder deze wil of kan verlengen. De beperkte curatieve toepassing van de nog toegelaten chemische gewasbeschermingsmiddelen vergroot de noodzaak tot preventieve maatregelen. Desinfectie neemt daarbij op de champignonteeltbedrijven, maar ook bij de grondstofleveranciers en bij een gedeelte van de collecterende handel een belangrijke plaats in. Slechts een gedeelte van het (meermalige) fust wordt gestoomd of ontsmet met chloor of formaline. Via het niet ontsmette (meermalige) fust kan vooral de verspreiding van droge mollen plaatsvinden.

Verder is hygiëne van zeer groot belang bij de grootschalige bereiding van grondstoffen, zoals doorgroeiende compost. Bij de desinfectie van bijv. tunnelhallen wordt gebruikt gemaakt van formaldehyde. Het gebruik van formaldehyde en ook van chloor, staat vanuit ARBO- en milieu aspecten in toenemende mate onder druk. Het voor gebruik in tunnelhallen toegelaten middel Formalforte is al per 01-09-2006 komen te vervallen. Het gebruik van formaldehyde als desinfectiemiddel staat daarnaast onder druk omdat dit als actieve stof niet Europees wordt ondersteund en er een voornemen bestaat om het tot klasse 1 inzake carcinogeniteit te verklaren. Mocht dit inderdaad doorgang vinden dan betekent dit dat alle toepassingen van formaline onmogelijk worden.

Dit is een risicovolle ontwikkeling omdat er geen alternatieve middelen met een vergelijkbare werking (contact- en dampwerking) beschikbaar zijn.

Binnen het Praktijknetwerk "Telen met Toekomst" (LNV-project) is gesproken over een tweetal alternatieven voor de huidige desinfectiemiddelen. Met name de champignontelers en de grondstoffenleveranciers erkennen de noodzaak voor het onderzoek naar alternatieve middelen. In de bollenteelt zijn positieve ervaringen opgedaan met deze twee middelen.

Tot op heden is echter onvoldoende bekend of de beoogde twee "nieuwe" desinfectiemiddelen effectief genoeg zijn voor (verschillende) toepassingen in de champignonteelt.

Het doel van dit project is om te onderzoeken of de beoogde desinfectiemiddelen effectief en toepasbaar zijn. Een te beantwoorden vraag luidt: Hebben de producten potentie als desinfectiemiddel voor fustontsmetting, eventueel tunnelhallen, lege teeltruimten en materialen (machines en gereedschappen). Daarnaast speelt de vraag of toepassing in de teelt bij bijvoorbeeld de bestrijding van bacterievlekken, droge mollen of groene schimmels mogelijk is.

In het project wordt in vitro (= onder laboratorium condities) de effectiviteit van beide desinfectiemiddelen onderzocht. Vervolgens wordt een inschatting gemaakt van de inzetbaarheid resp. mogelijkheid om tot een toelating te komen.

Indien het project positieve resultaten oplevert, zal het een uitgangspunt kunnen bieden om tot een toelating (of uitbreiding) te komen. Het in vitro onderzoek is als zodanig erkend voor opname in het toelatingsdossier. Aanvullend onderzoek voor een toelatingsdossier valt buiten het huidige project.

Het vergaren van deze informatie is noodzakelijk om de potentiële vermarkters verder te kunnen interesseren. De uiteindelijke keuze tot de daadwerkelijke vermarkting valt buiten de competentie van PRI-Paddestoelen en is afhankelijk van beleid resp. belangen van overheid en de vermarkter.

De studie is uitgevoerd in de periode van 1 januari 2008 tot 1 juli 2008.

3. Materiaal en methode.

Kweek van sporen

In de laboratoriumexperimenten werden sporen(suspensies) van *A. bisporus* resp. *Trichoderma harzianum* en *Verticillium fungicola* var. *fungicola* gebruikt. De sporensuspensie van *A. bisporus* werd bereid door van champignons opgevangen sporen op te lossen in demi-water. Bij *Trichoderma harzianum* resp. *Verticillium fungicola* var. *fungicola* werd mycelium gekweekt op agarmedium en zodra dit mycelium sporuleerde werden de sporen gewassen (verzameld) en eveneens opgelost in demi-water. De verkregen sporen(suspensies) werden opgelost in demi-water waaraan ook de te testen desinfectiemiddelen werden toegevoegd. De sporen zijn eigenlijk opgelost in een verdunde oplossing van het betreffende desinfectiemiddel en komen hier optimaal mee in contact.

Laboratoriumexperimenten

Sporen van *Agaricus bisporus*

Het doel van deze (drie) laboratoriumexperimenten was om te onderzoeken of diverse doseringen van de twee alternatieve desinfectiemiddelen een lethaal effect hebben op sporen van *A. bisporus*. Voor deze experimenten werden sporen, opgelost in het betreffende desinfectiemiddel, getest. Per ml desinfectievloeistof waren $1,05 \cdot 10^6$ sporen van *A. bisporus* aanwezig. Na de behandeling werd de desinfectievloeistof afgezogen via een membraanfilter. De sporen kunnen

Tabel 1. Opzet van de laboratoriumexperimenten waarin twee desinfectiemiddelen zijn getest bij *A. bisporus*. Weergegeven zijn de verschillende behandelingen. Deze experimenten zijn aangeduid als experiment *A. bisporus*.

