

## **Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler mod plantesygdomme: effekter og muligheder.**

Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (MBM) baseret på udvalgte mikroskopiske svampe har stort potentiale til forebyggelse af plantesygdomme. Et eksempel er gråskimmel, der er en alvorlig plantesygdom i bl.a. jordbær. De omtalte svampe, også kaldet mikrobiologiske bekæmpelsesorganismer (MBO) har desuden lav følsomhed overfor fungicider. Det muliggør udvikling af en integreret strategi, hvor anvendelsen af MBM og fungicider kombineres. En detaljeret undersøgelse af den naturlige mikroflora på jordbær viser også, at risikoen forbundet med udbringning af MBM synes at være begrænset. Bakterier og svampe forekommer nemlig naturligt på bær og omfatter såvel opportunistiske human patogener og mykotoksindannere som plantepatogener og MBO.

### **Baggrund og formål**

Biologisk bekæmpelse af plantesygdomme, dvs. bekæmpelse af patogener med mikroorganismer i form af svampe og bakterier, er et vigtigt alternativ til brug af fungicider. I det følgende forkortes de mikrobiologiske bekæmpelsesmidler til MBM og de mikrobiologiske bekæmpelsesorganismer der indgår i midlerne til MBO. En del sygdomme som f.eks. gråskimmel i jordbær bekæmpes med ugentlige fungicidsprøjtninger i dyrkningsperioden frem til evt. sprøjtefrist for den spiselige del af afgrøden. Grøn vækst planen (Aftale om Grøn Vækst, 16 juni 2009) har en målsætning om at reducere pesticiders skadevirkninger. Det kan blandt andet imødekommes gennem en mere målrettet anvendelse af biologisk bekæmpelse/forebyggelse i kombination med andre metoder til plantebeskyttelse f.eks fungicider i en samlet integreret beskyttelsesstrategi. Målretning af mikrobiologiske metoder til forebyggelse af plantesygdomme kræver fokus på optimering af MBM som f.eks. forbedret etablering efter udbringning og kendskab til foreneligheden af MBO med andre plantebeskyttelsesmidler som fungicider. Endelig er det afgørende, at brug af MBM ikke er forbundet med utilsigtede virkninger på mennesker og miljø. MBO er ofte naturligt forekommende i de miljøer hvor de udbringes, ligesom der i disse miljøer også forekommer en lang række andre mikroorganismer der potentielt er human patogener, mykotoksindannere, plantepatogener eller hæmmende overfor plantepatogener. Optimering af effektiviteten af MBM og vurdering af risici forbundet med brug af MBM kræver indgående kendskab til den naturlige mikroflora i nichen, hvor MBM udbringes. Hovedformålet med projektet har været at undersøge betydningen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler og deres metabolitter i forhold til den naturlige mikrobiota, at undersøge skæbne og aktivitet af udbragte MBM samt at undersøge muligheder for at kombinere fungicider og MBM.

### **Undersøgelsen**

Projektet blev udført i samarbejde mellem forskergrupper ved Københavns Universitet, Institut for Plantebiologi og Bioteknologi (Birgit Jensen, Inge MB Knudsen og Dan Funck Jensen), Aarhus Universitet, Institut for Agroøkologi (John Larsen) og Danmarks Tekniske Universitet, Institut for systembiologi (Birgitte Andersen, Kristian Fog Nielsen og Ulf Thrane). Den naturlige mikroflora og deres metabolitter på jordbær blev undersøgt under markforhold hos fire

konventionelle og fire økologiske jordbæravlere med forskellig dyrkningspraksis og geografisk beliggenhed. Dyrkbare bakterier og svampe blev isoleret og identificeret. Herefter blev flere MBM, omfattende kommercielle præparater og laboratorieisolater, testet for deres virkning overfor gråskimmel i jordbær, mykotoksindannelse, fungicid følsomhed, vækst og skæbne.

