

(12) BELGISCH UITVINDINGSOCTROOI

(47) Publicatiedatum : 05/10/2021

(21) Aanvraagnummer : BE2020/5149

(22) Indieningsdatum : 05/03/2020

(62) Afgesplitst van basisaanvraag :

(62) Indieningsdatum basisaanvraag :

(51) Internationale classificatie : A01N 59/16, A01P 15/00

(30) Voorrangsgegevens :

(73) Houder(s) :

AVECOM nv
NV
9032, WONDELGEM
België

KAREL STERCKX nv
NV
8800 , ROESELARE
België

(72) Uitvinder(s) :

STRAGIER Lutgart
9032 WONDELGEM
België

VERSTRAETE Willy
9032 WONDELGEM
België

STERCKX Bart
8800 ROESELARE
België

**(54) WERKWIJZE VOOR HET CONTROLEREN VAN PATHOGENE GROEI IN
PADDENSTOELENKWEEK**

(57)De huidige uitvinding betreft een werkwijze voor het controleren van pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, waarbij ijzerionen aan een kweekbodem voor paddenstoelen worden toegediend, waarbij een concentratie gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 5 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend aan genoemde kweekbodem. De huidige uitvinding betreft ook een samenstelling voor gebruik in een paddenstoelenkweek, en een kweekbodem omvattende de samenstelling en het gebruik ervan.

WERKWIJZE VOOR HET CONTROLEREN VAN PATHOGENE GROEI IN PADDENSTOELENKWEK

TECHNISCH DOMEIN

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze en middelen voor het controleren van
5 pathogene groei in een paddenstoelenkweek.

STAND DER TECHNIEK

Gecultiveerde paddenstoelen, zoals bijvoorbeeld de Parijse champignon *Agaricus bisporus*, zijn gevoelig voor een breed scala aan pathogenen. De bacteriële pathogeen *Pseudomonas* is de belangrijkste soort die geassocieerd wordt met bederf bij gekweekte
10 paddenstoelen. Verschillende *Pseudomonas* soorten hebben het vermogen om vlekziekten te veroorzaken met verschillende gradaties van verkleuringen. *Pseudomonas tolaasii* is de belangrijkste veroorzaker van de klassieke bacteriële ziekte, de 'brown blotch' ziekte, in gekweekte paddenstoelen. Het induceert donkerbruine, vaak natte en verzonken laesies op champignonknoppen en stengels, die het gewas
15 onverkoopbaar maken. Naast *P. tolaasii* zijn ook andere *Pseudomonas* sp. schadelijk voor de paddenstoelenkweek.

De conventionele manieren om deze pathogenen te bestrijden, zoals chemische bestrijdingsmiddelen, antibiotica of andere, zijn vanwege de verwachtingen van de consumenten, alsook de nieuwe voorschriften niet langer geschikt als bestrijding.
20 Alternatieve methoden moeten deze conventionele manieren vervangen.

EP 0 210 734 bespreekt het gebruik van een bacteriële concurrent *P. fluorescens* om de groei van *P. tolaasii* onder controle te houden. Ook KR 2004 0 078 027 bespreekt het gebruik van een bacteriële concurrent voor *P. tolaasii*. KR '027 licht *P. putida* toe om enerzijds de groei van de champignon te stimuleren en anderzijds de 'brown blotch' ziekte te verhinderen. Het aanwenden van biologische controlemiddelen zijn één van de
25 mogelijke alternatieve methoden. Dergelijke biologische controlemiddelen vergen kennis en kunde, daar de concurrerende bacteriële stam actief dient te zijn bij toediening aan de kweekbodem en zijn activiteit dient te behouden om zijn concurrentiële positie te behouden. De abundantie van deze concurrerende bacteriële
30 stam en de pathogene bacterie dient regelmatig geverifieerd te worden en eventueel bijgestuurd te worden. Verder dienen de omgevingscondities ideaal te zijn voor de concurrerende bacteriële stam. Biologische controlemiddelen vereisen ook extra opvolging en onkosten.

US 2006 0 019 004 heeft in het algemeen betrekking op werkwijzen voor het verminderen van de bacteriële populatie en het vertragen van bederf en andere ongewenste kwaliteitsveranderingen in verse producten, meer bepaald paddenstoelen, voor humane consumptie. US '004 vermeldt hierbij het gebruik van een eerste
5 microbiële oplossing en een tweede microbiële oplossing waarmee de paddenstoelen worden gewassen om verkleuringen van de paddenstoel door bacteriële infectie of humane handelingen te onderdrukken. US '004 is echter niet gericht op het behandelen van de paddenstoelen tijdens de paddenstoelenkweek, maar eenmaal geplukt. Bacteriële infecties kunnen bijgevolg ontstaan tijdens de kweek en de volledige
10 omgeving infecteren met grote verliezen als gevolg.

De huidige uitvinding beoogt een oplossing te vinden voor tenminste enkele van bovenvermelde problemen.

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

De uitvinding betreft een werkwijze volgens conclusie 1. In het bijzonder heeft de
15 uitvinding betrekking op een werkwijze voor het controleren van pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek.

De werkwijze volgens huidige uitvinding biedt als voordeel dat op een eenvoudige en efficiënte manier de kweekbodem wordt behandeld zonder nadelige effecten. De kweker dient geen specifieke voorkennis te hebben of grote investeringen gemaakt te hebben
20 om de werkwijze te kunnen uitvoeren.

De werkwijze is verder beschreven in vervolgconclusies 2-11.

In een tweede aspect betreft de uitvinding een samenstelling omvattende ijzerionen bij een concentratie gelegen tussen 1 en 8% m/v ijzerionen.

De samenstelling volgens huidige uitvinding biedt als voordeel dat een kant-en-klare
25 oplossing gebruikt kan worden in de paddenstoelenkweek, die telkens een kwantitatieve en kwalitatieve paddenstoelenkweek bewerkstelligt.

In een derde aspect betreft de uitvinding een kweekbodem volgens conclusie 12.

De kweekbodem volgens huidige uitvinding biedt als voordeel dat een kwantitatieve en kwalitatieve paddenstoelenkweek wordt bewerkstelligd, daar deze de groei van
30 pathogene bacteriën voor paddenstoelen controleert.

In een laatste aspect betreft de uitvinding het gebruik van de samenstelling en de kweekbodem in conclusies 13-14.

GEDETAILEERDE BESCHRIJVING

De uitvinding betreft een werkwijze voor het controleren van pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek. De uitvinding betreft verder een samenstelling en een kweekbodem, en het gebruik van beiden.

- 5 Tenzij anders gedefinieerd hebben alle termen die gebruikt worden in de beschrijving van de uitvinding, ook technisch en wetenschappelijke termen, de betekenis zoals ze algemeen begrepen worden door de vakman in het technisch veld van de uitvinding. Voor een betere beoordeling van de beschrijving van de uitvinding, worden de volgende termen expliciet uitgelegd.
- 10 "Een", "de" en "het" refereren in dit document naar zowel het enkelvoud als het meervoud tenzij de context duidelijk anders veronderstelt. Bijvoorbeeld, "een segment" betekent een of meer dan een segment.

- De termen "omvatten", "omvattende", "voorzien van", "bevatten", "bevattende", zijn synoniemen en zijn inclusieve of open termen die de aanwezigheid van wat volgt
- 15 aanduiden, en die de aanwezigheid niet uitsluiten of beletten van andere componenten, kenmerken, elementen, leden, stappen, gekend uit of beschreven in de stand der techniek.

Het citeren van numerieke intervallen door de eindpunten omvat alle gehele getallen, breuken en/of reële getallen tussen de eindpunten, deze eindpunten inbegrepen.

- 20 De term "pathogeen" zoals hierin gebruik verwijst naar een organisme, inclusief een micro-organisme, dat een ziekte veroorzaakt in een ander organisme, zoals bijvoorbeeld een plant of een schimmel, door het ander organisme direct te infecteren, of door stoffen, zoals pathogene toxines, te produceren die de ziekte veroorzaken in het ander organisme. Zoals hierin gebruikt is de pathogeen een ziekteverwekker die in staat is om
- 25 hetzij alleen of in samenwerking met een andere ziekteverwekker, een ziekte bij schimmels uit te lokken inclusief maar niet beperkt tot paddenstoelen, inclusief maar niet beperkt tot eetbare paddenstoelen, inclusief maar niet beperkt tot *Agaricus bisporus*. De "pathogeen" volgens huidige uitvinding verwijst naar bacteriële organismen, inclusief maar niet beperkt tot bacteriële species, inclusief maar niet
- 30 beperkt tot *Pseudomonas* sp.

De term "chelerend agens" verwijst naar een samenstelling die op veelvoudige punten in een coördinatie complex bindt aan een oplosbaar gemaakt (metaal)ion, bij voorkeur een ijzerion.

De term "kweekbodem" volgens huidige uitvinding verwijst naar de bodem waarin paddenstoelen worden gekweekt. Deze bodem omvat een substraatlaag en een deklaag, waarbij de substraatlaag een nutriëntrijke laag is en de deklaag een nutriëntarme laag is. Het broed van de paddenstoelen wordt voorzien in de substraatlaag die nadien wordt
5 afgedekt door de deklaag, eenmaal de substraat is doorgroeid met mycelium van de geënte paddenstoel. De substraatlaag bestaat uit één of meerdere meststoffen zoals bijvoorbeeld paardenmest, ezelmeest, of kippenmest die wordt vermengd met stro, houtsnippers, koffiegruis, of equivalenten. De deklaag omvat veen, schuimaarde, en/of mergel. De deklaag omvat ook de microbiële populatie die essentieel is ter vorming van
10 de vruchtlichamen van de paddenstoelen.

Pathogene bacteriën zijn ongewenst in een paddenstoelenkweek. De pathogene bacteriën kunnen de paddenstoel infecteren en brengen schade aan de paddenstoelen wat nefast is voor de kweek. De infectie resulteert in ziekte symptomen die de waarde van de paddenstoelen vermindert en de paddenstoelen in een vergevorderd
15 ziektestadium zelfs onverkoopbaar maakt. Verder resulteert de infectie ook in een verminderde opbrengst, daar de vorming van nieuwe vruchtlichamen geïnhibeerd wordt.

