

Biodiversiteit in de praktijk

Selectie van ziektewerende bacteriën

Effect op opbrengst en kwaliteit van champignons

PT PROJECTNUMMER 14341

**Peter Oei, ECO Consult Foundation, Culemborg
Dr. G. Albert, Pilzforum, Hackenheim, Duitsland**

Maart 2012

Productschap  Tuinbouw

Met financiële ondersteuning van het Productschap Tuinbouw

Contactpersoon: Jan Vink
Begeleiding vanuit PAC: Niek Franzmann, Peter van Asseldonk, Frans Brienem



Contactpersoon voor deze rapportage:

Peter Oei
info@spore.nl
www.spore.nl
HR Holststraat 44
4103 VB Culemborg
Tel: 06 515 42 882

Samenvatting

Speciaal geselecteerde bacteriën (*Bacillus subtilis*) blijken in staat om *Trichoderma* te onderdrukken en de kwaliteit van de champignons te verbeteren. Gebruik van deze bacteriën in de praktijk leverde geen opbrengstdaling op; onder laboratoriumomstandigheden waren de opbrengsten in kilo's gelijk en vond er bij negen van de tien behandelingen (met vier herhalingen per behandeling) minder aantasting plaats door bacterievlekken. Besmettingsexperimenten met een DSM stam van de verwachte veroorzaker van bacterievlekken *Pseudomonas tolaasii* leverden vreemd genoeg juist de mooiste paddenstoelen op. Blijkbaar is er veel verschil tussen verschillende stammen; het gebruik van de minder virulente stam kan bijdragen aan een duurzame gewasbescherming. Alle bacteriestammen zijn tegen lage kosten beschikbaar voor de Nederlandse champignonkwekers.

Inleiding

In de champignonteelt treden regelmatig kwaliteits- en opbrengstproblemen op door verschillende pathogene bacteriën en schimmels. Bacterievlekken door *Pseudomonas tolaasii* en een geringere oogst door *Trichoderma aggressivum* komen regelmatig voor. In de literatuur en uit de praktijk is bekend dat bepaalde bacteriën, waaronder stammen van *Bacillus subtilis*, ongewenste schimmels en bacteriën kunnen onderdrukken. Zo is in Thailand een biologische bestrijding tegen *Trichoderma* in de handel onder de naam Plaikaow.

Doel van dit onderzoek is om rassen *Bacillus subtilis* te vinden, die de champignonsector kan gaan inzetten om op een duurzame wijze het gewas te beschermen. Hiervoor is een groot aantal isolaten van bacteriën verzameld uit aarde, compost en natto (een Japanse gefermenteerde bonenspecialiteit, waarvan bekend is dat *Bacillus subtilis* een belangrijk onderdeel van de microflora uitmaakt). Van deze stammen was niet bekend of ze enige werking ten opzichte van *Trichoderma* en bacterievlekken zouden hebben. Daarom is vervolgens een selectieproces uitgevoerd: een test of deze stammen sporenvormend waren en amylose konden afbreken (kenmerken van *Bacillus subtilis*) en welke antagonistische werking ze tegen *Trichoderma* hadden (deel 1). Vervolgens is het effect van de kwaliteit van champignons getest met verschillende behandelingen (deel 2).

1 Selectie van *Bacillus subtilis* stammen tegen *Trichoderma*

Materiaal en methode

Monstername

Op vele plekken in Rheinland Pfalz zijn monsters genomen uit aarde en compost. Met een steriele lepel is steeds ca. 5 gram materiaal in een steriele zak gedaan en verzegeld. De monsters zijn bij een temperatuur van 4 C bewaard tot de aanvang van de werkzaamheden.

Mediumreceptuur

Als selectief medium voor *Bacillus subtilis* (SEN) is een mengsel gemaakt van de volgende ingrediënten.

