



Effect van geselecteerde *Bacillus* – stammen op bacterievlekken door *Pseudomonas spp.* bij de champignon

Productschap  Tuinbouw

Met financiële ondersteuning van het Productschap Tuinbouw

Contactpersoon: Jan Vink

Begeleiding vanuit PAC: Niek Franzmann, Peter van Asseldonk, Frans Bienen

Contactpersoon voor deze rapportage:

Peter Oei

info@spore.nl

www.spore.nl

HR Holststraat 44

4103 VB Culemborg

Tel: 06 515 42 882



Samenvatting en resultaten

Op laboratoriumschaal is aangetoond dat diverse *Bacillus* stammen in staat zijn om bacterievlekken door *Pseudomonas* fors te verminderen. Alle 11 gebruikte *Bacillus*-stammen hadden een positief effect, de minst effectieve stam reduceerde het aantal besmette vruchtlichamen met 46%, de meest effectieve met 79%. Een mengsel van stammen scoort zelfs nog iets hoger: 81%. Dit ondersteunt de hypothese dat een mix van verschillende *Bacillus* stammen in staat is om effectief te zijn tegen verschillende ongewenste micro organismen. 10 van de 11 stammen *Bacillus* waren geselecteerd op hun ziekte onderdrukkende eigenschap t.o.v. *Trichoderma* maar blijken dus ook effectief tegen bacterievlekken.

Om deze resultaten te kunnen bereiken zijn eerst agressieve stammen van fluorescerende *Pseudomonas* uit zwaar aangetaste champignons geïsoleerd en is bepaald op welk moment de besmetting resulteert in grootschalig optreden van bacterievlekken op de vruchtlichamen.

Het enten van de *Pseudomonas tolaasii* stam uit de DSM collectie, die in eerdere experimenten geen bacterievlekken veroorzaakte, bleek geen beschermende werking op te leveren.

Inleiding

Eerder onderzoek voor de champignonteelt met speciaal geselecteerde stammen *Bacillus* toonde aan dat deze niet alleen *Trichoderma* onderdrukten, maar ook bacterievlekken door *Pseudomonas spp.* terugdrongen. In negen van de tien behandelingen waren er significant minder bacterievlekken bij behandeling met *Bacillus*. De gebruikte *Pseudomonas tolaasii* stam van DSM veroorzaakte echter geen bacterievlekken, tegen de verwachting in. In de referentiesituatie kwamen bij 5% van de champignons bacterievlekken voor. Voor een goede beoordeling van de effectiviteit van de *Bacillus*- bacteriën tegen de

Pseudomonas bacterievlekken, is een hoger besmettingspercentage gewenst. Om die reden zijn een aantal agressieve *Pseudomonas* stammen geïsoleerd voor vervolgprouwen. De gemeten positieve effecten in de eerdere experimenten traden op in een complexe praktijksituatie met een mix van bacteriën. Door het effect van de afzonderlijke bacteriestammen te testen bij champignonculturen, die besmet zijn met een agressieve *Pseudomonas* stam krijgen we inzicht in de werking van elke stam op zich. Tevens is in het onderzoek het optimale tijdstip bepaald waarop kwekers de positieve bacillen het beste kunnen toedienen.

Doelstellingen onderzoek

Hoofddoelstelling was het aantonen van de werkzaamheid van individuele stammen uit het geslacht *Bacillus* tegen bacterievlekken. Van belang daarbij is het moment waarop de beschermende microflora aanwezig dient te zijn.

Een subdoelstelling was het identificeren van voldoende agressieve stammen van *Pseudomonas*- bacteriën om daarmee champignons te kunnen besmetten.



Kenmerkend voor pseudomonaden is fluorescentie.