In een eerste aspect betreft de uitvinding een werkwijze voor het controleren van een pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, waarbij ijzerionen aan een
20 kweekbodem voor paddenstoelen worden toegediend, waarbij een concentratie gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 5 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend aan genoemde kweekbodem.

Het voorzien van een concentratie ijzerionen in de kweekbodem voor paddenstoelen bleek verrassend de groei van voor paddenstoelen pathogene bacteriën te inhiberen.
25 Het toedienen van ijzerionen is eenvoudig toepasbaar in de kweek en vergt geen uitzonderlijke maatregelen. Zonder limitatief te willen zijn ligt een mogelijke verklaring van de werking van de toegevoegde ijzerionen in het voorzien van een niet-limitatieve concentratie van ijzer aan niet-pathogenen aanwezig in de kweekbodem. Hierdoor kunnen deze niet-pathogene bacteriën een groeivoordeel krijgen en de pathogene
30 populaties onderdrukken.

De aangewende ijzerionen zijn algemeen beschikbaar, wat de kostprijs drukt, en kunnen gemakkelijk ter plaatse bewaard worden zonder verlies van activiteit.

In een uitvoeringsvorm zal de toegediende concentratie aan ijzerionen in de kweekbodem bij voorkeur minstens 0,050 kg ijzerionen per m³ zijn na externe
35 toediening van de ijzerionen volgens de werkwijze.

- De groei van voor paddenstoelen pathogene bacteriën wordt geïnhibeerd bij toediening van een minimale concentratie ijzerionen in de kweekbodem voor paddenstoelen. De uitvinders hebben vastgesteld dat deze hoeveelheid de minimale hoeveelheid is om de pathogene, bacteriële groei te controleren in een paddenstoelenkweek. Bij voorkeur
- 5 omvat de kweekbodem een toegediende concentratie ijzerionen van minstens 0,055 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur minstens 0,060 kg ijzerionen per m³, minstens 0,065 kg ijzerionen per m³, minstens 0,070 kg ijzerionen per m³. Deze toegediende minimale hoeveelheden ijzerionen resulteren in een verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor paddenstoelen.
- 10 De kweekbodem omvat volgens het eerste aspect bij voorkeur een toegediende concentratie ijzerionen van hoogstens 5 kg ijzerionen per m³ na externe toediening van de ijzerionen volgens de werkwijze. Deze concentratie is de maximale concentratie om de pathogene, bacteriële groei te controleren in een paddenstoelenkweek. Meer dan 5 kg toegediende ijzerionen per m³ leidt tot nadelige effecten in de
- 15 paddenstoelenkweek, waaronder het optreden van een biologische toxiciteit bij de paddenstoelen, met opbrengst- en/of kwaliteitsvermindering als gevolg. Tevens is deze overmaat aan ijzerionen, een verspilling van grondstoffen, daar deze niet langer optimaal benut kunnen worden in de kweekbodem, en een nodeloze kost. De toegediende concentratie aan ijzerionen in de kweekbodem is bij voorkeur hoogstens
- 20 4,9 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur hoogstens 4,8 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,7 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,6 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,5 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,4 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,3 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,2 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4,1 kg ijzerionen per m³, hoogstens 4 kg per hoogstens m³, hoogstens 3,9 kg ijzerionen per m³, hoogstens
- 25 3,8 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,7 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,6 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,5 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,4 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,3 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,2 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3,1 kg ijzerionen per m³, hoogstens 3 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,9 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,8 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,7 kg ijzerionen per m³,
- 30 hoogstens 2,6 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,5 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,4 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,3 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,2 kg ijzerionen per m³, hoogstens 2,1 kg ijzerionen per m³. Deze maximale concentraties toegevoegde ijzerionen resulteren in een verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor paddenstoelen.
- 35 Bij voorkeur worden ijzerionen toegevoegd aan de kweekbodem dusdanig dat de kweekbodem een toegevoegde hoeveelheid ijzerionen omvat begrepen tussen bovenstaande voorkeuren. Bij voorkeur worden ijzerionen aan de kweekbodem voor

paddenstoelen toegediend, waarbij de concentratie gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 4,9 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend aan genoemde kweekbodem. Bij meer voorkeur is de toegediende concentratie aan genoemde kweekbodem gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 4,8 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur 5 gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 4,7 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 4,6 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 4,5 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,055 kg ijzerionen per m³ en 4,4 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,055 kg ijzerionen per m³ en 4,3 kg ijzerionen 10 per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,055 kg ijzerionen per m³ en 4,2 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,055 kg ijzerionen per m³ en 4,1 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,055 kg ijzerionen per m³ en 4 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,055 kg ijzerionen per m³ en 3,9 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,060 kg ijzerionen per 15 m³ en 3,8 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,060 kg ijzerionen per m³ en 3,7 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,060 kg ijzerionen per m³ en 3,6 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,060 kg ijzerionen per m³ en 3,5 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,060 kg ijzerionen per m³ en 3,4 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur 20 gelegen tussen 0,060 kg ijzerionen per m³ en 3,3 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,065 kg ijzerionen per m³ en 3,2 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,065 kg ijzerionen per m³ en 3,1 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,065 kg ijzerionen per m³ en 3,0 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,065 kg ijzerionen per m³ en 2,9 kg ijzerionen 25 per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,065 kg ijzerionen per m³ en 2,8 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,065 kg ijzerionen per m³ en 2,7 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,070 kg ijzerionen per m³ en 2,6 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,070 kg ijzerionen per m³ en 2,5 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,070 kg ijzerionen 30 per m³ en 2,4 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,070 kg ijzerionen per m³ en 2,3 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,070 kg ijzerionen per m³ en 2,2 kg ijzerionen per m³, meer bij voorkeur gelegen tussen 0,070 kg ijzerionen per m³ en 2,1 kg ijzerionen per m³.

Het toedienen van een dergelijke concentratie ijzerionen aan de kweekbodem resulteert 35 in een controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor paddenstoelen. Symptomen van de ziekte worden in maximaal 50 %, maximaal 45 %, maximaal 40 %, maximaal 35 %, maximaal 30 %, maximaal 25 %, maximaal 20 %

van de paddenstoelen vastgesteld. De werkwijze volgens huidige uitvinding controleert de pathogene, bacteriële groei en resulteert in een kwantitatieve en kwalitatieve paddenstoelenkweek.

Het bepalen van het ijzergehalte van de kweekbodem is gekend door de vakman. De
5 concentratie ijzerionen kan bepaald worden met behulp van een chemisch analytische bepaling, spectrofotometrische bepaling, een titrimetrische bepaling, atomaire-absorptiespectroscopische bepaling of andere. Het ijzergehalte kan voorafgaand het toedienen van de ijzerionen bepaald worden. Het ijzergehalte kan daarnaast ook na het toedienen van de ijzerionen bepaald worden, ter bevestiging van de toegevoegde
10 concentratie ijzerionen aan de kweekbodem.

Volgens een uitvoeringsvorm betreft de uitvinding een werkwijze voor het controleren van een pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, waarbij ijzerionen aan een kweekbodem voor paddenstoelen worden toegediend, waarbij de concentratie gelegen tussen 0,075 kg ijzerionen per m³ en 2 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend
15 aan genoemde kweekbodem.

De kweekbodem omvat bij voorkeur een toegevoegde concentratie ijzerionen van minstens 0,075 kg ijzerionen per m³ en hoogstens 2 kg ijzerionen per m³. Deze toegevoegde concentratie ijzerionen resulteert in een meer verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor paddenstoelen.

20 Meer bij voorkeur omvat de kweekbodem een toegevoegde concentratie ijzerionen van minstens 0,080 kg ijzerionen per m³, nog meer bij voorkeur minstens 0,085 kg ijzerionen per m³, minstens 0,090 kg ijzerionen per m³. Meer bij voorkeur omvat de kweekbodem een toegevoegde concentratie ijzerionen van hoogstens 1,9 kg ijzerionen per m³, nog meer bij voorkeur hoogstens 1,8 kg ijzerionen per m³, hoogstens 1,7 kg
25 ijzerionen per m³, hoogstens 1,6 kg ijzerionen per m³. Deze hoeveelheid ijzerionen resulteert in een nog meer verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor paddenstoelen.

Bij nog meer voorkeur is de toegediende concentratie ijzerionen aan genoemde kweekbodem gelegen tussen 0,075 kg ijzerionen per m³ en 2 kg ijzerionen per m³, bij
30 nog meer voorkeur gelegen tussen 0,075 kg ijzerionen per m³ en 1,95 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,075 kg ijzerionen per m³ en 1,9 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,075 kg ijzerionen per m³ en 1,85 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,080 kg ijzerionen per m³ en 1,8 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,080 kg ijzerionen per m³ en 1,75 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,080 kg ijzerionen per
35 m³ en 1,7 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,080 kg ijzerionen per m³ en 1,65 kg

ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,085 kg ijzerionen per m³ en 1,6 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,090 kg ijzerionen per m³ en 1,55 kg ijzerionen per m³.

Het toedienen van een dergelijke concentratie ijzerionen aan de kweekbodem resulteert in een verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor
5 paddenstoelen. Symptomen van de ziekte worden in maximaal 30 %, maximaal 25 %, maximaal 20 %, maximaal 15 %, maximaal 10 %, maximaal 8 %, maximaal 6 %, maximaal 4 %, maximaal 2 % van de paddenstoelen vastgesteld.

Volgens een voorkeurdragende uitvoeringsvorm betreft de uitvinding een werkwijze voor het controleren van een pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek,
10 waarbij ijzerionen aan een kweekbodem voor paddenstoelen worden toegediend, waarbij een concentratie gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,55 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend aan genoemde kweekbodem.

Meer bij voorkeur omvat de kweekbodem een toegevoegde concentratie ijzerionen van hoogstens 1,55 kg ijzerionen per m³, nog meer bij voorkeur hoogstens 1,5 kg ijzerionen
15 per m³, hoogstens 1,45 kg ijzerionen per m³, hoogstens 1,4 kg ijzerionen per m³, hoogstens 1,35 kg ijzerionen per m³, hoogstens 1,3 kg ijzerionen per m³, hoogstens 1,25 kg ijzerionen per m³.