## Hovedkonklusioner

Projektets resultater giver ny viden om mikroorganismer på planteoverflader, der kan danne grundlag for risikovurdering af udbragte mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler. Specielt er karakteriseringen af naturlige samfund af bakterier og svampe på jordbær et vigtigt udgangspunkt når risici forbundet med brug af MBM skal vurderes. Således synes betydningen af MBO og deres metabolitter at være begrænset i forhold til den naturlige baggrundsmikroflora på jordbær, når potentielle mykotoksindannere og opportunistiske humanpatogener tages i betragtning. Endvidere var der meget begrænset forskel i mikrobiotaen mellem økologiske og konventionelt dyrkede bær. Den lave overlevelse af *Trichoderma* fra MBM baseret på denne svamp, målt fra udbringning til høst af jordbær, giver yderligere information til vurdering af såvel risici som bekæmpelsespotentiale af MBO. Projektets resultater giver også grundlag for en videreudvikling af biologisk forebyggelse af plantesygdomme. Svampene *Clonostachys rosea* og *Ulocladium atrum* udgør en potentiel vigtig komponent i en integreret strategi til beskyttelse af jordbær overfor gråskimmel. Det skyldes dels begge svampes lovende virkning overfor gråskimmel og dels at de begge kan kombineres med brug af samtlige fungicider, der anvendes i konventionel jordbærproduktion. I forhold til økologisk jordbærproduktion viser projektets resultater, at der er grundlag for regulering af plantesygdomme gennem en aktiv udnyttelse af naturlige populationer af plantegavnige mikroorganismer. Der var nemlig en høj forekomst af potentielle MBO isolater af både bakterier og svampe på økologiske bær. Samlet giver projektets resultater ny viden, der kan være medvirkende til en fremtidig reduktion af anvendelsen af fungicider indenfor plantedyrkning.

## Projektresultater

### Den naturlige mikroflora på jordbær

Dyrkbare mikroorganismer på jordbær blev isoleret på forskellige medier og identificeret ved hjælp af klassisk morfologisk taksonomi, kemotaxonomi (profiler af sekundære metabolitter og fedtsyrer) og molekylær taksonomi (PCR fingerprinting og sekventering). Samfund af dyrkbare mikroorganismer på jordbær var kompleks og omfattende potentielle plantepatogener, opportunistiske humanpatogener, MBO og mykotoksindannere (Tabel 1). Bakterierne var den mest mangfoldige og diverse gruppe i jordbærmikrobiotaen efterfulgt af gær og filamentøse svampe (Tabel 1). Der syntes ikke at være sammenhæng mellem dyrkningspraksis og jordbærmikrobiotaen, og forskelle i jordbærmikrobiotaen mellem konventionelle og økologiske avlere var begrænset. Kvantitativt var der dog flere potentielle MBO bakterier på økologiske bær end på konventionelle bær, der tilsvarende havde flere isolater af bakterier, der er potentielle human patogener. Årsagen til forskellen mellem forekomst af potentielle MBO bakterier og

human patogener fra økologiske og konventionelle bær kan ikke fastlægges ud fra projektets resultater. Der er vigtigt at nævne, at de omtalte bakterier er universelle og givetvis også vil kunne isoleres fra f.eks. huden på mennesker.

**Tabel 1.** Mikroorganismer isoleret fra modne jordbær. Tabellen angiver dominerende slægter af dyrkbare bakterier, svampe og gærsvampe og deres potentielle funktioner.

Mikroorganismer	Plantepatogen	Humanpatogen	MBO <sup>1</sup>	Mykotoksin-danner
<b>Bakterier</b>				
<i>Curtobacterium</i>				
<i>Serratia</i>				
<i>Pseudomonas</i>				
<i>Enterobacter</i>				
<i>Rahnella</i>				
<b>Svampe</b>				
<i>Cladosporium</i>				
<i>Alternaria</i>				
<i>Penicillium</i>				
<i>Aspergillus</i>				
<b>Gærsvampe</b>				
<i>Candida</i>				
<i>Cryptococcus</i>				
<i>Rhodotorula</i>				

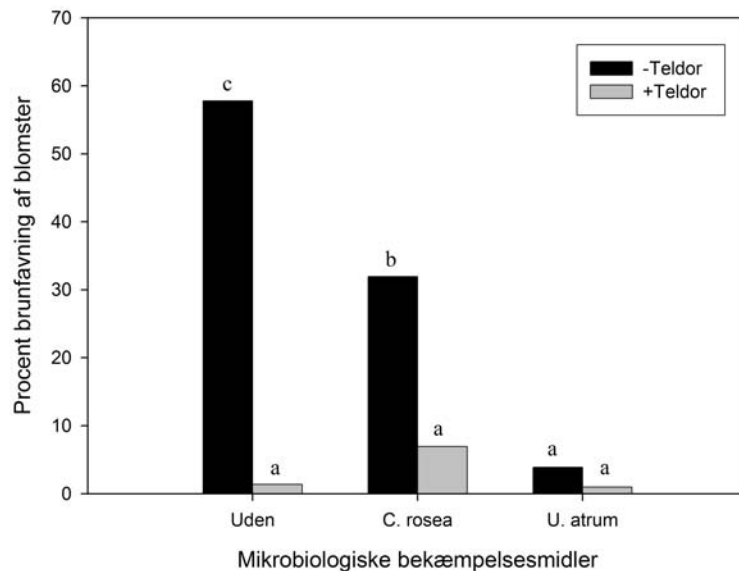
<sup>1</sup>MBO=mikrobiologisk be bæmpelsesorganisme

