

Verkapselung von bakteriellen Antagonisten und eines nematophagen Pilzes

A. Patel¹, B. Slaats², J. Hallmann², R. Tilcher³, W. Beitzen-Heineke⁴ und K.-D. Vorlop¹

¹ Institut für Technologie and Biosystemtechnik, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig

² Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Münster

³ KWS SAAT AG, Einbeck

⁴ BIOCARE – Gesellschaft für biologische Schutzmittel mbH, Einbeck

Einleitung

Durch Verkapselung können die Eigenschaften biologischer Pflanzenschutzmittel wesentlich verbessert werden. Dazu gehören eine erleichterte Handhabbarkeit und Anwendung, Schutz der Biomasse vor biotischen und abiotischen Schadfaktoren, erhöhte Lagerfähigkeit, kontrollierte Freisetzung (in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen und den Kapselmaterialeigenschaften) und schließlich eine erhöhte Wirksamkeit im Boden. So wurden bereits Verkapselungstechniken, die in der klassischen Biotechnologie weit verbreitet sind (Vorlop et al. 1987), erfolgreich für biologische Pflanzenschutzmittel wie z.B. entomopathogene Nematoden (Patel & Vorlop 1994), bakterielle Antagonisten (Patel et al. 1995, Patel et al. 2002a, Patel et al. 2003) sowie den nematophagen Pilz *Hirsutella rhossiliensis* (Patel et al. 2002b) eingesetzt.

Hier präsentieren wir Daten eines Verbundprojektes zur Entwicklung von Hydrogelkapseln für die Applikation zweier biologischer Pflanzenschutzmittel: bakterieller Antagonisten gegen Wurzelbranderreger und des nematophagen Pilzes *H. rhossiliensis* gegen pflanzenparasitäre Nematoden. Von der Verkapselung im Labor- und Technikummaßstab, über Trocknung und Lagerung der Formulierungen, Wirksamkeitsuntersuchungen der biologischen Pflanzenschutzmittel im Gewächshaus und Freiland bis hin zum Technologietransfer zu einer mittelständischen Firma werden die verschiedenen Verfahrensschritte dargestellt.

Material und Methoden

Verkapselung von bakteriellen Antagonisten

Pseudomonas fluorescens BA2002 wurde in ½-konzentriertem TSB Medium für 48 Stunden bei 20°C angezogen. Ein Gramm *P. fluorescens*-Zellen wurden zusammen mit 9 g autoklavierter Bäckerhefe in 50 g autoklavierte 2 % Na-Alginat-Lösung gemischt. Die Alginatlösung wurde in 150 ml einer 2 %igen CaCl₂-Lösung getropft und 20 min gerührt, so dass eine Vernetzung zu Ca-Alginat erfolgen konnte. Kapseln mit einem Durchmesser von 1,0-1,2 mm wurden mittels Siebe abgetrennt, mit dem Trocknungshilfsmittel DP8 behandelt und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Zur Bestimmung der Lagerungsfähigkeit wurden 10 Kapseln in vakuumverschlossenen Aluminiumtüten bei 20°C über 4 Wochen bzw. bei 60°C für 2 Stunden inkubiert. Vor und nach der Trocknung sowie nach der Lagerung wurden die Kapseln in 300 ml Na-Citrat Puffer, pH 7,0 innerhalb von 40 min wieder aufgelöst und die Keimzahl auf SNA I Agar bestimmt.

Für Feldversuche wurde drei verschiedene Stämme (BA2002, F50 und F54) im Bioreaktor in ½-konzentriertem TSB Medium über 48 h angezogen. Sechzig Gramm bakterielle Biomasse und 540 g autoklavierte Bäckerhefe wurden in 3 kg einer 2 – 6 %igen Biopolymerlösung gegeben und die Suspension mit dem Strahlschneider in eine 2 %ige CaCl₂-Lösung getropft. Danach wurden die Kapseln getrocknet und in kommerzielle Zuckerrübenpillen eingearbeitet. In der Kontrolle wurde eine entsprechende Bakteriensuspension mit vergleichbarer Keimzahl direkt in die Zuckerrübenpille eingearbeitet.

Verkapselung des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis*

Für Gewächshausversuche wurde *H. rhossiliensis* im Bioreaktor in 1 % Glukose und 0,5 % technischem Hefeextrakt angezogen. Nach der Ernte wurden 50 g Myzel in 5 kg Verkapselungslösung bestehend aus zwei hydrogelbildenden Biopolymeren und 3 % autoklavierter Bäckerhefe gemischt und die Suspension mit dem Strahlschneider in eine 2 %ige CaCl_2 -Lösung getropft. Dann wurden die Kapseln bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Anwendung der verkapselten biologischen Pflanzenschutzmittel im Gewächshaus und Feld

Anwendung bakterieller Antagonisten

Verkapselte und freie Zellen wurden in kommerzielle Zuckerrübenpillen eingearbeitet. Diese wurden in Feldversuchen mit jeweils sechs Wiederholungen auf sechs verschiedenen Standorten in Deutschland, Frankreich und den Niederlanden getestet. Zur Wirksamkeitsbeurteilung wurden der frühe und späte Feldaufgang bonitiert. Zuckerrübenpillen ohne Bakterien dienten als Kontrolle.