Pepton tryptisch, herkomst: vlees	3 g
NaCl	70 g
Agar Agar	20 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

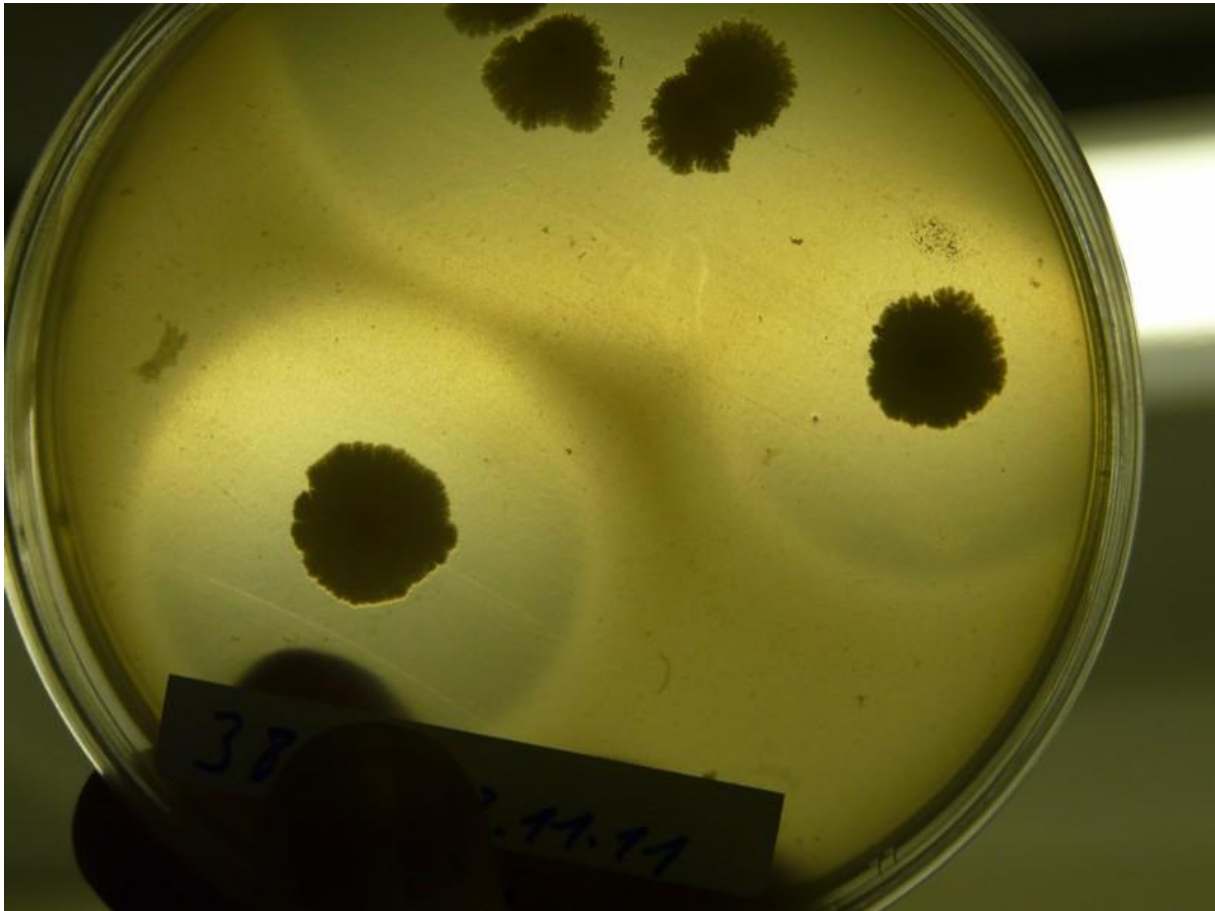
Bacillus subtilis isolaten

Per monster is 1 gram materiaal gemengd met 10 ml steriele 0,95 % NaCL oplossing en 11 Minuten bij 99 °C in reageerbuisjes gekookt. Daarna zijn de buisjes met koud water direct afgekoeld.

Uit de afgekoelde monsters zijn steeds per monster met een pipet uitstrijkjes gemaakt en bij 38 °C geïncubeerd gedurende 48 dagen. Individuele kolonies zijn vervolgens op een Amylase Testagar overgezet. Kolonies met een duidelijke amylase activiteit (na 36 uur bij 38 °C) zijn geselecteerd voor de experimenten.

Medium voor Amylase activiteit

Maiszetmeel	20 g
Pepton tryptisch, herkomst: vlees	3 g
NaCl	70 g
Agar Agar	20 g
A. dest.	ad 1000 ml



Amylaseactiviteit van *B. subtilis* op agar met maizetmeel. De lichter gekleurde cirkels tonen de afbraak van amylose.