Bij nog meer voorkeur is de toegediende concentratie ijzerionen aan genoemde kweekbodem gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,5 kg ijzerionen per m³,
20 gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,45 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,4 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,35 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,3 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,25 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,095 kg ijzerionen per m³ en 1,2 kg ijzerionen per m³,
25 m³, gelegen tussen 0,10 kg ijzerionen per m³ en 1,2 kg ijzerionen per m³, gelegen tussen 0,10 kg ijzerionen per m³ en 1,15 kg ijzerionen per m³.

Een geprefereerde uitvoeringsvorm betreft een werkwijze voor het controleren van een pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, waarbij ijzerionen aan een kweekbodem voor paddenstoelen worden toegediend, waarbij een concentratie gelegen
30 tussen 0,10 kg ijzerionen per m³ en 1,15 kg ijzerionen per m³.

Deze toegevoegde hoeveelheden ijzerionen in de kweekbodem resulteren in de beste controle van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem voor paddenstoelen. De symptomen van de ziekte worden in maximaal 5 %, maximaal 4 %, maximaal 3 %, maximaal 2 %, maximaal 1 % van de paddenstoelen vastgesteld of zelfs in geen van
35 de paddenstoelen.

Het controleren van de pathogene, bacteriële groei in de kweekbodem is gekend voor een vakman. Stalen van de kweekbodem kunnen microbiologisch geanalyseerd worden aan de hand van bijvoorbeeld selectiemedia. Deze microbiologische analyse is echter geen identificatie van de pathogeen. Naast genoemde microbiologische analyses, 5 kunnen de kweekbodemstalen ook rechtstreeks microscopisch onderzocht worden, al dan niet voorzien van een specifieke kleuring. Verder kunnen pathogenen ook geanalyseerd worden met behulp van moleculaire technieken, zoals bijvoorbeeld met een polymerase kettingreactie of een sequentie-analyse. Met behulp van de moleculaire technieken kunnen de pathogenen ook geïdentificeerd worden. De aan-of afwezigheid 10 van de pathogeen kan ook gescoord worden aan de hand van een visuele controle, waarbij de symptomen die tot uiting komen bij aanwezigheid van een pathogeen worden gecontroleerd. Deze visuele controle is eenvoudig en doeltreffend, en vereist geen intensieve opleiding. Paddenstoelen worden geteld binnen een bepaalde oppervlakte, en daarvan wordt het aantal paddenstoelen die symptomen van een pathogene, 15 bacteriële infectie vertonen in rekening gebracht. De paddenstoelen worden visueel gecontroleerd en een score toegekend. De score varieert van 0 tot 5, waarbij 'score 0' wordt toegekend indien geen ziekte waarneembaar is en 'score 5' wordt toegekend indien bij meer dan 75 % van de onderzochte paddenstoelen een ziekte waarneembaar is. Bij een 'score 1', 'score 2', en 'score 3' is er respectievelijk bij 0 tot 10 %, 10 tot 20 30 %, en 30 tot 50 % van de onderzochte paddenstoelen een ziekte waarneembaar.

Volgens een uitvoeringsvorm zijn de pathogene bacteriën *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas sp. zijn veelvoorkomende bacteriën die aanwezig zijn in de bodem, het water en de lucht. Van deze soorten zijn er verschillende die pathogeen zijn voor mens, dier, plant en schimmel, zoals gekweekte paddenstoelen *Agaricus bisporus*. 25 Kenmerkend aan deze pathogene *Pseudomonas* sp. is het secreteren van pyoverdine bij ijzerlimiterende condities. Pyoverdine is een geelgroen fluorescente siderofoor. Dit siderofoor heeft een hoge affiniteit voor ijzerionen en bindt deze selectief, waarna deze vervolgens opgenomen kunnen worden door de *Pseudomonas* sp. De ziekteverwekkende *Pseudomonas* sp. hebben bijgevolg een competitief voordeel ten 30 opzichte van de andere bacteriën aanwezig in de kweekbodem. Eenmaal de nutriënten aanwezig in de kweekbodem niet meer voldoende ter beschikking zijn voor de gehele microbiële gemeenschap, ontstaat een dysbiose. Bijgevolg kunnen de ziekteverwekkende *Pseudomonas* sp. de microbiële gemeenschap domineren en de kweek infecteren met geïnfecteerde paddenstoelen als resultante. De infectie wordt 35 geassocieerd met symptomen zoals natte en verzonken laesies op champignonknoppen en -stengels. Afhankelijk van de infecterende *Pseudomonas* sp. hebben de laesies een kleur variërend van geel, oranje, bruin, of groen. Paddenstoelen geïnfecteerd met

Pseudomonas sp. zijn niet langer geschikt voor consumptie en verkoop, met grote verliezen als gevolg. Tevens is de kweekbodem niet meer geschikt om een nieuwe paddenstoelenkweek op te starten en dient de ganse ruimte gedesinfecteerd te worden en een verse, niet geïnfecteerde kweekbodem aangewend te worden, wat extra kosten met zich meebrengt.

Volgens een uitvoeringsvorm zijn de pathogene bacteriën *Pseudomonas tolaasii*.

P. tolaasii is een Gram-negatieve groundbacterie die de klassieke vlekkenziekte, 'brown blotch' genaamd, veroorzaakt in de paddenstoelenkweek, en donkerbruine laesies veroorzaakt op knoppen en stengels van de paddenstoelen, wat de paddenstoelen onverkoopbaar maakt. De donkerbruine laesies ontstaan door de aanwezigheid van tolaasine, een toxine dat wordt geproduceerd door *P. tolaasii*. *P. tolaasii* infectie werd reeds gerapporteerd bij verschillende eetbare paddenstoelen, waaronder *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, en *Pleurotus eryngii*.

Volgens een uitvoeringsvorm zijn de pathogene bacteriën *Pseudomonas gingeri*.

P. gingeri is een Gram-negatieve groundbacterie die een vlekkenziekte, 'ginger blotch' genaamd, veroorzaakt in de paddenstoelenkweek, en oranjebruine laesies veroorzaakt op de paddenstoelen. Ook *P. gingeri* bezit genen die coderen voor het secreteren van eiwitten die de soort een competitief voordeel biedt ten opzichte van de andere gewenste micro-organismen in de kweekbodem, en de kweekbodem kunnen domineren.

De macro- en micronutriënten aanwezig in de kweekbodem worden door de micro-organismen opgenomen en benut voor de groei en instandhouding van het micro-organisme. De kweekbodem wordt volgens huidige uitvinding verder aangerijkt met ijzerionen om de groei van de pathogene, bacteriën te controleren. De microbiële gemeenschap in de kweekbodem blijft zijn hoge diversiteit behouden en wordt niet gedomineerd door één of meerdere pathogene, bacteriën die de kweekbodem overgroeien, het myceliumnetwerk van de paddenstoelen aantasten alsook de vruchtlichamen zelf.

De ijzerionen kunnen toegediend worden aan de kweekbodem door de ijzerionen als een vaste stof in de kweekbodem te mengen. Bij voorkeur worden de ijzerionen homogeen vermengd in de kweekbodem. De ijzerionen kunnen eveneens in een vloeibare samenstelling voorzien worden om vervolgens op een eenvoudige manier de samenstelling te nevelen of te druppelen in de kweekbodem, opdat deze de gewenste hoeveelheid ijzerionen bevat zoals bovenstaand vermeld.

Volgens een uitvoeringsvorm betreft huidige uitvinding een werkwijze voor het controleren van pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, waarbij de ijzerionen worden toegediend middels een poedervorm.

De pathogene, bacteriële groei wordt op een efficiënte manier gecontroleerd door
5 toevoeging van de ijzerionen middels een poedervorm. De poedervorm kan op een eenvoudige manier homogeen in de kweekbodem vermengd worden. De ijzerionen in poedervorm worden opgenomen in de kweekbodem. De paddenstoelenkweek kent hierdoor beduidend minder aangetaste paddenstoelen. Daarnaast heeft de poedervorm als voordeel dat deze gemakkelijk bewaard kan worden in een donkere en droge ruimte.

10 Volgens een uitvoeringsvorm van huidige uitvinding zijn de ijzerionen afkomstig van waterijzer.

Waterijzer of ijzerslib is een reststof die vrijkomt bij de behandeling van grondwater en coagulatie van oppervlaktewater ter winning van leidingwater. Het waterijzer omvat ijzerionen, meer bepaald ijzer(hydr)oxiden. Het waterijzer wordt voorzien in een
15 vloeibare vorm of als vaste vorm. Bij een vaste vorm wordt het ijzerslib bijvoorbeeld gepelletiseerd. Het ijzerslib wordt bij voorkeur gebruikt in de vloeibare vorm in de samenstelling. Het implementeren van een reststof in een paddenstoelenkweek, ter controle van de pathogene, bacteriële groei draagt bij aan de circulaire economie. Ijzerslib is tevens in grote hoeveelheden voorradig wat gunstig is voor de kostprijs.

20 Volgens een voorkeurdragende uitvoeringsvorm betreft de uitvinding een werkwijze voor het controleren van een pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, waarbij de ijzerionen worden toegediend middels een vloeibare samenstelling omvattende 1 tot 8 %m/v ijzerionen.

Bij voorkeur omvat de vloeibare samenstelling minstens 1 % m/v ijzerionen, meer bij
25 voorkeur minstens 1,5 % m/v ijzerionen, minstens 2 % m/v ijzerionen, minstens 2,5 % m/v ijzerionen, minstens 3 % m/v ijzerionen, minstens 3,5 % m/v ijzerionen, minstens 4 % m/v ijzerionen, minstens 4,5 % m/v ijzerionen, minstens 5 % m/v ijzerionen, minstens 5,5 % m/v ijzerionen, minstens 6 % m/v ijzerionen, minstens 6,5 % m/v ijzerionen, minstens 7 % m/v ijzerionen, minstens 7,5 % m/v ijzerionen. De
30 vloeibare samenstelling omvat bij voorkeur hoogstens 8 % m/v ijzerionen, meer bij voorkeur hoogstens 7,5 % m/v ijzerionen, hoogstens 7 % m/v ijzerionen, hoogstens 6,5 % m/v ijzerionen, hoogstens 6 % m/v ijzerionen, hoogstens 5,5 % m/v ijzerionen, hoogstens 5 % m/v ijzerionen, hoogstens 4,5 % m/v ijzerionen, hoogstens 4 % m/v ijzerionen, hoogstens 3,5 % m/v ijzerionen, hoogstens 3 % m/v ijzerionen, hoogstens
35 2,5 % m/v ijzerionen, hoogstens 2 % m/v ijzerionen, hoogstens 1,5 % m/v ijzerionen.

