



EXCALIBUR

# DIE GEHEIMNISSE DER NATUR ENTSCHLÜSSELN: Nützliche Mikroorganismen können die Pflanzenproduktion beeinflussen



Dieses Projekt wurde durch das Forschungs-und Innovationsprogramm Horizont 2020 der Europäischen Union unter der Finanzhilfvereinbarung Nr. 817946 gefördert.

## Inhalt

Einführung .....	4
Kapitel 1. Mykorrhizapilze zur Verbesserung der Aufnahmefähigkeit und des Wachstums von Gartenbaukulturen .....	6
1. Arten von Mykorrhizapilzen und ihre Fähigkeit zur Besiedlung von Pflanzen .....	6
2. Wirkung von AMF auf Pflanzenwachstum, Ertrag und Stresstoleranz.....	10
3. Formulierungen und Anwendungsrichtlinien für verschiedene gartenbauliche Anbausysteme.....	13
4. Bewirtschaftung von Kulturpflanzen zur besseren Nutzung der AMF-Aktivität durch Vorschläge für Bewirtschaftungspraktiken, die die Effizienz der AMF beim Anbau und Ertrag von Kulturpflanzen erhöhen	14
Kapitel 2. Mikrobielle Produkte für die biologische Schädlingsbekämpfung bei Gartenbaupflanzen .....	18
1. Verwendung von Mikroorganismen zur biologischen Schädlingsbekämpfung .....	18
2. Biologische Bekämpfung von Schädlingen und Krankheitserregern im Boden: Faktoren, die für eine hohe Wirksamkeit zu berücksichtigen sind .....	21
3. Biokontrolle von Schädlingen und Krankheitserregern, die oberirdische Pflanzenorgane befallen: praktische Aspekte .....	26
4. Multifunktionale Kapazität von Mikroorganismen: eine Chance für die integrierte Schädlingsbekämpfung.....	31
Kapitel 3. Mikroorganismen zur Förderung des Pflanzenwachstums .....	36
1. Mikroorganismen, die das Pflanzenwachstum fördern können .....	36
1.1. Wirkungsweise - wie fördern die Mikroorganismen das Pflanzenwachstum? .....	38
1.2. Kommerzielle PGPM-Stämme - von der Forschung zur Anwendung.....	40
2. Nutzung von Prä-, Pro- und Postbiotika zur Förderung des Pflanzenwachstums und zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit und -gesundheit.....	42
2.1. Wie wählt man ein pflanzliches Präbiotikum, Probiotikum oder Postbiotikum aus? .....	43
3. Praktische Aspekte für den richtigen Einsatz von pflanzenwachstumsfördernden Mikroorganismen ..	45
Kapitel 4. Produktionstechnologie für mikrobiologische Produkte .....	51
1. Arten von Formulierungen (in einem praktischen Kontext - wofür, welche wir verwenden und warum). 51	
2. Technologie zur Herstellung mikrobieller Produkte.....	52
2.1. Auswahl und Isolierung von Mikroorganismen.....	53
2.2. Stammsammlung.....	55
2.3 Inokulum.....	56
2.4. Medien.....	57
2.5. Schlüsselkomponenten der Produktionslinie.....	58

2.6. Technologie zur Herstellung von Biopräparaten .....	59
2.7. Überwachung und Kontrolle von Variablen, die das mikrobielle Wachstum und die Qualitätskontrolle beeinflussen.....	61
2.8. Hygienische Überlegungen für die gesamte Linie .....	63
3. Biologische Wirksamkeit und Kommerzialisierung .....	63
3.1. Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Laborbedingungen .....	63
3.2. Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter kontrollierten Bedingungen .....	65
3.3. Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Feldbedingungen.....	66
3.4. Löslichkeit, Mischbarkeit und Stabilität von Biopräparaten .....	66

## Einführung

Es ist erwiesen, dass Mikroorganismen und ihre Gemeinschaften eine entscheidende Rolle bei der Diversifizierung und dem Funktionieren aller lebenden Organismen spielen. Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen die Fähigkeit der Pflanzen beeinflusst, mit abiotischen und biotischen Stressfaktoren umzugehen. Dies hat erhebliche Auswirkungen auf die Pflanzenproduktion. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in den letzten 20-30 Jahren eine große Zahl von Mikroorganismen isoliert, charakterisiert und als Biodünger und Biokontrollmittel für die Landwirtschaft getestet. Die Ergebnisse bestätigen die positive Wirkung der ausgewählten Mikroorganismen auf das Pflanzenwachstum und die Pflanzengesundheit und wirken sich auch positiv auf die Bodeneigenschaften aus.