Materiaal en gebruikte methoden

Dekaarde, aangeleverd in big bag, fabrikant: TopTerra

Vochtgehalte: 84,88 %

pH : 7,11 – 7,16

Champignoncompost, doorgroeid, (Leverancier: Hooyman, Kerkdriel)

Diverse containers:

1. Styrolbakken 2 Liter voor 400 gr compost + 400 g Dekaarde (300 g deel 1 van de proeven)
2. Kunststof kratje voor 500 g compost en 500 gr. dekaarde
3. Kunststofkrat middelgroot, voor 1250 gr compost en 1250 g dekaarde

Isoleren van de Pseudomonaden

Champignons waarop zich bacterievlekken hadden gevormd, dienden als bron voor culturen van agressieve *Pseudomonas*. Met behulp van 'tissue culture' technieken (steriele entnaald in laminar flow) is aangetast weefsel overgebracht op zogenaamd King's B agar.



De meest aangetaste champignons zijn gebruikt als bron

Na incubatie bij 28 °C werden alleen de fluorescerende bacteriën steriel verder geënt. Van deze stammen werden vloeibare culturen bereid op basis van het volgende medium:

Pepton	20 gr
Glycerine	10 gr
MgSO ₄ . H ₂ O	1,5 gr
KH ₂ PO ₄	1,5 gr
H ₂ O	ad 1000gr



De incubatieduur was 7 dagen in speciaal luchtdoorlatende fermentatiezakken bij 28°C in de laboratoriumstoof.

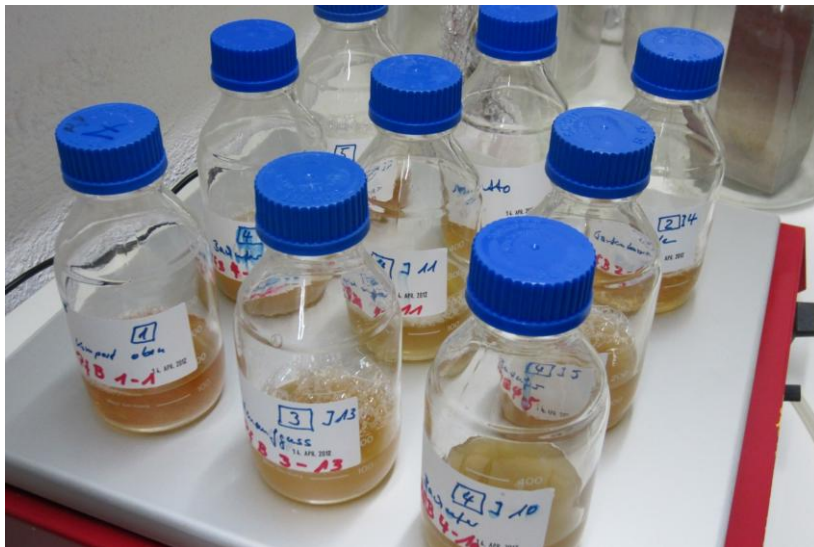
Een cultuur van *Pseudomonas tolaasi* was verkregen bij DSMZ en diende als referentie.

Productie van *Bacillus* stammen

De moederstam werd bewaard op Pepton Bacto Agar, het vloeibare medium bestond uit:

Pepton	20 gr
Glycerine	10 gr
MgSO ₄ · H ₂ O	1,5 gr
KH ₂ PO ₄	1,5 gr
H ₂ O	ad 1000g

De incubatieduur was 7 dagen in speciaal luchtdoorlatende flessen bij 37°C in de laboratoriumstoof.