Bij voorkeur omvat de vloeibare samenstelling ijzerionen begrepen tussen 2 en 8 % m/v ijzerionen, begrepen tussen 3 en 8 % m/v, begrepen tussen 4 en 8 % m/v ijzerionen, begrepen tussen 5 en 8 % m/v, begrepen tussen 6 en 8 % m/v, begrepen tussen 7 en 8 % m/v, meer bij voorkeur begrepen tussen 2 en 7 % m/v, begrepen tussen 2 en 5 6 % m/v, begrepen tussen 2 en 5 % m/v, begrepen tussen 2 en 4 % m/v, begrepen tussen 2 en 3 % m/v, begrepen tussen 3 en 5 % m/v, begrepen tussen 4 en 5 % m/v, begrepen tussen 3 en 4 % m/v.

Volgens een voorkeurdragende uitvoeringsvorm betreft de uitvinding een werkwijze voor het controleren van een pathogene, bacteriële groei in een paddenstoelenkweek, 10 waarbij de ijzerionen worden toegediend middels een vloeibare samenstelling met een drogestofgehalte ijzerionen begrepen tussen 4 en 40 %.

Men heeft vastgesteld dat de vloeibare samenstelling, omvattende de ijzerionen volgens huidige uitvinding op een eenvoudige manier verdeeld kan worden in de kweekbodem. De ijzerionen zijn in opgeloste vorm aanwezig in de samenstelling, waardoor deze 15 biologisch beschikbaar zijn voor de micro-organismen aanwezig in de bodem. De concentratie van de ijzerionen in genoemde vloeibare samenstelling bewerkstelligt een efficiënte opname van de nutriënten, de ijzerionen.

Bij voorkeur omvat de vloeibare samenstelling een drogestofgehalte ijzerionen begrepen tussen 4 en 39,6 %, meer bij voorkeur begrepen tussen 4,2 en 39,2 %, tussen 20 4,2 en 38,8 %, tussen 4,4 en 38,4 %, tussen 4,4 en 38 %, tussen 4,6 en 37,6 %, tussen 4,6 en 37,2 %, tussen 4,8 en 36,8 %, tussen 4,8 en 36,4 %, tussen 5 en 36 %, tussen 5 en 35,6 %, tussen 5,2 en 35,2 %, tussen 5,2 en 34,8 %, tussen 5,4 en 34,4 %, tussen 5,4 en 34 %, tussen 5,6 en 33,6 %, tussen 5,8 en 33,2 %, tussen 6 en 32,8 %, tussen 6,2 en 32,4 %, tussen 6,4 en 32 %.

25 Meting van het drogestofgehalte geschiedt met behulp van nauwkeurig omschreven chemische analysemethoden die gekend zijn door de vakman.

Volgens een uitvoeringsvorm omvat genoemde samenstelling verder een chelerend agens.

Niet-limiterende voorbeelden van chelerende agens zijn 2-aminoethylfosfonzuur 30 (EPNA), dimethyl methylfosfonaat (DMMP), 1-hydroxyethylthaan 1,1-difosfonzuur (HEDP), tris(2-methylpyridyl)amine (TMPA), ethyleendiaminetetra (methyleen fosfonzuur) (EDTMP), tetrametileendiaminotetra (methyleen fosfonzuur) (TDTMP), hexametileendiaminotetra (methyleen fosfonzuur) (HDTMP), diethyleentriaminepenta (methyleen fosfonzuur) (DTPMP), ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA), fosfonobutaan 35 tricarbonzuur (PBTC), N-(fosfonomethyl) iminodiazijnzuur (PMIDA), 2-carboxy ethyl

fosfonzuur (CEPA), 2-hydroxy fosfoncarbonzuur (HPCA), amino-tris (methyleen fosfonzuur) (AMP), natrium tripolyfosfaat (STPP), hydroxy ethylethyleen diamine triazijnzuur (HEDTA), dihydroxy ethylethyleen diamine diazijnzuur, diethyleen triamine pentazijnzuur (DTPA), triethyleen tetramine hexaazijnzuur (TTHA), ethyleen diamine di-
5 hydroxyfenyl azijnzuur (EDDHA), ethyleen diamine di-(2-hydroxy-5- sulfofenylacetisch) zuur (EDDHSA), ethyleen diamine di-hydroxy-methylfenylazijnzuur (EDDHMA), ethyleen diamine di-(5-carboxy-2-hydroxyfenyl) zuur (EDDCHA), calciumdinaatrium ethyleen diaminetetraacetaat (CaNa_2EDTA), nitril-tri-azijnzuur (NTA), propyleen-diamine-tetra-azijnzuur (PDTA), polyflavonoïden, sulfonaten, dimercaptobarnsteen-
10 zuur (DMSA), fulvine- en humuszuur, lignosulfonzuur, gluconzuur, aminozuren, polysachariden, polyolen, citroenzuur, tartaarzuur, ascorbinezuur, appelzuur, fumaarzuur, melkzuur of combinaties daarvan.

Het chelerend agens vergroot de biologische beschikbaarheid van de ijzerionen. Hierbij wordt de opname van de ijzerionen door de micro-organismen aanwezig in de
15 kweekbodem vereenvoudigd. Het behoud van een diverse microbiële gemeenschap wordt hierdoor verder bewerkstelligd, waardoor pathogenen niet de overhand kunnen krijgen.

Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm heeft het chelerend agens een concentratie begrepen tussen 2 en 25 % m/v in genoemde samenstelling.

20 De concentratie chelerend agens in de vloeibare samenstelling bevordert het in oplossing houden van de ijzerionen. Bijgevolg is de vloeibare samenstelling eenvoudig te bewaren en dient deze voorafgaand niet geroerd te worden om een homogene samenstelling te verkrijgen. Bij voorkeur is de concentratie begrepen tussen 2 en 24 % m/v in genoemde samenstelling, meer bij voorkeur begrepen tussen 2 en
25 23 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 2 en 22 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 3 en 21 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 3 en 20 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 3 en 19 % m/v, begrepen tussen 3 en 18 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 4 en 18 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 4 en 17 % m/v in genoemde
30 samenstelling, begrepen tussen 5 en 17 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 5 en 16 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 6 en 16 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 6 en 15 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 7 en 15 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 7 en 13 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 8 en 13 % m/v in genoemde
35 samenstelling, begrepen tussen 8 en 12 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 9 en 12 % m/v in genoemde samenstelling, begrepen tussen 9 en 11 % m/v in

genoemde samenstelling. Men heeft vastgesteld dat de vloeibare samenstelling met een dergelijke concentratie chelerend agens weinig tot geen sediment vertoont bij een langdurige bewaring bij een variërende temperatuur. Verder bewerkstelligt dergelijke concentratie chelerend agens de biologische beschikbaarheid van de ijzerionen in de
5 kweekbodem.

Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm is het chelerend agens een polyprotisch zuur, dat ten minste één carbonzuurgroep en optioneel ten minste één aminegroep omvat.

Bij voorkeur omvat het polyprotisch zuur ten minste één carbonzuurgroep en ten minste
10 één aminegroep. Meer bij voorkeur omvat het polyprotisch zuur ten minste twee carbonzuurgroepen en ten minste één aminegroep. Meer bij voorkeur omvat het polyprotisch zuur twee of meerdere carbonzuurgroepen en één of meerdere aminogroepen. Meer bij voorkeur omvat het polyprotisch zuur ten minste drie carbonzuurgroepen en ten minste één aminegroep. Meer bij voorkeur omvat het
15 polyprotisch zuur vier carbonzuurgroepen en ten minste één aminegroep. Meer bij voorkeur omvat het polyprotisch zuur ten minste vier carbonzuurgroepen en twee aminegroepen.

Volgens een meer geprefereerde uitvoeringsvorm is het chelerend agens een aminopolycarbonzuur. Volgens een voorkeursdragende uitvoeringsvorm is het
20 chelerend agens EDTA. Verder kan EDTA ook een zoutafgeleide zijn van EDTA als chelerend agens. Niet-limiterende voorbeelden zijn calcium- en natriumzouten van EDTA, zoals dinatrium EDTA, calciumdinatrium EDTA, of tetranatrium EDTA. Volgens een andere voorkeursdragende uitvoeringsvorm is het chelerend agens EDTS. EDTA, EDTS en hun zoutafgeleiden hebben een antimicrobiële activiteit en het enzymatisch
25 verkleuren van de paddenstoel door schade of aantasting verhindert.

Volgens een uitvoeringsvorm, omvat genoemde samenstelling het chelerend agens en de ijzerionen in een molaire verhouding begrepen tussen 0,2:1 en 5:1 (chelator:ijzer).

Meer bij voorkeur omvat genoemde samenstelling de het chelerend agens en de ijzerionen in een molaire verhouding begrepen tussen 0,21:1 en 4,9:1; nog meer bij
30 voorkeur in een molaire verhouding begrepen tussen 0,22:1 en 4,8:1; begrepen tussen 0,23:1 en 4,7:1; begrepen tussen 0,24:1 en 4,6:1; begrepen tussen 0,25:1 en 4,5:1; begrepen tussen 0,26:1 en 4,4:1; begrepen tussen 0,27:1 en 4,3:1; begrepen tussen 0,28 en 4,2:1; begrepen tussen 0,29:1 en 4,1:1; begrepen tussen 0,3:1 en 4:1; begrepen tussen 0,31:1 en 3,9:1; begrepen tussen 0,32 en 3,8:1; begrepen tussen
35 0,33 en 3,7:1; begrepen tussen 0,34 en 3,6:1; begrepen tussen 0,35 en 3,5:1;

begrepen tussen 0,36 en 3,4:1; begrepen tussen 0,37:1 en 3,3:1; begrepen tussen 0,38:1 en 3,2:1; begrepen tussen 0,39:1 en 3,1:1; begrepen tussen 0,4:1 en 3:1; begrepen tussen 0,41:1 en 2,9:1; begrepen tussen 0,42:1 en 2,8:1; begrepen tussen 0,43:1 en 2,7:1; begrepen tussen 0,44:1 en 2,6:1; begrepen tussen 0,45:1 en 2,5:1;
 5 begrepen tussen 0,46:1 en 2,4:1; begrepen tussen 0,47:1 en 2,3:1; begrepen tussen 0,48:1 en 2,2:1; begrepen tussen 0,49:1 en 2,1:1.