Testmedium 1 voor *Trichoderma* en *B. subtilis* (MEW)

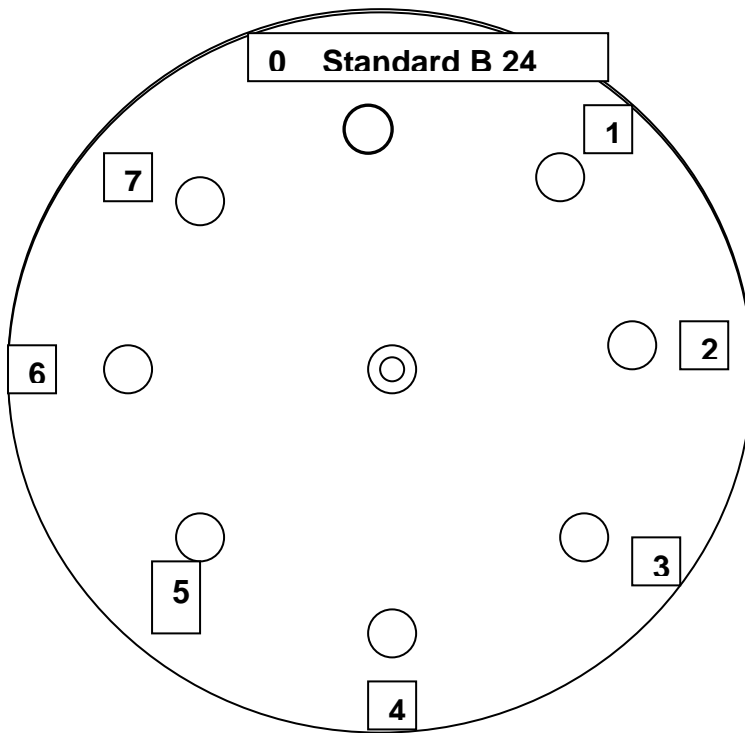
Moutextract	20 g
Agar Agar	20 g
Eiwitconcentraat EW	5g
Vitamine B1	10 ppm (sterielfiltraat)
Aqua dest	ad 1000 ml
pH	7,1

Testmedium 2 voor *Trichoderma* en *B. subtilis* (MPP)

Malzextrakt	20 g
Agar Agar	20 g
Pepton tryptisch uit vlees	5g
Vitamine B1	10 ppm (sterielfiltraat)
A. dest	ad 1000 ml
pH	6,84

Zevenvoudige antagonisme test tegen *Trichoderma*

Op elke petrischaal met hetzij MEW of MPP is een sjabloon met 8 cirkelvormig geordende posities voor enting geplaatst. Op elke positie kwam een 6 mm Ø Filterpapiertje, dat gedrenkt was in het te testen bacterie isolaat. Op positie 0 kwam steeds de standaard stam B24, dat een goede antagonistische werking heeft (+++). Op de zeven overgebleven plaatsen kwamen de te testen isolaten. Op deze manier was het eenvoudig het verschil met B 24 waar te nemen.



Afbeelding: Schema antagonisme test tegen *Trichoderma harzianum*
Op de posities 1 – 7 zijn de *Bacillus* stammen geënt.