<i>Experiment A. bisporus</i>	
Behandeling	Behandelingsvloeistof Concentratie actief desinfectiemiddel in %
Desinfectiemiddel A; 20 minuten behandelingstijd	1 %
	5 %
	10 %
Desinfectiemiddel D; 20 minuten behandelingstijd	0,1 %
	0,5 %
	1,0 %
	5,0 %
	10,0 %
Desinfectiemiddel D; 30 minuten behandelingstijd	1 %
Desinfectiemiddel A; 40 minuten behandelingstijd	5 %
Desinfectiemiddel D; 40 minuten behandelingstijd	5 %
Formaline; 20 minuten behandelingstijd	2 %
Onbehandeld	0 %

dit filter niet passeren en blijven hierop achter. Vervolgens wordt nagespoeld met demi-water om nog aanwezige restanten van het desinfectiemiddel te verwijderen. De sporen op het membraanfilter worden hierna opgelost in

demi-water en geteld. Na telling werd elke behandeling in 5-voud uitgeplaat op Bitorquis-agar (MEA, waarop eerst mycelium van *A. bitorquis* is gegroeid). Na vier weken incuberen bij 25 °C werd bij de behandelingen het aantal gekiemde sporen vastgesteld.

Sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola*

Het doel van deze (twee) laboratoriumexperimenten was om te onderzoeken of diverse doseringen van de twee alternatieve desinfectiemiddelen een lethaal effect hebben op sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. Voor deze experimenten werden sporen, opgelost in het betreffende desinfectiemiddel, getest. Per ml desinfectievloeistof waren $1,3-2,2 \times 10^5$ sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola* aanwezig. Na de behandeling werd de desinfectievloeistof afgezogen via een membraanfilter. De sporen kunnen dit filter niet passeren en blijven hierop achter. Vervolgens wordt nagespoeld met demi-water om nog aanwezige restanten van het desinfectiemiddel te verwijderen. De sporen op het membraanfilter worden hierna opgelost in demi-water en geteld. Na telling werd elke behandeling in 5-voud uitgeplaat op PDA. Na twee weken incuberen bij 21 °C werd bij de behandelingen het aantal gekiemde sporen vastgesteld.

Tabel 2. Opzet van de laboratoriumexperimenten waarin twee desinfectiemiddelen zijn getest bij *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. Weergegeven zijn de verschillende behandelingen. Deze experimenten zijn aangeduid als experiment *Verticillium fungicola* var. *fungicola*.

<i>Experiment Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	
Behandeling	Behandelingsvloeistof Concentratie actief desinfectiemiddel in %
Desinfectiemiddel A; 20 minuten behandelingstijd	1 % 5 % 10 %
Desinfectiemiddel D; 20 minuten behandelingstijd	0,1 % 0,5 % 1,0 % 5,0 %* 10,0 %
Formaline; 20 minuten behandelingstijd	2 %
Onbehandeld	0 %

*: Niet getest vanwege de maximaal uitvoerbare behandelingen of omdat de overige behandelingen voldoende informatie geven over het geteste desinfectiemiddel.

Sporen van *Trichoderma harzianum*

Het doel van deze (drie) laboratoriumexperimenten was om te onderzoeken of diverse doseringen van de twee alternatieve desinfectiemiddelen een lethaal effect hebben op sporen van *Trichoderma harzianum*. Voor deze experimenten werden sporen, opgelost in het betreffende desinfectiemiddel, getest. Per ml van de te behandelen desinfectievloeistof waren $0,9-1,23 \times 10^6$ sporen van *Trichoderma harzianum* aanwezig. Na de behandeling werd de desinfectievloeistof afgezogen via een membraanfilter. De sporen kunnen dit filter niet passeren en blijven hierop achter. Vervolgens wordt nagespoeld met demi-water om nog aanwezige restanten van het desinfectiemiddel te verwijderen. De sporen op het membraanfilter worden hierna opgelost in demi-water en geteld. Na telling werd elke

behandeling in 5-voud uitgeplaat op PDA. Na twee weken incuberen bij 25 °C werd bij de behandelingen het aantal gekiemde sporen vastgesteld.

Tabel 3. Opzet van de laboratoriumexperimenten waarin twee desinfectiemiddelen zijn getest bij *Trichoderma harzianum*. Weergegeven zijn de verschillende behandelingen. Deze experimenten zijn aangeduid als experiment *Trichoderma harzianum*.