Bovenstaande molaire verhouding chelerend agens en ijzerionen bewerkstelligt een goede controle van de pathogene, bacteriële groei. De visuele ziektesymptomen zijn gereduceerd. De kweek vertoont symptomen van infectie en wordt maximaal score 2
 10 toegekend. De symptomen zijn echter beperkt, daar slechts kleine laesies worden vastgesteld, en te controleren.

Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm, omvat genoemde samenstelling het chelerend agens en de ijzerionen in een molaire verhouding begrepen tussen 0,5:1 en 2:1 (chelator:ijzer).

15 Meer bij voorkeur omvat genoemde samenstelling het chelerend agens en de ijzerionen in een molaire verhouding begrepen tussen 0,52:1 en 1,95:1; meer bij voorkeur begrepen tussen 0,54:1 en 1,9:1; begrepen tussen 0,56:1 en 1,85:1; begrepen tussen 0,58:1 en 1,8:1; begrepen tussen 0,6:1 en 1,75:1, begrepen tussen 0,62:1 en 1,7:1; begrepen tussen 0,64:1 en 1,65:1; begrepen tussen 0,66:1 en 1,6:1; begrepen tussen
 20 0,68:1 en 1,55:1; begrepen tussen 0,7 en 1,5:1; begrepen tussen 0,72:1 en 1,45:1; begrepen tussen 0,74:1 en 1,4:1; begrepen tussen 0,76:1 en 1,35:1 begrepen tussen 0,78:1 en 1,3:1.

Bovenstaande molaire verhouding chelerend agens en ijzerionen bewerkstelligt een betere controle van de pathogene, bacteriële groei. De ziektesymptomen zijn meer gereduceerd. De kweek vertoont symptomen van infectie, maar kent een maximale
 25 score 1. Minimale symptomen worden vastgesteld en de infectie te controleren door de beschadigde paddenstoelen te verwijderen. Verder is bij een dergelijke molaire verhouding de biologische diversiteit van de kweekbodem goed.

Meest bij voorkeur omvat genoemde samenstelling het chelerend agens en de ijzerionen
 30 in een molaire verhouding begrepen tussen 0,8:1 en 1,25:1 (chelator:ijzer).

Bovenstaande molaire verhouding chelerend agens en ijzerionen, alsook alle daartussen liggende verhoudingen bewerkstelligen een verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei. De ziektesymptomen worden sporadisch vastgesteld of zijn zelfs afwezig, een score 0 is hier van toepassing. Verder is bij een dergelijke molaire
 35 verhouding de biologische diversiteit van de kweekbodem optimaal.

Volgens een uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens huidige uitvinding wordt de samenstelling toegediend aan de kweekbodem, dusdanig dat de kweekbodem minstens 1 liter per m³ en hoogstens 25 liter per m³ van genoemde samenstelling omvat.

Men heeft vastgesteld dat de dosering van genoemde samenstelling in de kweekbodem
5 begrepen is tussen 1 en 25 liter per m³ de groei van de pathogene bacteriën controleert. Bij een dosering hoger dan 25 liter per m³ wordt een biologische toxiciteit vastgesteld bij de paddenstoelen, die de kwaliteit van de paddenstoelen negatief beïnvloedt met een verminderde opbrengst tot gevolg. Tevens is bij een hogere dosering van de vloeibare samenstelling de kweekbodem ook te vochtig, wat de vorming van de
10 vruchtlichamen van de paddenstoelen bemoeilijkt. Bij voorkeur omvat genoemde samenstelling hoogstens 24,5 liter per m³, meer bij voorkeur hoogstens 24 liter per m³, hoogstens 23,5 liter per m³, hoogstens 23 liter per m³, hoogstens 22,5 liter per m³, hoogstens 22 liter per m³, hoogstens 21,5 liter per m³, hoogstens 21 liter per m³, hoogstens 20,5 liter per m³, hoogstens 19,5 liter per m³, hoogstens 19 liter per m³,
15 hoogstens 18,5 liter per m³, hoogstens 18 liter per m³, hoogstens 17,5 liter per m³, hoogstens 17 liter per m³, hoogstens 16,5 liter per m³, hoogstens 16 liter per m³, hoogstens 15,5 liter per m³, hoogstens 15 liter per m³.

Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens huidige uitvinding wordt de samenstelling toegediend aan de kweekbodem, dusdanig dat de kweekbodem
20 minstens 2 liter per m³ en hoogstens 15 liter per m³ van genoemde samenstelling omvat.

Men heeft vastgesteld dat de dosering van genoemde samenstelling in de kweekbodem begrepen tussen 2 en 15 liter per m³ de groei van de pathogene bacteriën controleert, zonder biologisch toxische effecten. Bij voorkeur omvat genoemde samenstelling
25 hoogstens 14,5 liter per m³, hoogstens 14 liter per m³, hoogstens 13,5 liter per m³, hoogstens 13 liter per m³, hoogstens 12,5 liter per m³, hoogstens 12 liter per m³, hoogstens 11,5 liter per m³, hoogstens 11 liter per m³, hoogstens 10,5 liter per m³, hoogstens 10 liter per m³. Bij voorkeur omvat genoemde samenstelling minstens 1,5 liter per m³, meer bij voorkeur omvat genoemde samenstelling minstens 2 liter per
30 m³, minstens 2,5 liter per m³, minstens 3 liter per m³, minstens 3,5 liter per m³, minstens 4 liter per m³.

Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens huidige uitvinding wordt de samenstelling toegediend aan de kweekbodem, dusdanig dat de kweekbodem minstens 4 liter per m³ en hoogstens 10 liter per m³ van genoemde samenstelling
35 omvat.

Men heeft vastgesteld dat de dosering volgens huidige uitvoeringsvorm de pathogene, bacteriële groei het beste controleert. Deze dosering wordt eenmalig aangebracht en controleert de pathogene, bacteriële groei doorheen de volledige cyclus van de paddenstoelenkweek.

- 5 Volgens een uitvoeringsvorm van de werkwijze worden de ijzerionen eenmalig toegediend aan de kweekbodem voor paddenstoelen. Bij voorkeur worden de ijzerionen toegediend bij aanvang van de paddenstoelenkweek. Bijgevolg wordt de groei van pathogene bacteriën gecontroleerd, daar een oorspronkelijke, stabiele microbiële gemeenschap wordt bekomen en behouden.
- 10 Volgens een uitvoeringvorm van de werkwijze volgens huidige uitvinding, omvat de kweekbodem voor paddenstoelen een substraatlaag en een deklaag, waarbij de ijzerionen worden toegediend aan de deklaag. De ijzerionen worden toegediend aan de deklaag, waarbij de toegediende concentratie ijzerionen aan de deklaag gelegen is tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 5 kg ijzerionen per m³. Verdere uitvoeringsvormen
- 15 of voorkeuren van de concentratie ijzerionen toegevoegd aan de deklaag na externe toediening van de ijzerionen zijn bovenstaand vermeld met betrekking tot de kweekbodem en zijn ook van toepassing op de deklaag.

- Volgens een verder geprefereerde uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens huidige uitvinding, wordt de samenstelling toegevoegd aan de deklaag. De samenstelling
- 20 volgens huidige uitvinding wordt toegediend aan de deklaag tot de toegevoegde concentratie ijzerionen aan de deklaag gelegen is tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 5 kg ijzerionen per m³. Bij voorkeur wordt een hoeveelheid begrepen tussen 1 liter per m³ en 25 liter per m³ van de samenstelling volgens huidige uitvinding toegediend aan de deklaag. Verdere uitvoeringsvormen of voorkeuren van de samenstelling in de
- 25 deklaag zijn bovenstaand vermeld met betrekking tot de kweekbodem en zijn ook van toepassing op de deklaag.

- Men heeft vastgesteld dat het toedienen van ijzerionen of de samenstelling aan de deklaag volgens huidige uitvinding resulteert in een verbeterde controle van de pathogene, bacteriële groei. Het aanrijken van de deklaag met ijzerionen, door
- 30 toediening van ijzerionen of de samenstelling volgens onderhavige uitvinding bewerkstelligt een microbiële gemeenschap met een diversiteit die de stabiliteit van de microbiële gemeenschap verder verbetert met als resultaat een kwantitatieve en kwalitatieve paddenstoelenkweek.

- Het ijzergehalte kan ook van de deklaag bepaald worden aan de hand van de
- 35 verschillende bovenstaand vermelde meettechnieken en gekend door de vakman.

Volgens een meer geprefereerde uitvoeringsvorm van de werkwijze van onderhavige uitvinding, worden de ijzerionen of de samenstelling toegediend aan de deklaag en de deklaag gedurende een periode begrepen tussen 2 en 10 dagen gestockeerd om vervolgens op de substraatlaag, die het broed van de te kweken paddenstoelen omvat, 5
aangebracht te worden. Men heeft vastgesteld dat de microbiële gemeenschap tijdens de periode begrepen tussen 2 en 10 dagen in balans is en de pathogene, bacteriële groei effectief controleert. Bij voorkeur is de periode begrepen tussen 3 en 9 dagen, meer bij voorkeur begrepen tussen 3 en 8 dagen, meer bij voorkeur begrepen tussen 4 en 8 dagen, meer bij voorkeur begrepen tussen 4 en 7 dagen, meer bij voorkeur 10
begrepen tussen 5 en 7 dagen.