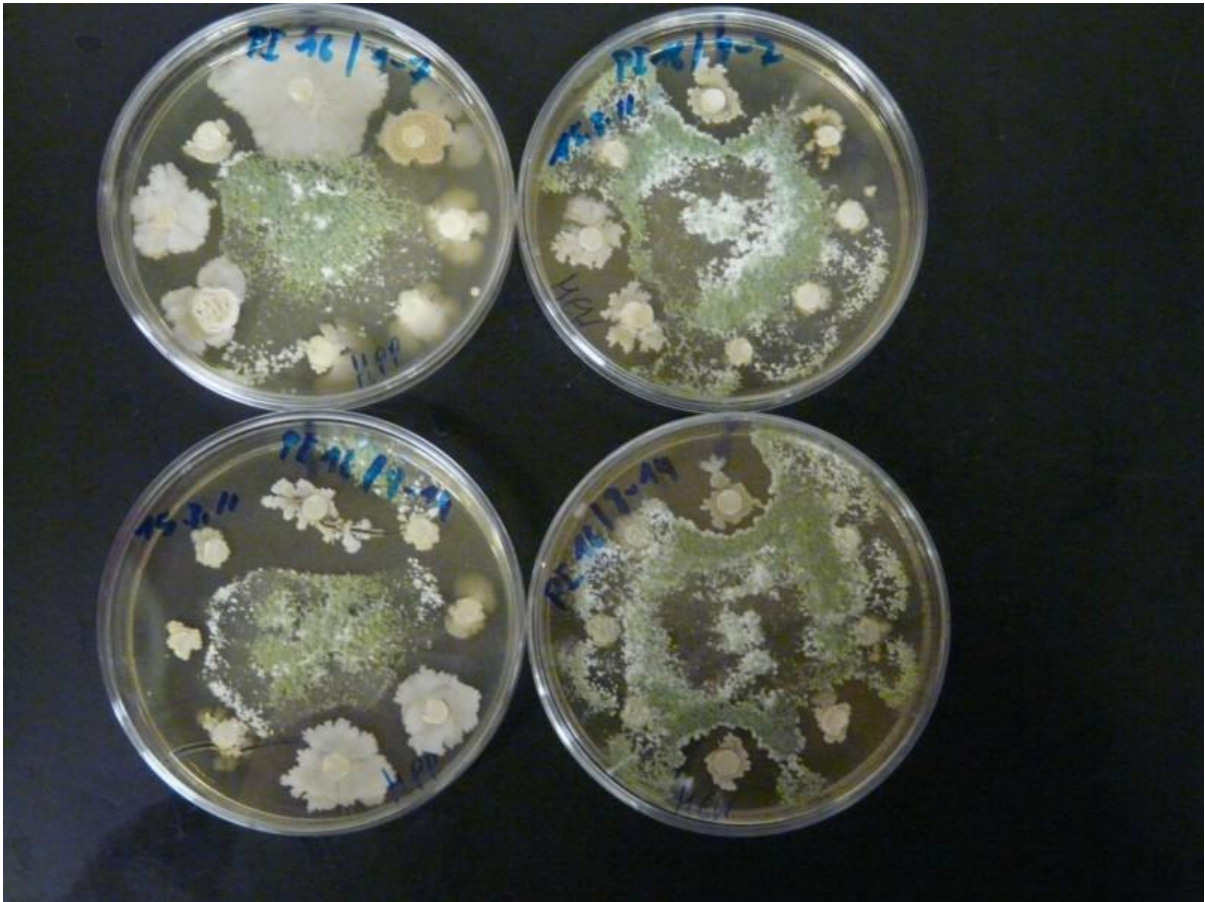


In het midden van elke petrischaal is met een pipet steeds een sporensuspensie van *Trichoderma harzianum* geënt. De culturen werden bij 28° C geïncubeerd; elke bacteriestam is zowel op testmedium MPP als MEW geënt. Alleen als bij beide kolonies van de bacteriestammen op zowel MEW als MPP een duidelijke grenszone zichtbaar was, kreeg de stam de notatie 'werkzaam'. Die werkzaamheid is in vier gradaties onderscheiden:

0	Geen antagonistische werking
+	Zwakke antagonistische werking
++	Duidelijke antagonistische werking maar zwakker dan de standaard B 24
+++	antagonistische werking vergelijkbaar of beter dan standaard B 24

Resultaten

Uit de vele testen kwamen 135 monsters van 52 verschillende herkomsten, die de test op amylaseactiviteit en morfologische eigenschappen doorstonden. Deze 135 stammen zijn vervolgens getest op antagonistische eigenschappen. 9 stammen hadden een vergelijkbare werking als het commercieel verkrijgbare ras B24. Met deze rassen zijn vervolgens de proeven opgezet met *Pseudomonas tolaasii*.



B. subtilis stammen met een goede antagonistische werking op MPP (links) en MEW (rechts) Agar.

2 Effect van verschillende *Bacillus subtilis* stammen op opbrengst en kwaliteit van champignons

Doelstelling van dit experiment was vast te stellen of de kwaliteit en de opbrengst van champignons positief te beïnvloeden zijn door de microflora in de dekaarde aan te vullen met de in het bovenstaande onderzoek geselecteerde stammen van *Bacillus subtilis*.

Methode en materialen

Entstof van *Pseudomonas tolaasii* is verkregen door een voedingsbodem te enten met een bij DSM bestelde stam, te weten DSM 19342. De voedingsbodem bestond uit:

Pepton (herkomst vlees)	20 gram
Glycerine	10 gram
MgSO ₄ · H ₂ O	1,5 gram
KH ₂ PO ₄	1,5 gram
A. demin.	ad 1000 ml

Incubatie: in een zuurstofdoorlatende zak bij 28°C.