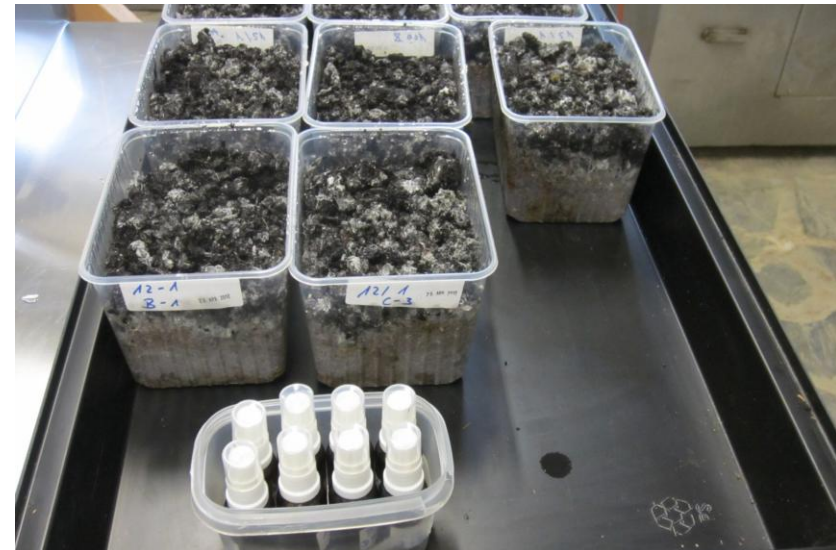


Besmetten op verschillende tijdstippen - methodiek

Elke eenheid bestond uit 300 gram dekaarde op 400 gram doorgroeide compost in 2 Liter Polystyrolbakken. Per variant werden steeds 2 eenheden getest. 1 gr *Pseudomonas* - vloeibaar medium werd met een fijne sproeier op de dekaarde gespreid,

waarbij de hele oppervlakte geraakt werd. Het besmetten met *Pseudomonas* gebeurde op drie verschillende tijdstippen:

1. Drie dagen na het opbrengen van de dekaarde
2. Bij het opruwen van de dekaarde
3. Bij het verschijnen van de eerste vruchtlichamen



Op de voorgrond de ampullen met *pseudomonaden*, op de achtergrond de opgeruwde dekaarde.

Resultaten besmettingsproeven en enttijdstip

Per behandeling werden het aantal vruchtlichamen met en zonder bacterievlekken geteld gedurende twee volledige vluchten. Op deze manier werd duidelijk wanneer het besmetten van de dekaarde de meeste gevolgen zou hebben en welke *Pseudomonas* stammen het meest virulent zijn. Van de zeven geteste *Pseudomonas* stammen zijn de drie met het hoogste besmettingspercentage gekozen om de vervolgentoelagen mee uit te voeren, dat waren de stammen 12/1B, 12/1C-3 en 12/1A. De behandeling met de *Pseudomonas*-stam van DSM, die in een

vorig experiment geen enkel vruchtlichaam besmette, gaf nu wel een duidelijk hogere besmettingsgraad dan de controles zonder *Pseudomonas*.

Pseudomonas-stammen	% besmette vruchtlichamen
12 / 1 B-1	25,00%
100 B	30,30%
12 / B-3	14,29%
12 / 1 B	57,69%
12 / 1 C - 3	52,00%
12 / 1 A	66,67%
12 / 1 B-2	45,16%
P. tolaasii DSM	41,94%
Controle 1	20,00%
Controle 2	27,27%

Tabel 1 Cumulatieve besmettingsgraad (in percentage van het totaal aantal vruchtlichamen) bij de verschillende *Pseudomonas* stammen bij champignoncultuur in 2 liter containers. Controle 1 en 2: uitsluitend water zonder *Pseudomonas*; onder hoge luchtvochtigheid kwamen daar van nature bacterievlekken voor.

Entmoment	Cumulatieve besmettingsgraad
Drie dagen na het opbrengen van de dekaarde	52,78%
Bij het opruwen van de dekaarde	27,27%
Bij het verschijnen van de eerste vruchtlichamen	38,89%

Tabel 2 Invloed van het moment van enten op besmettingsgraad

Het vroeg aanbrengen van de agressieve *Pseudomonas* stammen leidt tot de hoogste besmettingsgraad. Om deze reden werden de dekaarde bij de vervolgetperimenten direct in de aarde gemengd.