Die Verwendung von nützlichen Mikroorganismen in der Pflanzenproduktion wird somit zu einer gängigen Praxis. Insbesondere in einer modernen, nachhaltigen Landwirtschaft und im Kontext von Umwelt- und Klimabelangen, werden Produkte auf Mikrobengrundlage als potenzielle Alternative oder Ergänzung zu synthetischen Düngemitteln und Pestiziden anerkannt. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass mikrobielle Produkte auf EU-Ebene durch die EU-Verordnung 2019/1009 über Düngemittel oder die EU-Verordnung 1107/2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln geregelt sind.

Produkte auf der Basis von Mikroorganismen für die Pflanzenernährung, die in den EU-Rechtsvorschriften als "mikrobielle Biostimulanzien" bezeichnet werden, sind ein wirksames Mittel zur Förderung des Pflanzenwachstums und der Pflanzenproduktion in einem Kontext, in dem der Einsatz von mineralischen oder synthetischen Düngemitteln reduziert wird. Bei den mikrobiellen Biostimulanzien handelt es sich um Produkte, die die Prozesse der Pflanzenernährung unabhängig vom Nährstoffgehalt des Produkts stimulieren, mit dem alleinigen Ziel, eines oder mehrere der folgenden Merkmale der Pflanze und der Rhizosphäre zu verbessern: Effizienz der Nährstoffverwertung, Toleranz gegenüber abiotischem Stress, Qualitätsmerkmale, Verfügbarkeit der im Boden und in der Rhizosphäre gebundenen Nährstoffe. Unter den mikrobiellen Biostimulanzien werden derzeit vier Gruppen von Mikroorganismen bei den Düngemitteln aufgeführt: drei atmosphärische stickstofffixierende Bakterien (*Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) und Mykorrhizapilze, die hauptsächlich die Phosphatversorgung fördern, aber auch zur Verbesserung der Stickstoff- und Spurenelementversorgung beitragen können.

Andererseits werden Pflanzenschutzmittel auf der Basis von Mikroorganismen ähnlich wie synthetische Mittel behandelt und müssen, um zugelassen zu werden, den anvisierten Schädling wirksam bekämpfen. Bei der Bekämpfung von Insekten sind entomopathogene Pilze die Gruppe von Mikroorganismen, die die nützlichsten Lösungen geliefert hat. Zu den wichtigsten Arten, die zu diesem Zweck eingesetzt werden, gehören *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* und *Isaria fumosorosea*. Bei den Biofungiziden sind mikrobielle Formulierungen sowohl für die Anwendung vor als auch nach der Ernte erhältlich. Doch auch hier steht den vielen Arten und Stämmen, die für ihre biologische Bekämpfungswirkung bekannt sind, eine begrenzte Anzahl von Mikroorganismen gegenüber, die als Wirkstoffe zugelassen sind.

Obwohl mikrobielle Produkte in der Landwirtschaft bisher erfolgreich eingesetzt wurden, zögern die Landwirte noch, sie auf breiter Basis anzuwenden. Der Grund dafür ist das begrenzte Wissen über die Auswirkungen von Ausbringungsmethoden und Anbaupraktiken auf die Wirksamkeit der mikrobiellen Produkte. Das Wissen über die Feldanwendung ist begrenzt, was die Dosierungsanforderungen oder die spezifischen Wechselwirkungen des Bioinokulans mit der einheimischen Bodenbiota betrifft. Darüber hinaus hat eine kürzlich durchgeführte Analyse der weltweit auf dem Markt befindlichen Produkte die Notwendigkeit einer integrierten Entwicklung von Produkten auf mikrobieller Basis, einschließlich ihrer