Nieuwe dekaarde: in plastic zakken geleverd door TopTerra Mushroom Casing

Vochtgehalte: 83,71 %; pH: 7,00

Gebruikte dekaarde:

Afkomstig van champignonkwekers, inclusief stompjes en champignonresten.

Vochtgehalte. 81,70 %; pH: 6,94 – 7,09

De entvloeistof voor *Bacillus subtilis* bevatte:

Pepton tryptisch uit vlees	5 g
Gistextract	2 g
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg
A. dest.	ad 1000 ml

Behandeling gebruikte dekaarde:

In een menger met mengarmen ('Paddelmischer') is 100 liter materiaal gemengd en verkleind. Het mengsel met 50% gebruikte dekaarde heeft 3 dagen op 37 C gestaan, zonder bacterie toevoeging. Daarna vond pasteurisatie van 20 uur bij 65 C plaats. Zie verder de tabel voor verhoudingen en diverse behandelingen.

Vouwkratten van 32 liter, maatvoering: 480 mm (l), 350 mm (b), 240 mm (h).

De vouwkratten kregen een dunne HDPE inliner en werden gevuld met 4 kg champignonsubstraat (doorgroeide compost, herkomst: Walkro) en 4 kg dekaarde c.q. dekaardemengsel. De oppervlakte van de dekaarde werd afgedekt met het restant van de inliner, zodat er gedurende de doorgroeiperiode steeds een CO₂ Gehalte van minimaal 10000 p.p.m.v. in de vouwkrat heerste. De temperatuur bij de doorgroei was 23 °C.

6 dagen na het afdekken werd bij een aantal varianten de bacteriemix aangebracht door gelijkmatig de dekaarde te besproeien. Bij de varianten zonder bacteriën werd er 125 ml met 0,85 % NaCl toegevoegd in plaats van de bacteriesuspensie, om vergelijkbare hoeveelheden vocht per vouwkrat op te brengen.

Nadat het champignonmycelium 90% van de oppervlakte doorgroeid had, werd de inliner omgeslagen en de dekaarde tot op de scheidingslaag met de compost opgeruwd. 24 uur later werd de temperatuur verlaagd tot 16,5°C - 17,5 °C en de

CO₂ concentratie verlaagd tot onder de 1000 ppm bij een hoge luchtvochtigheid van ca. 90 - 95 %. Zodra de knopjes zo groot als een erwt waren, werden ze met een sproeikop bewaterd. (850 ml per vouwkrat in twee beurten). Zodra de champignons ca. 3 cm in diameter waren, werd de luchtvochtigheid omlaag gebracht tot 80 – 85%. Na de oogst van de eerste vlucht werd elke krat vier keer besproeid met in totaal 1200 ml water. De champignons werden geplukt met gesloten hoeden, nog voordat het velum loskomt van de steel. Elke paddenstoel is geteld per vouwkrat.

Meetapparatuur

WTW pH-Meter met Mettler Toledo insteekelektrode

Cyberscan pH Meter met Fischer insteek-meetketting

Testo 925 thermometer met insteekelektrode

Testo 535 CO₂ meter (Infrarood)

Rotronic HygroPalm met HygroClip voeler voor vocht en temperatuur

Sartorius MA 50 Vochtmetr

Onderzoekopzet kwaliteit van champignons na enten van <i>Pseudomonas tolaasii</i> en de geselecteerde <i>Bacillus subtilis</i> stammen.				
Code	Herhalingen	% recycl. dekaarde	% verse dekaarde	Behandeling
K-A	A	0	100	
K-B	B	0	100	
K-C	C	0	100	
K-D	D	0	100	
K-E	E	0	100	
K-F	F	0	100	
100 Psto - A	A	0	100	Enten 25 ml <i>Pseudomonas tolaasii</i> 6 dagen na afdekken
100 Psto - B	B	0	100	idem
100 Psto - C	C	0	100	Idem
100 Psto-D -PF	D	0	100	idem
100 Psto -E-PF	E	0	100	idem
100 Psto -F- PF	F	0	100	idem
50-50 A erhitzt	A	50	50	zonder bacteriën, 3 dagen bij 37°C + pasteurisatie 65°C
50-50 B erhitzt	B	50	50	idem
50-50 C erhitzt	C	50	50	idem
50-50 D erhitzt	D	50	50	idem
50-50 Psto A	A	50	50	Enten 25 ml <i>Pseudomonas tolaasii</i> 6 dagen na afdekken
50-50 Psto B	B	50	50	Idem
50-50 Psto C	C	50	50	Idem
50-50 Psto A +PF	A	50	50	Enten 25 ml <i>Pseudomonas tolaasii</i> 6 dagen na afdekken plus <i>Bacillus</i> -mix
50-50 Psto B +PF	B	50	50	idem
50-50 Psto C +PF	C	50	50	idem

Resultaten

De complete dataset is beschikbaar als Excel bestand, onderstaand de belangrijkste conclusies uit het onderzoek.