Invloed van *Bacillus* spp op *Pseudomonas* vlekken

De drie meest agressieve *Pseudomonas* – stammen 12/1B, 12/1C-3 en 12/1A werden individueel vermenigvuldigd in vloeibaar Kings B Medium. Omdat in het eerste deel van dit onderzoek de hoogste besmettingsgraad optrad bij besmetting in een vroeg stadium, is een mengsel van alle drie de agressieve stammen zorgvuldig gemengd met de dekaarde. Daarvoor is van elke stam 100 ml vloeibaar inoculum gemengd met 100 ml leidingwater; bij drie stammen is op deze wijze 600 ml mixinoculum vastgesteld. Deze 600 ml is machinaal met 28 kg dekaarde gemengd.

Per onderzoeksvariant is steeds 2150 gram dekaarde gemengd met 63 gram vloeibaar inoculum van de verschillende *Bacillus* stammen en van een mengsel daarvan. Per variant waren er drie herhalingen.



Gedurende twee volledige vluchten is nauwkeurig het aantal paddenstoelen met en zonder bacterievlekken geteld. Per onderzoeksvariant is de gemiddelde besmettingsgraad over de drie herhalingen berekend. Omdat de besmetting vrij regelmatig optrad, zijn alle paddenstoelen per onderzoeksvariant bij elkaar opgeteld.



Resultaten *Bacillus* - *Pseudomonas* battle

In dit experiment lukt het om hoog percentage aangetaste vruchtlichamen te verkrijgen met behulp van de speciaal geselecteerde agressieve *Pseudomonas* stammen. De *Bacillus* stammen PFB 2-4, PFB 2-5, PFB 4-5, PFB 4-10, PF-Na en de interne standaard PFB XY verkleinen het aantal paddenstoelen met aantastingen met 72-79%. Alle *Bacillus* stammen hebben een positief effect, de stam met het minste effect reduceert het aantal besmette vruchtlichamen nog altijd met 46%. De resultaten van het mengsel van verschillende *Bacillus*-stammen zijn zelfs nog iets beter: de reductie van besmette vruchtlichamen is hierbij 81%. Dit ondersteunt de hypothese dat een mix van verschillende *Bacillus* stammen in staat is om effectief te zijn tegen verschillende ongewenste micro organismen.

Tabel 3 Resultaten per variant: effect van *diverse Bacillus*-stammen op het aantal besmette vruchtlichamen
 In geel: de meest effectieve behandelingen.

Varianten	Periode 1 / 29.6.12		Periode 2 / 1.7.12		Periode 3 / 9.7.12			
	Aantal vruchtlichamen	Aangetast	Aantal vruchtlichamen	Aangetast	Aantal vruchtlichamen	Aangetast	Besmettingsgraad	Effectiviteit t.o.v. variant 13 Pseudomonas (52% besmetting)
PFB 1 - 1	9	5	25	4	5	1	26%	51%
PFB 2 - 4	9	4	35	2	8	1	13%	74%
PFB 2 - 5	0	0	38	4	10	3	15%	72%
PFB 3 - 13	12	6	38	4	4	1	20%	61%
PFB 4 - 5	0	0	62	7	9	5	17%	68%
PFB 4 - 6	10	3	36	3	6	4	19%	63%
PFB 4 - 10	0	0	46	7	5	2	18%	66%
PFB 4 - 11	0	0	57	9	5	3	19%	63%
PFB 5 - 1	12	6	30	4	11	5	28%	46%
PFB Na	18	5	15	1	19	0	12%	78%
PFB XY Intern	3	1	48	4	11	2	11%	79%
Controle, water zonder bacteriën	0	0	39	0	15	0	0%	100%
Controle, alleen Pseudomonas mix	28	18	9	2	7	3	52%	0%
Controle <i>B. subtilis</i> mix	9	0	23	1	9	3	10%	81%