Produktions- und Formulierungsprozesse, unterstrichen, insbesondere im Hinblick auf die mögliche Verwendung von Zusatzstoffen, die entweder die Haltbarkeit oder die Wirksamkeit der Produkte erhöhen können. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Formulierung des mikrobiellen Biostimulans ein Schlüsselfaktor, um die Wirksamkeit der Pflanzenbehandlung zu gewährleisten. Während die Formulierung von Produkten auf der Grundlage eines einzigen Stammes oder einer einzigen Spezies die Herstellung und die Zulassung für die Vermarktung vereinfacht, weisen verschiedene Studien auf die Nützlichkeit der Anwendung von Mikroorganismen-Konsortien hin, die sich aus Spezies zusammensetzen, die in der Lage sind, untereinander und möglicherweise auch mit dem Bodenmikrobiom zu "kooperieren". In dieser Hinsicht haben sich Konsortien aus Mykorrhizapilzen und -bakterien bei verschiedenen Kulturen als besonders wirksam erwiesen, so dass der Einsatz von Mineraldüngern um bis zu 50 % reduziert werden konnte.

Neben der Suche der Industrie nach der besten Formulierung müssen die Landwirte selbst einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Behandlung mit einem mikrobiellen Biostimulans oder -pestizid leisten, indem sie agronomische Praktiken anwenden, die die Wirkung des Produkts selbst nicht beeinträchtigen. Tatsächlich wird die Persistenz oder Wirksamkeit mikrobieller Biostimulanzien und Pestizide im Allgemeinen durch landwirtschaftliche Bewirtschaftungspraktiken beeinflusst: Praktiken wie Bodenbearbeitung, Schädlingsbekämpfung mit anderen Mitteln, mineralische und organische Düngung oder Wasserregime können die Wirksamkeit eines mikrobiellen Produkts stark verändern. Wenn man bedenkt, dass im Allgemeinen 60-90 % der ausgebrachten Mineraldünger ausgewaschen werden und nur 30-50 % der Stickstoffdünger und 10-45 % der ausgebrachten Phosphatdünger von den Pflanzen aufgenommen werden, kann die Anwendung mikrobieller Biostimulanzien ein integriertes Düngemanagementsystem begünstigen, das die landwirtschaftliche Produktivität bei geringer Umweltbelastung unterstützt. Bei mikrobiellen Pestiziden sind die Dosis und die Umweltbedingungen zum Zeitpunkt der Anwendung des Produkts ebenfalls wichtige Faktoren, die ihre Wirksamkeit beeinflussen.

Alle oben genannten Aspekte werden in den Kapiteln dieses Buches detailliert, aber mit einem praktischen und leicht verständlichen Ansatz erläutert. Das Buch zielte darauf ab, den Transfer von Wissen zu unterstützen, das im Rahmen des EXCALIBUR-Projekts durch das Forschungsprogramm Horizont 2020 von der EU finanziert wurde, sowie aus anderen Projekten zu diesem Thema gewonnen wurde. Die Autoren hoffen, dass diese Bemühungen die Verringerung des Einsatzes von chemischen Mitteln durch eine vernünftige Anwendung von mikrobiellen Produkten bei Landwirten und anderen Fachleuten fördern, um negative Auswirkungen auf die Produktivität der Pflanzen zu vermeiden. Ein solcher durchdachter Einsatz würde sich stattdessen positiv auf die Umwelt sowie auf die Gesundheit von Mensch und Tier auswirken, die erwiesenermaßen alle miteinander verbunden sind.