Resultatentabel: effect van <i>Bacillus subtilis</i> stammen op de kwaliteit van champignons							
Code behandeling en herhalingsnummer	Gemiddelde oogst in gr per krat per variant	Biologische efficiency voor 4 kg substraat	% paddenstoelen met vlekken per behandeling met vlekken per variant	Aantal paddenstoelen per herhaling	Aantal paddenstoelen met vlekken per herhaling	Som aantal paddenstoelen per variant	Som aantal paddenstoelen met vlekken per variant
K-A	1931	48,3%	5,36%	98	0	429	23
K-B				65	3		
K-C				57	10		
K-D				85	4		
K-E				59	0		
K-F				65	6		
100 Psto - A	1899	47,5%	3,39%	86	0	236	8
100 Psto - B				84	2		
100 Psto - C				66	6		
100 Psto - D - PF	1924	48,1%	9,91% *	64	7	222	22 *
100 Psto - E - PF				75	12 *		
100 Psto - F - PF				83	3		
50-50 A erhitst	1684	42,1%	3,65%	28	0	137	5
50-50 B erhitst				42	2		
50-50 C erhitst				34	0		
50-50 D erhitst				33	3		
50-50 Psto A	1842	46,1%	3,80%	64	3	158	6
50-50 Psto B				32	3		
50-50 Psto C				62	0		
50-50 Psto A +PF	1670	41,8%	0,00%	61	0	139	0
50-50 Psto B +PF				43	0		
50-50 Psto C +PF				35	0		

* hierbij hebben naastgelegen champignons elkaar aangestoken, waardoor de score relatief hoog is uitgevallen.

Naast de laboratoriumgegevens heeft er vijf keer een sporeibeurt plaatsgevonden op een groot bedrijf, waar steeds een bed behandeld is; de overige 15 bedden dienden als controle. In geen enkel geval is er terugval van de productie gemeld.

Tijdens deze experimenten liepen proeven voor Sikes Champignons, waar de bacteriën eveneens zijn ingezet. Met zijn toestemming mogen de volgende resultaten openbaar gemaakt worden en gedeeld met de sector. Doel van zijn proefnemingen was te bepalen welke percentages dekaarde hergebruikt konden worden, zonder dat er opbrengstdaling en kwaliteitsverlies optreedt.

Recycling van dekaarde onderzoek, in opdracht van Sikes Champignons

Varianten en kratnummer	Gemiddelde oogst in gr per krat per variant	Biologische efficiency voor 4 kg substraat	% paddenstoelen met vlekken, gemiddeld per variant	Som aantal paddenstoelen	Aantal paddenstoelen met vlekken	Som paddenstoelen per variant	Som paddenstoelen met vlekken per variant
K-A	1931	48,275%	5,36%	98	0	429	23
K-B				65	3	286 gecorrigeerd voor 6 i.p.v. 4 herhalingen	
K-C				57	10		
K-D				85	4		
K-E				59	0		
K-F				65	6		
20-A-23	2002	50,056%	0,82%	92	1	368	3
20-B-23				102	1		
20-C-23				106	1		
20-D-23				68	0		
20-A-37	1893	47,313%	2,08%	54	1	336	7
20-B-37				104	6		
20-C-37				97	0		
20-D-37				81	0		
35-A-23	1913	47,825%	1,35%	89	0	371	5
35-B-23				102	4		
35-C-23				93	1		
35-D-23				87	0		
35-A-37	1837	45,925%	0,00%	64	0	295	0
35-B-37				69	0		
35-C-37				84	0		
35-D-37				78	0		
50-A-23-PF	1781	44,525%	1,03%	42	0	292	3
50-B-23-PF				93	2		
50-C-23-PF				76	1		
50-D-23-PF				81	0		
50-A-37-PF	1860	46,506%	4,01%	76	1	349	14
50-B-37-PF				117	7		
50-C-37-PF				59	2		
50-D-37-PF				97	4		
50-A-23-FZB	1884	47,106%	4,83%	58	5	331	16
50-B-23-FZB				92	3		
50-C-23-FZB				79	3		
50-D-23-FZB				102	5		
50-A-37-FZB	1886	47,138%	3,22%	67	4	342	11
50-B-37-FZB				78	1		
50-C-37-FZB				91	2		
50-D-37-FZB				106	4		
50-50 Sauer - A	1923	48,083%	27,52%	112	28	258	71
50-50 Sauer - B				48	7		
50-50 Sauer - C				98	36		