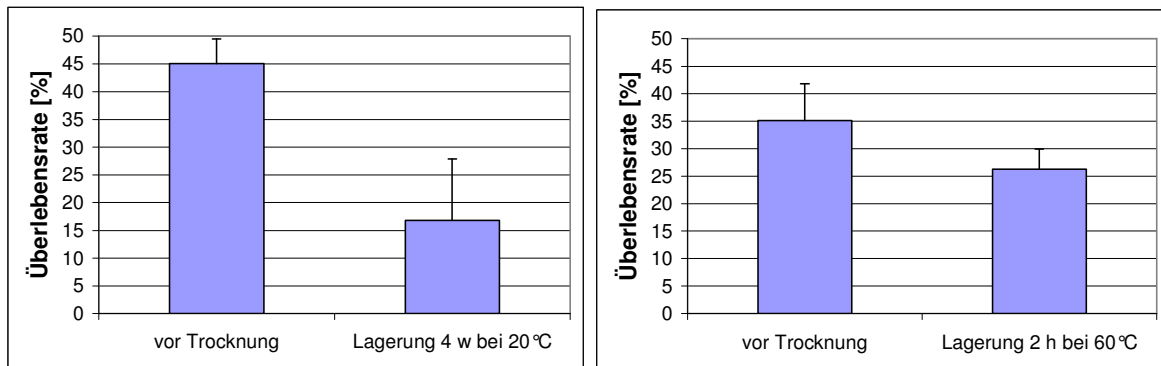
Anwendung von *Hirsutella rhossiliensis*

Die Wirksamkeit getrockneter Kapseln mit 1 % und 10 % Pilzmyzel von *H. rhossiliensis* gegen den Rübenzystennematoden (*Heterodera schachtii*) wurden in Gewächshausversuchen an Zuckerrüben untersucht. Die Versuche wurde in gedämpfter Felderde durchgeführt. Zur Beurteilung der Wirksamkeit von *H. rhossiliensis* wurde die Anzahl neu gebildeter Eier + Larven von *H. schachtii* sowie das Pflanzenfrischgewicht ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Verkapselung von bakteriellen Antagonisten

Wurden in Ca-Alginat verkapselte Zellen von *P. fluorescens* BA2002 an der Luft getrocknet, so betrug die Überlebensrate unmittelbar nach Trocknung 45 % und nach 4 Wochen Lagerung bei 20°C 17 % (Abb. 1A). Die Lagerfähigkeit über längere Zeiträume muss noch untersucht werden, jedoch zeigte ein Lagerschnelltest bei 60°C für 2 Stunden noch 26 % lebende Zellen (Abb. 1B), also einen Zellverlust von nur 25 %. Diese Thermostabilität deutet auf eine erhöhte Lagerfähigkeit hin, wie es auch schon für andere Mikroorganismen in Lagerschnelltests gezeigt werden konnte (Damjanovic & Badulovic 1968, Desmons et al 1998).



A

B

Abb. 1: Lagerfähigkeit von verkapselten und getrockneten Zellen von *P. fluorescens* BA2002. A: nach 4 Wochen Lagerung bei 20°C, B: nach 2 h Lagerung bei 60°C

Feldversuche mit verkapselten bakteriellen Antagonisten

Stellvertretend für die sechs Feldversuche, die insgesamt ähnliche Tendenzen zeigten, sind in Tabelle 2 die Ergebnisse des Versuchs am Standort Seligenstadt, Deutschland, aufgeführt. *P. fluorescens* als Kapselformulierung zeigte tendenziell einen höheren frühen Feldaufgang als die Flüssigformulierung. Der frühe Feldaufgang lag am niedrigsten in der unbehandelten Kontrolle.

Tab. 2: Einfluss von verkapselten bakteriellen Antagonisten auf den frühen Feldaufgang von Zuckerrüben, Seligenstadt 2004

Formulierung	Antagonist	früher Feldaufgang [%]	% von Kontrolle
Kapsel	F30	71,1	112,1
Kapsel	F54	70,0	110,3
Kapsel	BA2002	68,0	107,3
Flüssigkultur	BA2002	67,7	106,8
Flüssigkultur	F54	66,1	104,2
Flüssigkultur	F30	64,9	102,3
Kontrolle	-	63,4	100,0

*Gewächshausversuche mit verkapseltem *H. rhossiliensis**

Wurde pilzliches Myzel von *H. rhossiliensis* in Kapseln eingearbeitet, diese an der Luft getrocknet und in den Boden eingearbeitet, so war eine deutliche Reduktion des *H. schachtii*-Besatzes um 86 % zu beobachten (Abb. 2). Eine zehnfache Erhöhung des pilzlichen Biomassegehaltes reduzierte den *H. schachtii*-Besatz um 92 %. Ein Prozent pilzliches Myzel als feuchte Biomasse in den Boden eingearbeitet, führte zu keiner Verminderung von *H. schachtii* im Boden. Das Pflanzenfrischgewicht war mit der Reduzierung des *H. schachtii*-Besatzes positiv korreliert (nicht dargestellt). Es wird vermutet, dass die Verkapselung dem nematophagen Pilze *H. rhossiliensis* eine bessere Etablierung im Boden ermöglicht und dadurch eine Reduzierung des *H. schachtii*-Besatzes im Boden bewirkte.