In een tweede aspect betreft de uitvinding een samenstelling voor gebruik in een paddenstoelenkweek. In een derde aspect betreft de uitvinding een kweekbodem voor gebruik in een paddenstoelenkweek. In een laatste aspect betreft de uitvinding het gebruik van de samenstelling en de kweekbodem van onderhavige uitvinding voor het 15
controleren van de pathogene, bacteriële groei in de paddenstoelenkweek, waarbij bij voorkeur de pathogenen *Pseudomonas* sp. zijn. Verder is het gebruik van de samenstelling en de kweekbodem van onderhavige uitvinding ook voor het preventief behandelen van pathogene, bacteriële groei in de paddenstoelenkweek.

Een vakman zal appreciëren dat de samenstelling volgens huidige uitvinding kan worden 20
geïmplementeerd volgens de werkwijze in huidige uitvinding. Ook de kweekbodem, omvattende de samenstelling, volgens huidige uitvinding kan worden geïmplementeerd ter controle van de pathogene, bacteriële groei. Bovendien kan elk kenmerk hierboven en hieronder beschreven betrekking hebben op elk van de aspecten, zelfs wanneer het kenmerk in conjunctie met één bepaald aspect wordt beschreven.

25 De samenstelling voor gebruik in een paddenstoelenkweek volgens huidige uitvinding, omvat ijzerionen bij een concentratie gelegen tussen 1 en 8 % m/v. De samenstelling is bij voorkeur een vloeibare samenstelling. Volgens een uitvoeringsvorm van de samenstelling van onderhavige uitvinding, omvat de samenstelling verder een chelerend agens. Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm van de samenstelling van huidige 30
uitvinding, omvat de samenstelling chelerend agens bij een concentratie gelegen tussen 2 en 25 % m/v. Het chelerend agens is bij voorkeur een polyprotisch zuur, omvattende ten minste één carbonzuurgroep en optioneel ten minste één aminegroep. Het chelerend agens is bij meer voorkeur een aminopolycarbonzuur. Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm van de samenstelling, is het chelerend agens EDTA. Volgens een ander 35
geprefereerde uitvoeringsvorm van de samenstelling, is het chelerend agens EDTS. Volgens een geprefereerde uitvoeringsvorm van de samenstelling van huidige uitvinding

omvat de samenstelling chelerend agens en ijzerionen in een molaire verhouding begrepen tussen 0,2:1 en 5:1 (chelator:ijzer), meer bij voorkeur begrepen tussen 0,5:1 en 2:1, meest bij voorkeur begrepen tussen 0,8:1 en 1,25:1.

De kweekbodem voor gebruik in een paddenstoelenkweek volgens huidige uitvinding, 5 omvat de samenstelling volgens huidige uitvinding, waarbij de kweekbodem een concentratie toegevoegde ijzerionen van minstens 0,050 kg ijzerionen per m³ en hoogstens 5 kg ijzerionen per m³ omvat.

Bij voorkeur omvat de deklaag van de kweekbodem voor gebruik in een paddenstoelenkweek, de samenstelling volgens huidige uitvinding, waarbij de deklaag 10 een concentratie toegevoegde ijzerionen van minstens 0,050 kg ijzerionen per m³ en hoogstens 5 kg ijzerionen per m³ omvat. De samenstelling volgens huidige uitvinding wordt toegediend aan de deklaag tot de deklaag een toegevoegde concentratie ijzerionen heeft gelegen tussen 0,050 kg ijzerionen per m³ en 5 kg ijzerionen per m³. Bij voorkeur wordt een hoeveelheid begrepen tussen 1 liter per m³ en 25 liter per m³ 15 van de samenstelling volgens huidige uitvinding toegediend aan de deklaag. Verdere uitvoeringsvormen of voorkeuren van de samenstelling in de deklaag zijn bovenstaand vermeld met betrekking tot de kweekbodem en zijn ook van toepassing op de deklaag.

Het laatste aspect betreft het gebruik van de samenstelling volgens onderhavige uitvinding of de kweekbodem volgens onderhavige uitvinding, voor het controleren van 20 pathogene, bacteriële groei in de paddenstoelenkweek.

Volgens een uitvoeringsvorm van huidig aspect zijn de pathogenen *Pseudomonas* sp.

Het gebruik van de samenstelling of kweekbodem volgens onderhavige uitvinding, resulteert in een kwalitatieve en kwantitatieve paddenstoelenkweek. De groei van de pathogene bacteriën is gecontroleerd. De toegediende ijzerionen bewerkstelligen een 25 heterogene microbiële populatie in de kweekbodem waarin de paddenstoelen worden gekweekt, en belemmeren hierbij de overgroei van pathogene *Pseudomonas* sp., zoals bijvoorbeeld *P. tolaasii*, *P. gingeri* of equivalenten. De toegediende ijzerionen bewerkstelligen zelfs een herstel van de microbiële populatie, indien deze aangetast zou zijn door overgroei van pathogene *Pseudomonas* sp.

30 Het laatste aspect betreft ook gebruik van de samenstelling volgens onderhavige uitvinding of de kweekbodem volgens onderhavige uitvinding, voor het preventief behandelen van pathogene, bacteriële groei in de paddenstoelenkweek.

Volgens een uitvoeringsvorm van huidig aspect zijn de pathogenen *Pseudomonas* sp.

De pathogene, bacteriële groei wordt volgens huidige uitvinding zowel preventief als therapeutische gecontroleerd om het succes en de opbrengst van de paddenstoelenkweek te verzekeren.

In wat volgt, wordt de uitvinding beschreven a.d.h.v. niet-limiterende voorbeelden die de uitvinding illustreren, en die niet bedoeld zijn of geïnterpreteerd mogen worden om de omvang van de uitvinding te limiteren.

VOORBEELDEN

VOORBEELD 1:

Een kweekbodem gecontamineerd met *Pseudomonas gingeri* wordt behandeld met een samenstelling om de groei van *P. gingeri* te controleren, en de symptomen van de 'ginger blotch' ziekte op de paddenstoelen te inhiberen.

Het experiment wordt uitgevoerd op tien gerandomiseerde testplots per behandeling met een oppervlakte van 1,5 m bij 1 m.

De testplots worden voorzien van een substraatlaag, omvattende een *Agaricus bisporus* myceliumnetwerk, en een *P. gingeri* gecontamineerde deklaag, waarbij genoemde deklaag is voorzien van de samenstelling omvattende een concentratie van ongeveer 3 % m/v ijzerionen. De molaire verhouding chelerend agens en ijzerionen is 0,8:1 (chelator:ijzer), met 40 % EDTA als chelerend agens. Verschillende doseringen werden toegevoegd per plot, zoals toegelicht in tabel 1. De testplots met behandeling 1 zijn de controleplots. De behandelde deklagen werden voorafgaand het aanbrengen op de substraatlaag eerst 7 dagen te ruste gelegd. Eenmaal de deklaag bovenop de substraatlaag wordt voorzien, worden de symptomen de daaropvolgende drie dagen visueel waargenomen en gescoord. De score varieert van 0 tot 5, waarbij 'score 0' wordt toegekend indien geen ziekte waarneembaar is en 'score 5' wordt toegekend indien bij meer dan 75 % van de onderzochte paddenstoelen een ziekte waarneembaar is. Bij een 'score 1', 'score 2', en 'score 3' is er respectievelijk bij 0 tot 10 %, 10 tot 30 %, en 30 tot 50 % van de onderzochte paddenstoelen een ziekte waarneembaar.

Tabel 1: Overzicht van de verschillende doseringen en ziekte waarnemingen

Analyse	Dosering (liter per m ³)	Dag 1	Dag 2	Dag 3
1	0	3,1	4,1	4,1
2	5	1	2,2	1,9
3	10	1,4	2,8	2,5
4	20	1,9	2,7	2,8

Testplots waarbij doseringen hoger dan 25 liter per m³ worden toegediend vertonen in minstens 80% van de plots kale plekken, wat wijst fytoxiciteit van de samenstelling bij een dergelijke dosering. Ook bij doseringen vanaf 20 liter per m³ werden dergelijke kale plekken waargenomen in de testplots, echter bij een verminderd aantal. Bij 5 doseringen minder dan 20 liter per m³, werden geen tekenen van fytoxiciteit meer vastgesteld.

Gelijkaardige waarnemingen werden vastgesteld bij een molaire verhouding chelerend agens en ijzerionen 1,25:1 (chelator:ijzer).

VOORBEELD 2:

- 10 Voorbeeld 2 onderzoekt het belang van de rusttijd na het behandelen van de deklaag. Eenzelfde experimentele opzet zoals voorbeeld 1 wordt uitgevoerd. De deklaag van elk testplot wordt voorzien van 20 liter per m³ van de samenstelling. De deklaag wordt na toediening van de samenstelling 2, 4, 6, of 8 dagen te ruste gelegd voorafgaand deze wordt aangebracht bovenop de substraatlaag. De pathogene bacteriële groei werd 15 visueel waargenomen en gescoord zoals toegelicht in voorbeeld 1. Op de derde dag werd ook de opbrengst van de testplots geteld. De opbrengst van de testplots per analyse worden in de laatste kolom van tabel 2 weergegeven. Testplot heeft eenzelfde grootte zoals toegelicht in voorbeeld 1.

20 Tabel 2: Overzicht van de verschillende rusttijden, de ziekte waarnemingen en de opbrengst

Analyse	Rusttijd	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Opbrengst
1	2	1,2	1,6	1,8	25
2	4	1,1	1,5	1,7	32
3	6	1	2,2	1,9	68
4	8	1,9	2,7	2,8	73
5	10	1,7	2,5	2,4	71

Uit bovenstaande analyse blijkt dat een langere rusttijd niet resulteert in een betere controle van de pathogene groei van *P. gingeri*.

- 25 Verder blijkt uit bovenstaande analyse dat een langere rusttijd voordelig is voor de opbrengst van paddenstoelen. Een rusttijd langer dan 8 dagen of 10 dagen brengt slechts een minimaal verbeterd effect met zich mee. Langere rusttijden zijn bijgevolg niet aangewezen om een hogere opbrengst te bewerkstelligen. Een rusttijd begrepen tussen 5 en 7 dagen is voordelig voor een verhoogde opbrengst.

VOORBEELD 3:

Teeltcellen voor van *Agaricus bisporus* worden voorzien van een kweekbodem volgens huidige uitvinding. De substraatlaag voorzien van *A. bisporus* broed is afgedekt met een deklaag. De deklaag is voorzien van verschillende hoeveelheden ijzerionen en de groei van pathogene bacteriën wordt visueel gescoord, zoals toegelicht in voorbeeld 1.