<i>Experiment Trichoderma harzianum</i>	
Behandeling	Behandelingsvloeistof Concentratie actief desinfectiemiddel in %
Desinfectiemiddel A; 20 minuten behandelingstijd	1 % 5 % 10 %
Desinfectiemiddel D; 20 minuten behandelingstijd	0,1 % 0,5 % 1,0 % 5,0 % 10,0 %
Desinfectiemiddel A; 40 minuten behandelingstijd	5 %
Desinfectiemiddel D; 40 minuten behandelingstijd	5 %
Formaline; 20 minuten behandelingstijd	2 %
Formaline; 30 minuten behandelingstijd	2 %
Formaline; 40 minuten behandelingstijd	2 %
Onbehandeld	0 %

Statistische analyse van de resultaten

Het aantal gekiemde sporen per behandeling is gemiddeld en uitgedrukt in een reductie-% ten opzichte van de onbehandelde controle. Een aantal behandelingen is in de vervolg-experimenten per schimmel herhaald en een aantal werd niet herhaald. Om deze reden is er geen statistische analyse van de resultaten uitgevoerd.

4. Resultaten

Effect op sporen van *Agaricus bisporus*.

Bij desinfectiemiddel A geeft de 10% dosering bij een behandelingstijd van 20 minuten een 100 % reductie. De behandeling met een 5 % dosering geeft slechts een beperkte reductie van 44,8 %. De behandeling met een 1 % dosering geeft geen reductie maar een stimulering van het aantal gekiemde sporen (Figuur 1).

Een langere behandelingstijd, namelijk 40 minuten in combinatie met een 5 % dosering van het desinfectiemiddel A geeft een hogere reductie of afdoding van de champignonsporen en wel tot 100 % (Tabel 4).

Bij desinfectiemiddel D geven de 0,1 resp 0,5 of 1 % dosering en een behandelingstijd van 20 minuten een onvoldoende reductie of afdoding van de champignonsporen (Figuur 2). De 5 of 10 % dosering en een behandeling gedurende 20 minuten geeft een hogere reductie of afdoding van de champignonsporen, namelijk van 93,5 tot 95,8 %. Deze reductie is echter nog onvoldoende.

De 1 % dosering in combinatie met een langere behandelingstijd, namelijk 30 minuten geeft een hogere reductie of afdoding van de champignonsporen en wel tot 72,6 %

De 5 % dosering in combinatie met een nog langere behandelingstijd, namelijk 40 minuten met het desinfectiemiddel D geeft echter geen hogere reductie of afdoding van de champignonsporen.

De (controle) behandeling met een 2 % formaline-oplossing en een behandelingstijd van 20 minuten geeft een reductie van 100 % ofwel geen kiemende champignonsporen meer.

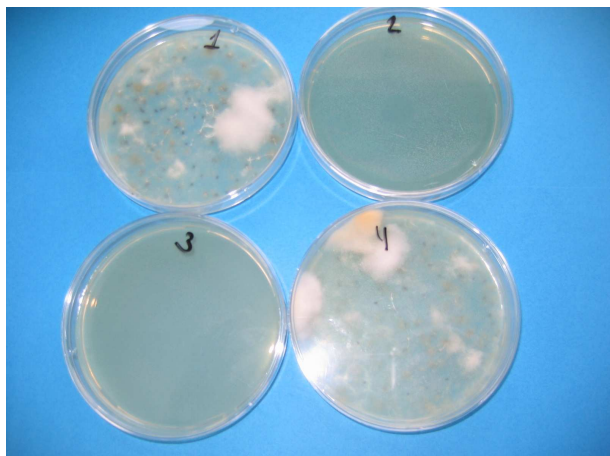
Bij de resultaten kan nog worden opgemerkt, dat de kieming na 4 weken is beoordeeld en weergegeven als reductie-% in tabel 4. Een na 5 weken uitgevoerde herbeoordeling bevestigde het vermelde reductie-%.

Tabel 4. Weergegeven is de gemiddelde reductie van het aantal nog kiemende sporen per behandeling in de experimenten met sporen van *A.bisporus*. De reductie is weergegeven t.o.v. de (onbehandelde) controle.

<i>Experiment A. bisporus</i>		
Behandeling	Behandelingsvloeistof Concentratie actief desinfectiemiddel in %	Reductie in %
Desinfectiemiddel A; 20 minuten behandelingstijd	1 %	- 32,6
	5 %	44,8 *
	10 %	100,0
Desinfectiemiddel D; 20 minuten behandelingstijd	0,1 %	71,4
	0,5 %	57,0
	1,0 %	31,6 **
	5,0 %	95,8
	10,0 %	93,5
Desinfectiemiddel D; 30 minuten behandelingstijd	1 %	72,6
Desinfectiemiddel A; 40 minuten behandelingstijd	5 %	100,0
Desinfectiemiddel D; 40 minuten behandelingstijd	5 %	91,1
Formaline; 20 minuten behandelingstijd	2 %	100,0
Onbehandeld	0 %	

*: Gemiddelde van -10,5 en 100.