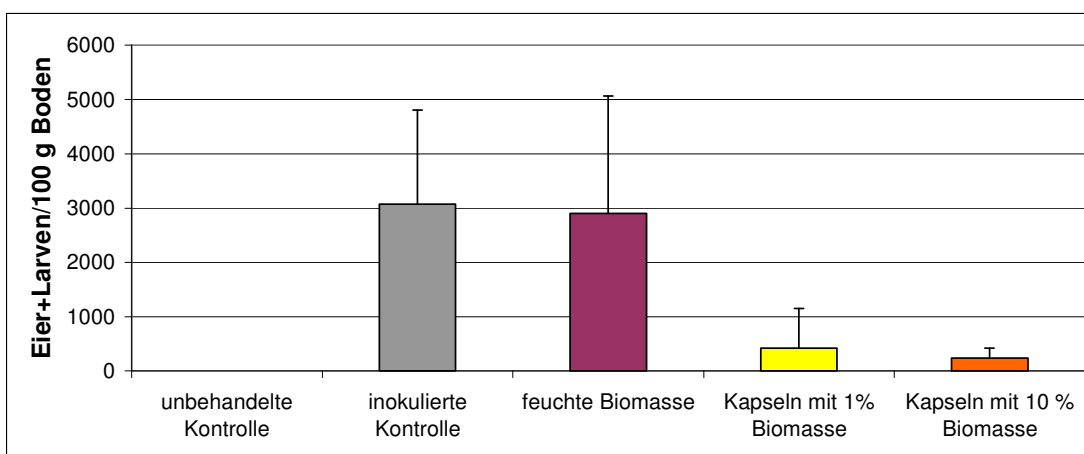


Abb. 2: Einfluss von verkapseltem *Hirsutella rhossiliensis* auf die Besatzdichte von *Heterodera schachtii* im Boden

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Hydrogelkapseln die Lagerfähigkeit von trocknungsempfindlichen bakteriellen Antagonisten erhöhen können. Diese Kapseln können dann als „pellets“ (i.e. getrocknete Kapseln > 1 mm) ausgebracht oder in kommerzielle Zuckerrübenpillen als Pulverformulierung (Kapseln < 200 µm) eingearbeitet werden. Bei dem nematophagen Pilz *H. rhossiliensis* kann durch eine Verkapselung die Wirkung deutlich gesteigert werden. Somit ergeben sich für Verkapselungstechniken vielseitige Anwendungsmöglichkeiten im biologischen Pflanzenschutz.

Literatur

- Damjanovic, V., Badulovic, D. (1968). *Predicting the stability of freeze-dried Lactobacillus bifidus by the accelerated storage test*. *Cryobiology* 5, 2, 101-104
- Desmons, S., Krhouz, H., Evrard, P., Thonart, P. (1998). *Improvement of lactic cell production*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70-72, 513-526
- Patel A. V., Vorlop K. D. (1994) *Entrapment of biological control agents applied to entomopathogenic nematodes*. *Biotechnology Techniques* 8, 8, 569-74
- Patel, A. V., Müller, R., Vorlop, K. D. (1995) *Einschlußimmobilisierung von biologischen Schädlingsbekämpfungsmitteln (Entrapment of biological control agents)*. *Gesunde Pflanzen* 5, 167-174
- Patel, A. V., Tilcher, R., Vorlop, K. D. (2002a) *Drying and incorporation of encapsulated pseudomonads into sugarbeet pills: preliminary results*. *Biospektrum (special edition)* 48
- Patel, A. V., Rose, T., Vorlop, K. D. (2002b) *Encapsulation of Hirsutella rhossiliensis in hollow beads based on sulfoethylcellulose to control plant-parasitic nematodes*. *Landbauforschung Völkenrode SH 241*, 145-150
- Patel, A. V., Bublitz, M. und Vorlop, K. D. (2003). *Encapsulation and drying of Pseudomonas fluorescens for biological pest control*. *Proceedings of the 11th International Workshop on Bioencapsulation "State of the Art of Bio&Encapsulation Science and Technology"*, Illkirch, Frankreich, 21-22
- Vorlop, K. D., Steinert, H. J., Klein, J. (1987) *Cell immobilization within coated alginate beads or hollow fibers formed by ionotropic gelation*. *Enzyme Engineering* 8, 339-342