Discussie

Onderzoek in complexe systemen met een veelheid aan organismen levert soms verrassende resultaten op. Zo zijn de mooiste champignons geogst uit de variant die besmet was met *P. tolaasii*, waar ondanks een hoge luchtvochtigheid geen bacterievlekken op de paddenstoelen verschenen. De DSM stam 19342 van *P. tolaasii* was blijkbaar weinig agressief, hoewel hij in grote hoeveelheden was opgebracht en de omstandigheden voor de teelt zo waren ingesteld, dat deze bacterie juist bacterievlekken had moeten veroorzaken. Mogelijk was de mix van *Bacillus subtilis* hier in combinatie met deze zwakke stam juist verantwoordelijk voor een optimale microflora. Is het mogelijk (voor de champignon) agressieve *P. tolaasii* stammen te verdringen door deze zwakkere stam? De paddenstoelen die wel zijn aangetast door *Pseudomonas tolaasii* zijn wellicht door van nature in de lucht of dekaarde voorkomende stammen besmet en niet door de DSM stam. Er zijn reïnculturen van deze stammen geïsoleerd.

Bij vervolgonderzoek is het wenselijk hogere besmettingspercentages te verkrijgen dan de 5,4% die hier in de zes herhalingen van de standaard variant is opgetreden; desalniettemin bevestigen de resultaten de hypothese dat een goede mix van bacteriën de kwaliteit van champignons kan bevorderen. Slechts één variant van de 10 verschillende varianten met de mix van *Bacillus subtilis* stammen scoorde slechter dan de standaard; in 9 andere varianten was er een duidelijke vermindering van het aantal paddenstoelen met vlekken te zien. Het is met name één herhaling geweest, 100 Psto - E – PF, die extreem slecht scoorde. Hierbij heeft een enkele zwaar aangetaste champignon zijn buurchampignons aangetast.

De microflora in standaard dekaarde is onbekend; onduidelijk is ook hoe variabel die microflora is. Leveranciers van dekaarde geven aan dat ze de biologische kwaliteit van dekaarde alleen controleren op de aanwezigheid van schadelijke, ziekteverwekkende micro organismen (RHP-certificeringsproces). De goede resultaten van het dekaardemengsel dat 3 dagen op 37 C incubeerde zonder de geselecteerde bacteriën kunnen veroorzaakt zijn, doordat de champignonresten in de dekaarde als voedingsbron voor gunstige bacteriën fungeerde. Het aanzuren van de dekaarde blijkt te leiden tot hoge besmettingspercentages; een verklaring hiervoor is dat de lagere pH gunstig kan zijn voor microflora die vlekken veroorzaakt.

Conclusies

- Er zijn negen *Bacillus subtilis* stammen ontdekt, die een minimaal even groot antagonistisch effect hebben op *Trichoderma* als de commercieel verkrijgbare stam FZB 24.
- Het toevoegen van de mix met verschillende stammen van *Bacillus subtilis* heeft geen negatief effect op de opbrengst in kilo's, zowel op laboratoriumschaal als in de praktijk.
- Op één uitzondering na is de aantasting door bacterievlekken duidelijk verminderd door het aanbrengen van de mix met stammen van *Bacillus subtilis*. In negen varianten was er een (vaak duidelijk) lager percentage besmette paddenstoelen.
- De stabiliteit van de microflora in de huidige dekaarde is onbekend; het aanbrengen van bacteriën met positieve eigenschappen verlaagt de kans op problemen in de teelt.
- De als ziekteverwekker bekend staande *Pseudomonas tolaasii* uit de bibliotheek van DSM blijkt geen sterke verkleuring van champignons teweeg te brengen.
- Het aanzuren van de dekaarde leidt tot een ongunstigere microflora met een hoger aantal besmettingen.