***Prof. Dr. hab. Eligio Malusà und Dr. Krzysztof Ambroziak***

## Kapitel 1. Mykorrhizapilze zur Verbesserung der Aufnahmefähigkeit und des Wachstums von Gartenbaukulturen

Lidia Sas-Paszt<sup>1</sup>, Sławomir Głuszek<sup>1</sup>, Beata Sumorok<sup>1</sup>, Edyta Derkowska<sup>1</sup>, Anna Lisek<sup>1</sup>, Louisa Robinson Boyer<sup>2</sup>, Maria Grazia Tommasini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Das Nationale Institut für Gartenbauforschung, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLEN

<sup>2</sup>NIAB, East Malling, West Malling, Kent, ME19 6BD, VEREINIGTES KÖNIGREICH

<sup>3</sup>RI.NOVA, via dell'Arrigoni 120, 47522 Cesena - FC, ITALIEN

Ziel dieses Kapitels ist es, Mykorrhizapilze vorzustellen und ein besseres Verständnis für diese Pilze und ihr Potenzial zur Verbesserung gartenbaulicher Produktionssysteme zu fördern. Außerdem wird beschrieben, wie und wann es sinnvoll ist, diese Mikroorganismen zu nutzen, und welche Bedingungen oder Praktiken ihre positive Wirkung einschränken können.

### 1. Arten von Mykorrhizapilzen und ihre Fähigkeit zur Besiedlung von Pflanzen

Es gibt vier Haupttypen von Mykorrhizapilzen. Dazu gehören die Ektomykorrhiza, die arbuskuläre Mykorrhiza, die erikoide Mykorrhiza und die orchide Mykorrhiza. Ektomykorrhizen sind mit vielen Baumarten assoziiert, sie bilden gewundene Strukturen in den Wurzeln. Mykorrhiza sind oft wirtsspezifisch und bevorzugen jeweils bestimmte Arten. So sind nur Erika-Pflanzen wie Heidelbeeren und Preiselbeeren mit Ericoid-Mykorrhizen assoziiert, während Orchideen-Mykorrhizen nur mit ihren Orchideen-Wirten assoziiert sind. In diesem Kapitel werden wir uns auf die arbuskulären Mykorrhizapilze (AMF) konzentrieren. Die AMF sind allgegenwärtig und kommen in allen Teilen der Welt und terrestrischen Umgebungen vor.

Arbuskuläre Mykorrhizapilze sind mit etwa 250 Arten vertreten, die zur Abteilung Glomeromycota gehören, die in vier Ordnungen (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales und Paraglomerales) unterteilt ist und insgesamt 11 Familien umfassen. Die AMF gelten als einer der Faktoren, die für den Erfolg der Landbesiedlung durch Primärpflanzen verantwortlich sind, und ihre Fossilien reichen 450 Millionen Jahre zurück. Sie gehen mit fast 80 Prozent der auf der Erde vorkommenden terrestrischen Pflanzenarten eine Symbiose ein, darunter auch mit vielen der weltweit angebauten Nahrungspflanzen, wobei zu beachten ist, dass AMF keine Assoziationen mit den *Brassicaceae* eingehen.

Mykorrhizapilze gelten als ungeschlechtliche Organismen, die sich durch die Bildung großer Sporen an den Enden von Hyphen vermehren, die sich im Boden ausbreiten. In Anwesenheit einer lebenden Pflanze können die Sporen keimen. Das Myzel besiedelt die Wurzeln der Pflanzen und gibt im Gegenzug für Kohlenstoff Wasser und Nährstoffe an die Pflanze ab. Da sowohl der Pilz als auch die Pflanze davon profitieren, handelt es sich bei dieser Beziehung um eine gegenseitige Symbiose (Smith und Read 2008).

Wenn Hyphen von AMF mit einer Pflanzenwurzel in Kontakt kommen, bilden sie Appressorien auf der Oberfläche, wo die Pilze chemische Signale an die Pflanze abgeben, damit sie in die Rinde eindringen können. In der Wurzel angekommen, bildet das Myzel normalerweise intrazelluläre Windungen und breitet sich dann durch Wachstum innerhalb der primären Rindenzellen aus. Innerhalb der Rindenzellen der Pflanze verzweigt sich das Myzel und bildet Strukturen, die Arbuskeln genannt werden (Abb. 1.1). Über diese Arbuskeln findet der Wasser- und Nährstofftransfer zwischen der Pflanze und dem Pilz statt, daher auch der Name dieser

Mykorrhiza-Art. In der Wurzel können einige Arten auch Bläschen bilden, die Speicherfunktionen erfüllen. Die darin enthaltenen organischen Substanzen werden von den Pilzen in Zeiten geringer Stoffwechselaktivität der Wirtspflanzen genutzt.