### Mykotoksiner

Jordbær blev undersøgt for en lang række kendte mykotoksiner vha. forskellige kromatografimetoder koblet til massespektrometer med referencer for kendte stoffer. Der blev ikke detekteret mykotoksiner hverken i sunde eller halv rådne (værste situation) bær hos nogen af de otte forskellige jordbæravlere. Dog producerede svampe fra slægten *Penicillium* og *Aspergillus* store mængder af kræftfremkaldende mykotoksiner, når de blev inokuleret på jordbær under *in vitro* forhold. Heller ingen af de testede MBM producerede mykotoksiner efter applikation til blomster/grønne bær i semi-field eller markforsøg. Dog indeholdt jordbær inokuleret med *Trichoderma*-baserede MBM under *in vitro* forhold biologisk aktive svampemetabolitter fra peptaibol familien.

### Virkning af MBO overfor gråskimmel

Blandt de testede MBO var svampene *Clonostachys rosea* og *Ulocladium atrum* effektive til at bekæmpe gråskimmel, mens de kommercielle MBM baseret på *Trichoderma* ikke påvirkede udviklingen af gråskimmel. Virkningen af *U. atrum* var sammenlignelig med virkningen af fungicidet Teldor (Figur 1), hvilket er lovende i forhold til en praktisk anvendelse. Det er dog afgørende at virkningen af *U. atrum* og *C. rosea* alene og i kombination med forskellige niveauer af fungicider kan bekræftes under markforhold.



**Figur 1.** Virkning af svampene *C. rosea* og *U. atrum* overfor gråskimmel i jordbær alene og i kombination med fungicidet Teldor. Symptomer af gråskimmel er udtrykt i form af brunfavnning af jordbærblomster. Behandlinger med forskellige bogstaver er signifikant forskellige.

#### Virkning af fungicider overfor MBO

Alle de testede MBO d.v.s. *Trichoderma* spp (BinabT, Supresivit, TRI003), *C. rosea* og *U. atrum* var upåvirkede af de fungicider, der anvendes mod svampesygdomme i jordbær (Amistar, Candit, Euparen, Scala, Signum og Teldor). Forsøgene blev udført *in-vitro* med fungiciderne indstøbt i agar, hvor svampene blev inokuleret og deres vækst observeret. Resultaterne viser, at der er potentiale for at kombinere MBM og fungicider med henblik på udvikling af en integreret strategi mod plantesygdomme.

#### Overlevelse af MBO

Etablering og vækst af *Trichoderma* (TRI003) på jordbærblomster og grønne bær med efterfølgende overlevelse på røde modne bær blev undersøgt hos to økologiske jordbæravlere. Monitering af *Trichoderma* isolatet fra TRI003 blev udført med specifikke molekylære metoder (UP-PCR). Applikering af TRI003 i anbefalet dosering til jordbærplanter gav en forekomst af *Trichoderma* på 40.000-70.000 kolonidannende enheder per blomst eller grønt bær. Ved høst af modne jordbær ca. 1 måned senere var forekomsten reduceret til mindre end 100 kolonidannende enheder per bær. I semi-field forsøg på Forskningscenter Flakkebjerg (Aarhus Universitet) blev det undersøgt, om sprøjtning i blomstringsperioden med fungicidet Teldor umiddelbart inden sprøjtning med tre MBO'er påvirkede disse etablering på modne bær. Fungicidbehandlingen ændrede ikke den lave forekomst af kolonidannende enheder per bær for nogen af de tre testede svampe. I gennemsnit blev der genfundet henholdsvis 20, 5, og 0 kolonidannende enheder per blad for *T. harzianum* (TRI003), *C.rosea* og *U. atrum*. Resultaterne viser, at etablering og overlevelse af *Trichoderma* efter udsprøjtning er lav, hvilket sandsynligvis er

en af årsagerne til de *Trichoderma* baserede midlers svigtende virkning overfor gråskimmel i projektet. Omvendt viste *C.rosea* og *U. ätrum* i projektet et lovende potentiale til bekæmpelse af gråskimmel på trods af etableringen af disse to svampe på bær også var meget lav.