5 Tabel 3: Overzicht van verschillende hoeveelheden ijzerionen in de deklaag en ziekte waarnemingen

Analyse	Min. hoeveelheid ijzerionen (kg per m ³)	Max. hoeveelheid ijzerionen (kg per m ³)	Dag 1	Dag 2	Dag 3
1	5	8	4,1	4,3	4,9
2	5	7	3,1	3,5	3,3
3	5	6	2,	2,9	3,2
4	0,050	5	1,9	2,7	2,8
5	0,050	4,7	1,9	2,5	2,4
6	0,055	4,2	1,8	2,6	2,4
7	0,055	3,9	1,9	2,7	2,2
8	0,06	3,6	1,7	2,4	2,2
9	0,060	3,3	1,7	2,5	2,3
10	0,065	2,9	1,5	1,9	2,1
11	0,070	2,4	1,6	1,9	2,0
12	0,075	2,0	1,4	1,8	1,7
13	0,080	1,80	1,3	1,5	1,4
14	0,085	1,60	1,2	1,3	1,2
15	0,090	1,55	1,0	0,8	1,1
16	0,095	1,55	0,6	0,9	1,0
17	0,100	1,50	0,6	0,8	0,9

Volgens de resultaten weergegeven in Tabel 3, blijkt dat een hoeveelheid hoger dan 5 kg per m³ in de deklaag, leidt tot een verlaagde controle van de pathogene, bacteriële groei. Een te hoge concentratie ijzerionen aanwezig in de deklaag, kan leiden tot biologische toxiciteit. Bijgevolg is er een verstoring in het milieu en kan de pathogeen de kweek overgroeien. Hoeveelheden ijzerionen begrepen tussen 0,050 en 5 kg per m³ in de deklaag resulteren in een betere controle van de pathogene, bacteriële groei. Een score lager dan 3 werd toegekend aan deze analyses. Bij lagere hoeveelheden ijzerionen, begrepen tussen 0,075 en 2 kg per m³ is de score zelfs lager dan 2. Analyse 16 en 17 resulteren in de beste score, daar weinig of geen ziekte waarneembaar is.

Het is verondersteld dat de huidige uitvinding niet beperkt is tot de uitvoeringsvormen die hierboven beschreven zijn en dat enkele aanpassingen of veranderingen aan de

beschreven voorbeelden kunnen toegevoegd worden zonder de toegevoegde conclusies te herwaardenen.

CONCLUSIES

1. Een werkwijze voor het controleren van pathogene, *Pseudomonas* sp. in een paddenstoelenkweek, **met het kenmerk, dat** ijzerionen aan een kweekbodem voor paddenstoelen worden toegediend, waarbij een concentratie gelegen tussen
5 0,050 kg ijzerionen per m³ en 5 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend aan genoemde kweekbodem.
2. De werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk, dat** de concentratie gelegen tussen 0,075 kg ijzerionen per m³ en 2 kg ijzerionen per m³ wordt toegediend aan genoemde kweekbodem.
- 10 3. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 1-2, **met het kenmerk, dat** de ijzerionen worden toegediend middels een poedervorm.
4. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 1-2, **met het kenmerk, dat** de ijzerionen worden toegediend middels een vloeibare samenstelling omvattende 1 tot 8 % m/v ijzerionen.
- 15 5. De werkwijze volgens conclusie 4, **met het kenmerk, dat** genoemde samenstelling verder een chelerend agens omvat.
6. De werkwijze volgens conclusie 4 of 5, **met het kenmerk, dat** het chelerend agens een concentratie heeft begrepen tussen 2 en 25 % m/v in genoemde samenstelling.
7. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 4-6, **met het kenmerk, dat**
20 genoemde samenstelling het chelerend agens en de ijzerionen in een molaire verhouding begrepen tussen 0,2:1 en 5:1 (chelator/ijzer) omvat.
8. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 4-7, **met het kenmerk, dat** het chelerende agens een polyprotisch zuur is omvattende ten minste één carbonzuurgroep en optioneel ten minste één aminegroep.
- 25 9. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 4-8, **met het kenmerk, dat** genoemde samenstelling wordt toegediend aan de kweekbodem, dusdanig dat de kweekbodem minstens 1 liter per m³ en hoogstens 25 liter per m³ van genoemde samenstelling omvat.
10. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 1-9, **met het kenmerk, dat**
30 de ijzerionen afkomstig zijn van ijzerslib.

11. De werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 1-10, **met het kenmerk**, dat de kweekbodem voor paddenstoelen, een substraatlaag en een deklaag omvat, waarbij de samenstelling wordt toegediend aan de deklaag.
12. Een kweekbodem voor gebruik in een paddenstoelenkweek omvattende een substraatlaag en een deklaag, **met het kenmerk, dat** de deklaag een samenstelling met tussen 1 en 8 % m/v ijzerionen omvat en waarbij de kweekbodem een concentratie toegevoegde ijzerionen van minstens 0,050 kg ijzerionen per m³ en hoogstens 5 kg ijzerionen per m³ omvat.
13. Het gebruik van een samenstelling omvattende ijzerionen bij een concentratie gelegen tussen 1 en 8% m/v ijzerionen of de kweekbodem volgens conclusie 12, voor het controleren van *Pseudomonas* sp. groei in de paddenstoelenkweek.
14. Het gebruik van een samenstelling omvattende ijzerionen bij een concentratie gelegen tussen 1 en 8% m/v ijzerionen of de kweekbodem volgens conclusie 12, voor het preventief behandelen van *Pseudomonas* sp. groei in de paddenstoelenkweek.

Item I

De aanvraag betreft een werkwijze voor het controleren van bacteriële infecties bij paddenstoelen (conclusies 1-12); een samenstelling voor gebruik bij de kweek van paddenstoelen (conclusies 13-15); een kweekmedium (conclusie 16); het gebruik van de samenstelling of het kweekmedium voor het controleren of voorkomen van pathogene bacteriën (conclusies 17-19).

Item V

Er wordt verwezen naar de volgende documenten:

- D1 Abram A Steiner ET AL: "Recipe for Ferric Salts of Ethylenediaminetetraacetic Acid Received for publication July 15, 1969", Plant Physiol, 1 januari 1970 (01-01-1970), bladzijden 862-863, XP055737303,
- D2 SANDRA M. ALMEIDA ET AL: "Iron bioaccumulation in mycelium of Pleurotus ostreatus", BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, deel 46, nr. 1, 1 mei 2015 (01-05-2015), bladzijden 195-200, XP055737347, DOI: 10.1590/S1517-838246120130695
- D3 EP 0 210 734 A1 (BURNS PHILIP & CO LTD [AU]; MINI AGRICULT NEW SOUT WALES [AU]) 4 februari 1987 (04-02-1987) in de aanvraag genoemd
- D4 WO 2013/034939 A2 (SZEGEDI TUDOMANYEGYETEM [HU]; MANCZINGER LASZLO [HU] ET AL.) 14 maart 2013 (14-03-2013)

Nieuwheid

Met betrekking tot de conclusies betreffende de samenstelling: ijzerchelaatcomplexen worden gewoonlijk gebruikt als meststof en aas voor naaktslakken en er is een groot aantal documenten waarin samenstellingen volgens de conclusies 13-15 geopenbaard worden. In D1, bijvoorbeeld, wordt een samenstelling omvattende EDTA (26,1 gram, 0,09 mol; ongeveer 8% w/v) opgelost in 268 ml 1,0 N KOH en 24,9 gram (overeenkomend met 5 g ijzerionen of 0,09 mol; ongeveer 1,8% m/v en een molaire verhouding ijzer:chelaat van ongeveer 1:1; zie D1, bladzijde 862, linker kolom, derde alinea). De oplossing wordt vervolgens verdund tot één liter. Voordat de samenstelling

wordt verdund, is de materie volgens de conclusies 13-15 niet nieuw vanwege deze samenstelling.

Met betrekking tot het kweekmedium wordt in D2 een kweekmedium beschreven waarvan bewezen is dat het nuttig is bij het kweken van paddenstoelen (*Pleurotus ostreatus*), waarbij deze kweek 0,05 en 0,150 kg/m³ ijzerionen (D2, tabel 1) en tot 0,300 kg/m³ bevat (D2, bladzijde 198, figuur 2). Deze openbaring anticipeert de materie volgens conclusie 16.

In geen van de gevonden documenten wordt het gebruik van ijzerionen voor het controleren van bacteriën in een kweek van paddenstoelen geopenbaard. Derhalve wordt de materie volgens de conclusies 1-12 en 17-19 geacht niet nieuw te zijn.

Inventiviteit en ontoreikendheid van openbaring

De meest nabijgelegen stand van de techniek zou hetzij D3 of D4 kunnen zijn, welke het gebruik betreffen van bepaalde *Pseudomonas*-ketens die pathogene *Pseudomonas*-ketens in paddenstoelen controleren (D3, conclusies 1-6; D4, conclusies 1-9).

Het verschil tussen de materie volgens conclusie 1 en die volgens de stand van de techniek is het gebruik van ijzer voor het controleren van pathogene bacteriën bij de kweek van paddenstoelen. Het gevolg van dit verschil is niet aangetoond. Het op te lossen objectieve technische probleem is het voorzien van een alternatieve werkwijze voor de controle van pathogene bacteriën bij paddenstoelen.

Er is geen aanwijzing in de stand van de techniek met betrekking tot het gebruik van ijzerionen bij een bepaalde concentratie in het kweekmedium voor het controleren van pathogene bacteriële groei bij de kweek van paddenstoelen. De oplossing vertegenwoordigt een niet voor de hand liggende oplossing ten opzichte van die volgens de stand van de techniek.

De conclusies van de aanvrager betreffen echter een algemene werkwijze voor het controleren van pathogene bacteriële groei bij de kweek van paddenstoelen, terwijl er slechts gegevens zijn voor één specifieke soort bacteriën, namelijk *Pseudomonas gingeri*. Gelet op het ontbreken van gegevens betreffende andere soorten bacteriën of zelfs andere soorten *Pseudomonas*, is het niet duidelijk welke andere soorten pathogene bacteriën bij paddenstoelen gecontroleerd kunnen worden door het gebruik van ijzerionen, waarvoor een bezwaar aangaande ontoreikendheid van openbaring moet worden gemaakt.