** : Gemiddelde van 23,4 en 39,8.



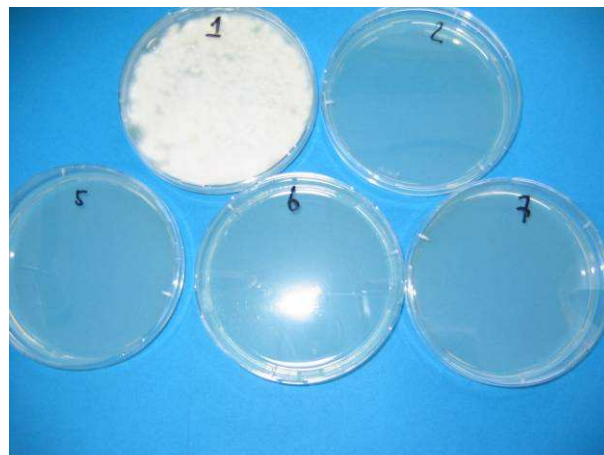
Figuur 1. Effectiviteit van desinfectiemiddel A bij champignonsporen. Foto is genomen na 4 weken incubatie bij 25°C. 1) onbehandelde controle, 2) effect van 2% formaline gedurende 20 minuten, 3) effect van 10% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten, 4) effect van 1% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten.



Figuur 2. Effectiviteit van desinfectiemiddel D bij champignonsporen. Foto is genomen na 4 weken incubatie bij 25°C. 1) onbehandelde controle, 2) effect van 2% formaline gedurende 20 minuten, 5) effect van 10% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten, 6) effect van 1% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten, 7) effect van 0.1% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten.



Figuur 3. Effectiviteit van desinfectiemiddel A bij *Verticillium*-sporen. Foto is genomen na 2 weken incubatie bij 21°C. 1) onbehandelde controle, 2) effect van 2% formaline gedurende 20 minuten, 3) effect van 10% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten, 4) effect van 1% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten.



Figuur 4. Effectiviteit van desinfectiemiddel D bij *Verticillium*-sporen. Foto is genomen na 2 weken incubatie bij 21°C. 1) onbehandelde controle, 2) effect van 2% formaline gedurende 20 minuten, 5) effect van 10% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten, 6) effect van 1% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten, 7) effect van 0.1% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten.

Effect op sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola*

Bij desinfectiemiddel A geeft de 5 of 10 % dosering en een behandelingstijd van 20 minuten een 100 % reductie. De 1 % dosering geeft een onvoldoende reductie (67,2 %) of afdoding van het aantal sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (Figuur 3).

Bij desinfectiemiddel D geven alle geteste doseringen (0,1 of 0,5 resp. 1 Of 10%) een behandelingstijd van 20 minuten een volledige reductie of afdoding van de sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (Figuur 4.) Omdat bij een behandelingstijd van 20 minuten al een 100 % afdoding van de betreffende sporen werd bereikt zijn geen langere behandelingstijden getest.

Ook de (controle) behandeling met een 2 % formaline-oplossing en een behandelingstijd van 20 minuten geeft een reductie van 100 % ofwel geen kiemende sporen van meer *Verticillium fungicola* var. *fungicola*.

Bij de resultaten kan nog worden opgemerkt, dat de kieming na 2 weken is beoordeeld en weergegeven als reductie-% in tabel 5. Een na 3 weken kieming uitgevoerde herbeoordeling bevestigde de vermelde reductie-%.

Tabel 5. Weergegeven is de gemiddelde reductie van het aantal nog kiemende sporen per behandeling in de experimenten met sporen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. De reductie is weergegeven t.o.v. de (onbehandelde) controle.

<i>Experiment Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>		
Behandeling	Behandelingsvloeistof Concentratie actief desinfectiemiddel in %	Reductie in %
Desinfectiemiddel A; 20 minuten behandelingstijd	1 %	67,2
	5 %	100
	10 %	100
Desinfectiemiddel D; 20 minuten behandelingstijd	0,1 %	100
	0,5 %	100
	1,0 %	100
	5,0 %	Niet getest *
	10,0 %	100
Formaline; 20 minuten behandelingstijd	2 %	100
Onbehandeld	0 %	

* : Niet getest omdat de overige behandelingen voldoende informatie geven over de geteste desinfectiemiddelen.

Effect op sporen van *Trichoderma harzianum*

Desinfectiemiddel A geeft in de 10 % dosering en een behandelingstijd van 20 minuten een 100 % reductie. De behandeling met een 1 of 5 % dosering geeft een onvoldoende reductie van het aantal gekiemde sporen van *Trichoderma harzianum* (Figuur 5).

Een 5 % dosering in combinatie met een langere behandelingstijd, namelijk 40 minuten met het desinfectiemiddel A geeft wel een hogere reductie of afdoding van de sporen *Trichoderma harzianum* en wel tot 100 % (Tabel 6).

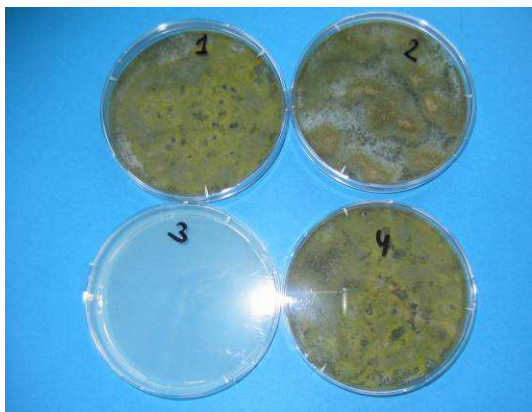
Desinfectiemiddel D geeft in de 0,1 of 0,5 dosering en een behandelingstijd van 20 minuten een onvoldoende reductie of afdoding van de sporen van *Trichoderma harzianum*.

De 1 of 10 % dosering en een behandelingstijd van 20 minuten geeft een 100 % reductie of afdoding van *Trichoderma harzianum*.

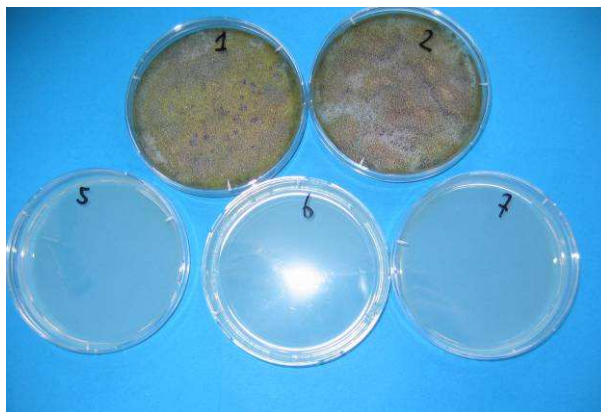
Omdat bij de 1 of 10 % dosering van desinfectiemiddel D al een 100 % reductie van de betreffende sporen werd bereikt, zijn er met dit middel geen langere behandelingstijden dan 20 minuten getest (Figuur 6).

De (controle) behandeling met een 2 % formaline-oplossing en een behandelingstijd van 20 minuten geeft in dit project slechts een reductie van 26,7 %. Bij een langere behandelingstijd van 30 resp. 40 minuten, is er nog steeds een beperkte reductie van 41,5 resp. 28, %. Opmerkelijk is dat de langste behandelingstijd het laagste reductie % heeft.

Bij de resultaten kan nog worden opgemerkt, dat de kieming na 2 weken is beoordeeld en weergegeven als reductie-% in tabel 6. Een na 3 weken kieming uitgevoerde herbeoordeling bevestigde de vermelde reductie-%.



Figuur 5. Effectiviteit van desinfectiemiddel A bij *Trichoderma harzianum*. Foto is genomen na 2 weken incubatie bij 25°C. 1) onbehandelde controle, 2) effect van 2% formaline gedurende 20 minuten, 3) effect van 10% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten, 4) effect van 1% desinfectiemiddel A gedurende 20 minuten.



Figuur 6. Effectiviteit van desinfectiemiddel D bij *Trichoderma harzianum*. Foto is genomen na 2 weken incubatie bij 25°C. 1) onbehandelde controle, 2) effect van 2% formaline gedurende 20 minuten, 5) effect van 10% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten, 6) effect van 1% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten, 7) effect van 0.1% desinfectiemiddel D gedurende 20 minuten (De reductie van behandeling 7 was gemiddeld 88.1%. De hier getoonde petrischaal toont geen kolonies. In de herhalingen waren wel kolonies te zien).

Tabel 6. Weergegeven is de gemiddelde reductie van het aantal nog kiemende sporen per behandeling in de experimenten met sporen van *Trichoderma harzianum*. De reductie is weergegeven t.o.v. de (onbehandelde) controle.

<i>Experiment Trichoderma harzianum</i>		
Behandeling	Behandelingsvloeistof Concentratie actief desinfectiemiddel in %	Reductie in %
Desinfectiemiddel A; 20 minuten behandelingstijd	1 %	25,1
	5 %	62,0 *
	10 %	100,0
Desinfectiemiddel D; 20 minuten behandelingstijd	0,1 %	88,1
	0,5 %	54,6 **
	1,0 %	100,0
	5,0 %	Niet getest ***
	10,0 %	100,0
Desinfectiemiddel A; 40 minuten behandelingstijd	5 %	100,0
Desinfectiemiddel D; 40 minuten behandelingstijd	5 %	Niet getest ***
Formaline; 20 minuten behandelingstijd	2 %	26,7 ****
Formaline; 30 minuten behandelingstijd	2 %	41,5
Formaline; 40 minuten behandelingstijd	2 %	28,0
Onbehandeld	0 %	

* : Gemiddelde van 23,0 en 100.

** : Gemiddelde van 9,2 en 100

*** : Niet getest vanwege de maximaal uitvoerbare behandelingen of omdat de overige behandelingen voldoende informatie geven over de geteste desinfectiemiddelen.

****: Gemiddelde van 38,8 resp. 42,9 en - 1,7.

5. Discussie

Uit de resultaten van de laboratoriumexperimenten met sporen van *A. bisporus* kwam naar voren dat desinfectiemiddel A in een 10 % dosering en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een reductie realiseerde van 100 %. Dat is vergelijkbaar met onze "standaard", namelijk een 2% formaline-oplossing.

Bij de 5 % dosering was een verdubbeling van de behandelingstijd van 20 naar 40 minuten nodig voor een 100 % reductie.