Aangezien de bijdrage aan de stand van de techniek het gebruik van ijzerionen voor het controleren van *Pseudomonas gingeri* - die een vlek op paddenstoelen veroorzaakt -

lijkt te zijn, lijkt het passend om de werkwijze volgens de conclusies te beperken tot een werkwijze die overeenkomt met deze bijdrage.

SAMENWERKINGSVERDRAG INZAKE OCTROOIEN

VERSLAG BETREFFENDE HET ONDERZOEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE OPGESTELD KRACHTENS ARTIKEL XI.23., §10 VAN HET BELGISCH WETBOEK VAN ECONOMISCH RECHT

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF GEMACHTIGDE AVEC-006-BE
Belgische nationale aanvraag nr. 202005149	Datum van indiening 05-03-2020
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) AVECOM nv	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type 28-03-2020	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN75856
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale octrooiclassificatie (CIB), of tezelfdertijd volgens de nationale classificatie en de CIB Zie onderzoeksrapport	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
IPC	Zie onderzoeksrapport
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. ☐	MEN IS VAN OORDEEL DAT BEPAALDE CONCLUSIES NIET HET ONDERWERP KONDEN UITMAKEN VAN EEN ONDERZOEK (opmerkingen op aanvullingsblad)
IV. ☐	GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING EN/OF VASTSTELLING BETREFFENDE DE OMVANG VAN HET ONDERZOEK (opmerkingen op aanvullingsblad)

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 202005149

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. A01N59/16 A01P15/00
ADD.

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
A01N

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	Abram A Steiner ET AL: "Recipe for Ferric Salts of Ethylenediaminetetraacetic Acid Received for publication July 15, 1969", Plant Physiol, 1 januari 1970 (1970-01-01), bladzijden 862-863, XP055737303, Gevonden op het Internet: URL:https://core.ac.uk/download/pdf/193827053.pdf * bladzijde 862, linker kolom, alinea 3 * ----- -/--	13-15

☒ Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

☒ Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

"A" niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

"D" in de octrooiaanvraag vermeld

"E" eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

"L" om andere redenen vermelde literatuur

"O" niet-schriftelijke stand van de techniek

"P" tussen de voorrangsdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

"T" na de indieningsdatum of de voorrangsdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

"X" de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

"Y" de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

"&" lid van dezelfde octrooifamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

8 oktober 2020

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Davies, Maxwell

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 202005149

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTTE DOCUMENTEN		
Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	SANDRA M. ALMEIDA ET AL: "Iron bioaccumulation in mycelium of Pleurotus ostreatus", BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, deel 46, nr. 1, 1 mei 2015 (2015-05-01), bladzijden 195-200, XP055737347, DOI: 10.1590/S1517-838246120130695 * bladzijde 197; tabel 1 * * bladzijde 198; figuur 2 *	16
A,D	----- EP 0 210 734 A1 (BURNS PHILIP & CO LTD [AU]; MINI AGRICULT NEW SOUT WALES [AU]) 4 februari 1987 (1987-02-04) in de aanvraag genoemd * conclusies 1-6 *	1-19
A	----- WO 2013/034939 A2 (SZEGEDI TUDOMANYEGYETEM [HU]; MANCZINGER LASZLO [HU] ET AL.) 14 maart 2013 (2013-03-14) * conclusies 1-9 *	1-19

ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 202005149

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
EP 0210734	A1	04-02-1987	GEEN
WO 2013034939	A2	14-03-2013	EP 2753182 A2 16-07-2014
			PL 2753182 T3 29-04-2016
			US 2014377239 A1 25-12-2014
			WO 2013034939 A2 14-03-2013



SCHRIFTELIJKE OPINIE

Dossier Nummer SN75856	Indieningsdatum (dag/maand/jaar) 05.03.2020	Vorrangsdatum (dag/maand/jaar)	Aanvraagnummer BE202005149
Classificatie (IPC) INV. A01N59/16 A01P15/00			
Aanvrager AVECOM nv			

Deze schriftelijke opinie bevat een toelichting en de corresponderende pagina's met betrekking tot de volgende onderdelen:

- ☒ Onderdeel I Basis van schriftelijke opinie
- ☐ Onderdeel II Voorrang
- ☐ Onderdeel III Formulering van een opinie inzake nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid niet mogelijk
- ☐ Onderdeel IV De aanvraag heeft betrekking op meer dan één uitvinding
- ☒ Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring
- ☐ Onderdeel VI Bepaalde geciteerde documenten
- ☐ Onderdeel VII Gebreken in de aanvraag
- ☐ Onderdeel VIII Opmerkingen betreffende de aanvraag

Form BE237A (Dekblad) (Januari 2007)	De Examiner Davies, Maxwell
--------------------------------------	--------------------------------

Onderdeel I Basis van de opinie

1. Deze opinie is opgesteld op basis van de conclusies ingediend voor aanvang van het onderzoek.
2. Met betrekking tot **nucleotide en/of aminozuur sequenties** die, in voorkomend geval, genoemd worden in de aanvraag, is deze opinie opgesteld op basis van de volgende elementen:
 - a. Aard van het element:
 - ☐ een lijst van de sequentie(s)
 - ☐ tabel(len) met betrekking tot de lijst van de sequentie(s)
 - b. Type drager:
 - ☐ op papier
 - ☐ in elektronische vorm
 - c. Moment van indiening of levering:
 - ☐ opgenomen in de aanvraag zoals ingediend
 - ☐ samen met de aanvraag elektronisch ingediend
 - ☐ later geleverd
3. ☐ Bovendien, wanneer er mer dan één versie of kopie van een sequentielijst of van één of meerdere tabellen die er betrekking op hebben, werd ingediend, zijn de benodigde verklaringen ingediend, dat de informatie, die later of bij wijze van aanvullende kopieën werd geleverd naar gelang het geval, identiek is aan diegene die oorspronkelijk werd geleverd en niet verder gaat dan de openbaarmaking in de internationale aanvraag zoals oorspronkelijk ingediend.
4. Aanvullende opmerkingen:

Zie apart blad

Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring

1. Verklaring

Nieuwheid	Ja: Conclusies 1-12, 17-19 Nee: Conclusies 13-16
Inventiviteit	Ja: Conclusies 1-12, 17-19 Nee: Conclusies 13-16
Industriële toepasbaarheid	Ja: Conclusies 1-19 Nee: Conclusies

2. Citaten en explicaties:

Zie apart blad

Item I

The application concerns a method for controlling bacterial infections in mushrooms (claims 1-12); a composition for use in mushroom culture (claims 13-15); a culture medium (claim 16); the use of the composition or culture medium for controlling or preventing pathogenic bacteria (claims 17-19).

Item V

Reference is made to the following documents:

- D1 Abram A Steiner ET AL: "Recipe for Ferric Salts of Ethylenediaminetetraacetic Acid Received for publication July 15, 1969", Plant Physiol, 1 januari 1970 (1970-01-01), bladzijden 862-863, XP055737303,
- D2 SANDRA M. ALMEIDA ET AL: "Iron bioaccumulation in mycelium of Pleurotus ostreatus", BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, deel 46, nr. 1, 1 mei 2015 (2015-05-01), bladzijden 195-200, XP055737347, DOI: 10.1590/S1517-838246120130695
- D3 EP 0 210 734 A1 (BURNS PHILIP & CO LTD [AU]; MINI AGRICULT NEW SOUT WALES [AU]) 4 februari 1987 (1987-02-04) in de aanvraag genoemd
- D4 WO 2013/034939 A2 (SZEGEDI TUDOMANYEGYETEM [HU]; MANCZINGER LASZLO [HU] ET AL.) 14 maart 2013 (2013-03-14)

Novelty

Concerning the composition claims, iron chelate complexes are commonly used as fertilizers and slug baits and there are a large number of documents that disclose compositions according to claims 13-15. For example, D1 discloses a composition comprising EDTA (26.1 grams, 0.09 moles; approximately 8% w/v) dissolved in 268 mL 1.0 N KOH and 24.9 grams (corresponding to 5 g of iron ions or 0.09 moles; approximately 1.8% m/v and a molar ratio of iron to chelate of approximately 1:1; see D1, page 862, left column, third paragraph). The solution is subsequently diluted to one litre. Before it is diluted, the composition as such is novelty destroying for the subject matter of claims 13-15.

Concerning the culture medium, D2 describes a culture medium proven to be useful in growing mushrooms (*Pleurotus ostreatus*), this culture containing 0.05 and 0.150 kg/m³ of iron ions (D2, table 1) and going up to 0.300 kg/m³ (D2, page 198, figure 2). This disclosure anticipates the subject matter of claim 16.

None of the documents found disclose the use of iron ions to control bacteria in a culture of mushrooms. Consequently, the subject matter of claims 1-12 and 17-19 is considered as being new.

Inventive Step and Sufficiency of Disclosure

The closest prior art could be either D3 or D4, which concern the use of certain *Pseudomonas* strains that control pathogenic *Pseudomonas* strains in mushrooms (D3, claims 1-6; D4, claims 1-9).

The difference between the subject matter of claim 1 and that of the prior art is the use of iron to control pathogenic bacteria in mushroom cultivation. The effect of this difference has not been shown. The objective technical problem to be solved is the provision of an alternative method for the control of pathogenic bacteria in mushrooms.

There is no indication in the prior art with regard to using iron ions at a certain concentration in the culture medium to control pathogenic bacterial growth in mushroom culture. The solution represents a non-obvious alternative solution to that of the prior art.

However, the applicant claims a general method for controlling pathogenic bacterial growth in a mushroom culture whereas there are only data for one specific species of bacteria, namely *Pseudomonas gingeri*. Given the lack of data concerning other bacterial species or even other species of *Pseudomonas*, it is not clear which other species of pathogenic bacteria in mushrooms can be controlled by using iron ions, which is to be objected to under sufficiency of disclosure.

Since the contribution to the art appears to be the use of iron ions to control *Pseudomonas gingeri*, the agent that causes a blotch on mushrooms, it would appropriate to restrict the claimed method to a method that corresponded to this contribution.