Opmerkelijk is dat een lage dosering, namelijk 1%, van het desinfectiemiddel A en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een negatieve reductie ofwel een stimulering van het aantal gekiemde champignonsporen realiseerde.

Uit de laboratoriumexperimenten met sporen van *A. bisporus* kwam verder naar voren dat desinfectiemiddel D in alle geteste doseringen (0,1 tot 10 %) en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een onvoldoende reductie realiseerde. De hoogste en nog steeds onvoldoende reductie werd bereikt bij een 5 of 10% dosering, namelijk 95,8 resp. 93,5 %. De effecten van de lage doseringen (0,1 resp. 0,5 en 1 %) zijn onderling nogal verschillend. De laagste dosering geeft de hoogste reductie of afdoding van de champignonsporen. Bij een oplopende dosering van 0,5 naar 1 % zien we een afnemende reductie.

De verlenging van de behandelingstijd van 20 naar 30 minuten in combinatie met de 1 % dosering van het desinfectiemiddel D resulteerde een hogere reductie van 72,6 % (t.o.v. 31,6 % na behandelingstijd van 20 minuten). Een verdubbeling van de behandelingstijd van 20 naar 40 minuten bij de 5% dosering van desinfectiemiddel D resulteerde niet een hogere reductie. Blijkbaar heeft bij deze dosering een langere inwerktijd geen beter desinfectieresultaat.

Uit de resultaten van de laboratoriumexperimenten met sporen van *V. fungicola* var. *fungicola* kwam naar voren dat desinfectiemiddel A in een 5 of 10 % dosering en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een reductie realiseerde van 100 %. Dat is vergelijkbaar met onze "standaard", namelijk een 2 % formaline-oplossing.

De lage dosering, namelijk 1%, van het desinfectiemiddel A en de standaard behandelingstijd van 20 minuten geeft een onvoldoende reductie ofwel afdoding van de sporen *V. fungicola* var. *fungicola*.

Uit de laboratoriumexperimenten met sporen van *V. fungicola* var. *fungicola* kwam verder naar voren dat desinfectiemiddel D in alle geteste doseringen (0,1 tot 1 resp. 10 %) en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een volledige reductie realiseerde ofwel 100 % afdoding van de sporen.

Op grond van deze resultaten zijn geen langere behandelingstijden (30 of 40 minuten) getest.

Uit de resultaten van de laboratoriumexperimenten met sporen van *Trichoderma harzianum* kwam naar voren dat desinfectiemiddel A in een 10% dosering en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een reductie realiseerde van 100 %. De lagere doseringen, 1 resp. 5 %, van het desinfectiemiddel A en de standaard behandelingstijd van 20 minuten geven een onvoldoende reductie ofwel afdoding van de sporen *Trichoderma harzianum*. In dit opzicht komen de resultaten die behaald werden met *Trichoderma harzianum* overeen met de resultaten die behaald werden met de dikwandige champignonsporen.

De verdubbeling van de behandelingstijd van 20 naar 40 minuten bij de 5 % dosering van desinfectiemiddel A resulteerde een 100% reductie (t.o.v. 62 % na een behandelingstijd van 20 minuten).

Uit de laboratoriumexperimenten met sporen van *Trichoderma harzianum* kwam verder naar voren dat desinfectiemiddel D in de dosering van 1 resp. 10 % en de standaard behandelingstijd van 20 minuten een 100 % reductie realiseerde. De effecten van de lage doseringen (0,1 resp. 0,5 %) zijn onderling nogal verschillend. De laagste dosering geeft de hoogste reductie of afdoding van de sporen van *Trichoderma harzianum*. Bij een oplopende dosering naar 0,1 naar 0,5 % zien we een afnemende reductie. Bij het effect op sporen van *A. bisporus* is een vergelijkbaar resultaat waargenomen.

Op grond van de maximaal uitvoerbare behandelingen en doelstelling van het onderzoek was er geen mogelijkheid om ook langere behandelingstijden (30 of 40 minuten) te testen.

Opmerkelijk is het effect van “standaard” behandeling met de 2 % formaline dosering en de standaard behandelingstijd van 20 minuten, namelijk een lage reductie van 26,7% of afdoding van sporen van *Trichoderma harzianum*.

Een verlenging van de behandelingstijd van 20 naar 30 minuten bij de 2% formaline dosering resulteerde een iets hogere reductie en wel van 41,5 %.

De verdubbeling van de behandelingstijd van 20 naar 40 minuten bij de 2% formaline dosering resulteerde weer in een lagere reductie van slechts 28,0 %. De sporen van *Trichoderma harzianum* bleken daarmee beter bestand tegen formaline dan verwacht. Er zijn nog niet eerder proeven uitgevoerd waarin de gevoeligheid van *Trichoderma harzianum*-sporen voor formaline werd gemeten. Tot nu toe was aangenomen dat de dikwandige sporen van de champignon veel beter bestand waren tegen formaline dan de veel dunwandigere sporen van *Trichoderma harzianum* en *Verticillium fungicola*.

In het licht van de huidige problemen in de teelt met *Trichoderma aggressivum* (in biologisch opzicht een andere soort dan *T. harzianum*) is in een klein experimentje gekeken naar de gevoeligheid van *Trichoderma aggressivum* sporen voor formaline. Een behandeling van 20 minuten met een 2% formaline oplossing doodde alle sporen van deze schimmel af.

Uit deze de (vijf) laboratoriumexperimenten bleek dat desinfectiemiddelen A en D perspectief bieden voor verdere ontwikkeling tot een alternatief desinfectiemiddel voor met name formaline.

Bij desinfectiemiddel A is voor een voldoende afdoding van sporen van *A. bisporus* en *Trichoderma harzianum* een dosering van minimaal 10 % en een behandelingstijd van minimaal 20 minuten noodzakelijk.

Voor sporen van *V. fungicola* var. *fungicola* is bij desinfectiemiddel A is voor een voldoende afdoding van sporen een dosering van minimaal 5 % en een behandelingstijd van minimaal 20 minuten nodig.

Bij desinfectiemiddel D is voor een voldoende afdoding van sporen van *A. bisporus* een hogere dosering dan 10 % en een behandelingstijd van meer dan 20 minuten nodig. Voor sporen van *V. fungicola* var. *fungicola* is een dosering van minimaal 0,1 % en bij sporen van *Trichoderma harzianum* is bij desinfectiemiddel D een dosering van minimaal 1 % en een behandelingstijd van minimaal 20 minuten noodzakelijk.

Omdat desinfectiemiddel A beperkt houdbaar is (48-72 uur) en er bovendien speciale bereidingsapparatuur nodig is kan het perspectief bieden voor toepassing op tunnelbedrijven en bij fustontsmetting. Dosering en toepassing onder praktijkomstandigheden dienen dan nog geoptimaliseerd te worden.

Op teeltbedrijven zou de toepassing op de dekgrond na het afdekken een optie kunnen zijn. Omdat de apparatuur voor de bereiding van desinfectiemiddel A relatief duur is voor teeltbedrijven, zou het middel centraal bereid kunnen worden en vervolgens vervoerd kunnen worden naar teeltbedrijven. Een goede en betrouwbare logistiek is dan echter een belangrijke voorwaarde.

Desinfectiemiddel D lijkt vanwege de effectieve afdoding in lage doseringen van met name van sporen *V. fungicola* var. *fungicola* en *Trichoderma harzianum* perspectief te bieden voor toepassingen op de dekgrond na het afdekken en tussen de vluchten. Ook hier zal toepassing, dosering en neveneffecten onder praktijkcondities nader onderzocht moeten worden.

Beide desinfectiemiddelen passen in het toekomstige kader van een chemisch middelenvrije teelt.

6. Conclusies

Uit dit onderzoek kwam het volgende naar voren:

- Desinfectiemiddel A dood in een dosering van 10 % en een behandelingstijd van 20 minuten sporen van *A.bisporus* en *Trichoderma harzianum* volledig af.
- Desinfectiemiddel A dood in een dosering van 5 % en een behandelingstijd van 20 minuten sporen van *V. fungicola* var. *fungicola* volledig af.
- Desinfectiemiddel A dood in een dosering van 5 % en een behandelingstijd van 40 minuten sporen van *A.bisporus* en *Trichoderma harzianum* volledig af.
- Desinfectiemiddel A dood in een lage dosering van 1 % en een behandelingstijd van 20 minuten sporen van *A.bisporus* resp. *V. fungicola* var. *fungicola* en *Trichoderma harzianum* onvoldoende af.
- Desinfectiemiddel D dood in een dosering van 10 % en een behandelingstijd van 20 minuten sporen van *A.bisporus* onvoldoende af.
- Desinfectiemiddel D dood in een dosering van 1 % en een behandelingstijd van 20 minuten sporen van *Trichoderma harzianum* volledig af.
- Desinfectiemiddel D dood in een lage dosering van 0,1 % en een behandelingstijd van 20 minuten sporen van *V. fungicola* var. *fungicola* volledig af.

Concluderend kan worden vastgesteld dat de resultaten van dit project aangeven dat de geteste desinfectiemiddelen A resp. D, geschikt lijken om verder te ontwikkelen tot een in de champignonteelt toepasbaar desinfectiemiddel.

Van desinfectiemiddel A is er nog geen dossier voor een Nederlandse toelating opgebouwd en bovendien is het niet vermeld op de Annex 1. Het is de vraag of gezien de specifieke aard van het middel het noodzakelijk is om op de Annex 1 vermeld te worden. Uit informatie van het Ctgb blijkt dat de techniek (anodische oxidatie) onder de Gewasbeschermingswet valt. Dit betekent dat voor het op de markt brengen en gebruiken van de techniek (apparatuur) in Nederland een toelating van het Ctgb nodig is. In de praktijk is er al een breed scala van toepassingen (drinkwater- bereiding, behandeling water in zwembaden, zaaizaadbehandeling, shelf life verlenging van groenten en fruit enz.).

Voor de toepassing ter bestrijding van legionellabacteriën in collectieve watervoorzieningen en collectieve leidingnetten moet er voor 6 september 2008 een aanvraag voor toelating worden ingediend bij het Ctgb. Bij de toepassingen van deze techniek op andere plaatsen of voor andere doeleinden wordt op dit moment nog geen gedifferentieerd handhaafbeleid geformuleerd.

Met desinfectiemiddel A zijn ook positieve resultaten behaald in bollenteelt (bolontsmetting). Dit betekent er in meerdere sectoren belangstelling bestaat zodat een registratie van de techniek of toepassing in Nederland meer commercieel perspectief heeft.

Van desinfectiemiddel D is er al een dossier voor een Nederlandse toelating opgebouwd en bovendien loopt de procedure voor plaatsing op de Annex 1.

Op grond van bovenstaande conclusies wordt voorgesteld om een vervolg-traject in te gaan, waarin de mogelijkheden om te komen tot een commercieel toepasbaar desinfectiemiddel A resp. D worden onderzocht.

7. Suggesties voor verder onderzoek

Ook al lijken de twee desinfectiemiddelen A en D geschikt voor verdere ontwikkeling tot een commercieel toepasbaar desinfectiemiddel, toch zullen er nog verschillende vragen beantwoord moeten worden voordat deze middelen toepasbaar zijn in de praktijk.

Welke toepassingen zijn er technisch en commercieel met beide of een van de desinfectiemiddelen in de champignonteelt realiseerbaar ?

Daartoe dient onderzocht te worden of en welke toepassing op tunnelbedrijven, bij de fustontsmetting of op teeltbedrijven technisch en commercieel uitvoerbaar en realiseerbaar is.

Welk van de desinfectiemiddelen is het snelst beschikbaar voor toepassing in de praktijk ?

Het ligt voor de hand om te onderzoeken of van beide desinfectiemiddelen gegevens bekend zijn die procedures en de vorming van een dossier positief kunnen beïnvloeden.

Welke doseringen en inwerktijd zijn onder praktijkomstandigheden nodig om het gewenste effect te verkrijgen?

Met betrekking tot effectiviteit dient onderzocht te worden wat de optimale dosering en inwerktijd is van beide desinfectiemiddelen die in dit project als geschikt naar voren zijn gekomen. Hierbij valt te denken aan:

- toepassing in tunnelhallen waarin voorafgaand en volgend op de desinfectie het aantal kolonievormende eenheden in luchtmonsters kunnen worden gemeten,
- toepassing bij fustontsmetting waarin voorafgaand en volgend op de desinfectie het aantal kolonievormende eenheden afkomstig van veegtesten kunnen worden gemeten,
- toepassing op teeltbedrijven, met name;
 - toepassing als dekaarde ontsmetting (effect van desinfectie op de ontwikkeling van een droge molleninfectie)
 - toepassing tussen de vluchten (effect van desinfectie op de ontwikkeling van *Trichoderma harzianum* infecties)

Met betrekking tot corrosiviteit dient informatie verzameld te worden, welke invloed de desinfectiemiddelen hebben op het metaal in de constructie van hallen, machines e.d.

Wat zijn de effecten van de desinfectiemiddelen op de teelt en de ontwikkeling van de champignons?

In nader onderzoek zal getest worden of de desinfectiemiddelen invloed hebben op de teelt (bijv. myceliumingroei in de dekgrond) of de uitgroei van de champignons (bij toepassing tussen de vluchten) niet nadelig beïnvloeden.

Wat zijn de effecten op andere pathogenen van de champignon?

Het lijkt zinvol om te onderzoeken of de desinfectiemiddelen mogelijk de ontwikkeling van andere pathogenen van de champignon, zoals bacterievlekken, droge mollen of groene schimmels kunnen beïnvloeden.

Wat zijn de noodzakelijke gegevens voor een nieuw dossier ?

- a) Gegevens voor opname op Annex 1.
- b) Deugdelijkheids- en ander noodzakelijk onderzoek t.b.v. de Nederlandse toelating.
- c) Beïnvloeding van de smaak van champignons.
In nader onderzoek zal onderzocht worden of de betreffende desinfectiemiddelen bij toepassing op de dekgrond of tussen de vluchten de smaak van de champignons niet nadelig beïnvloeden.
- d) Teelthandelingen, zoals CAC-en en opruwen.
De invloed van bijvoorbeeld CAC-en, opruwen op het strakke teeltschema in de praktijk dient onderzocht te worden.
- e) Champost.
Zijn er op het einde van de teelt, na het doodstomen, nog restanten van het toegepaste desinfectiemiddel aanwezig die een probleem kunnen vormen bij de afzet van champost.

8. Literatuur

- Baars J. (2007) Masterplan gewasbescherming. Vakdeel Paddestoelen Nummer 2, pag. 5.
- Baars J. (2008) Plantenextracten tegen droge mollen. Vakdeel Paddenstoelen, Nummer 3, pag. 18-19.
- Baars J., Rutjens J. & de Kogel W-J. (2008) Alternatieven voor vliegen bestrijding. Vakdeel Paddenstoelen, Nummer 1, pag. 8-9.
- Baars J. & Zijlstra C. (2007) Masterplan Gewasbescherming. PRI Rapport nr. 2007-7