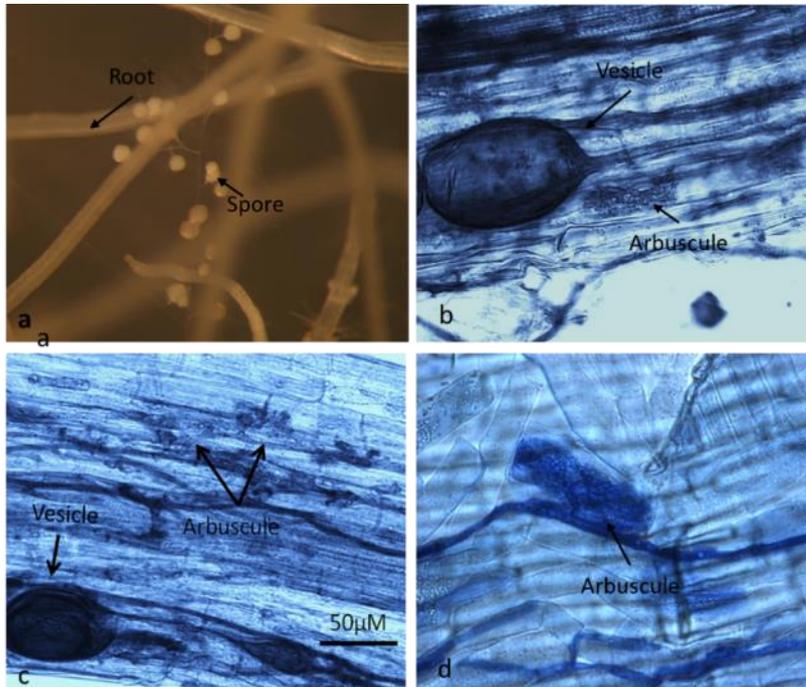


Abb. 1.1. Foto von AMF. Wurzelorgankultur mit Wurzelhyphen und Sporen, mit Trypanblau gefärbte Erdbeewurzeln mit Wurzelzellen, Hyphen, Bläschen und Arbuskeln.  
 Autorin: Louisa Robinson Boyer

Aufgrund der Notwendigkeit, den Einsatz von Chemikalien in der Landwirtschaft zu reduzieren, weil deren Verwendung eingeschränkt ist und die Kosten steigen, suchen die Landwirte nach alternativen nachhaltigen Lösungen, um die Ernteerträge zu sichern. AMF haben ein großes Potenzial für den Einsatz bei vielen Arten von Kulturpflanzen, die in der Landwirtschaft eine wichtige Rolle spielen, darunter zahlreiche Obstbaumarten, Weinreben, Sträucher, Erdbeeren, Gemüsepflanzen, Salate und Zierpflanzen. In letzter Zeit ist ein großes Interesse an der Verwendung von AMF in kommerziellen Systemen zu verzeichnen, was auch auf die Verfügbarkeit solcher kommerziellen Inokulumkulturen und auf die bekannten guten Praktiken zurückzuführen ist, die in Anbausystemen zur Erhöhung der einheimischen Populationen von Bodenmikroben eingesetzt werden.

Einige Obstpflanzenarten aus der Familie der Ericaceae, z. B. Highbush-Heidelbeere, Mittlere Heidelbeere, Heidelbeere, Preiselbeere, Cranberry, bilden erikoide Mykorrhiza, die sich deutlich von AMF unterscheiden und bei denen die Hyphen des Mykorrhizapilzes sowohl in die Interzellularräume als auch in das Innere der Wurzelzellen eindringen und Strukturen in Form von Spiralen bilden. Es ist auch ein kommerzielles Inokulum von Ericoid Mycorrhiza erhältlich.

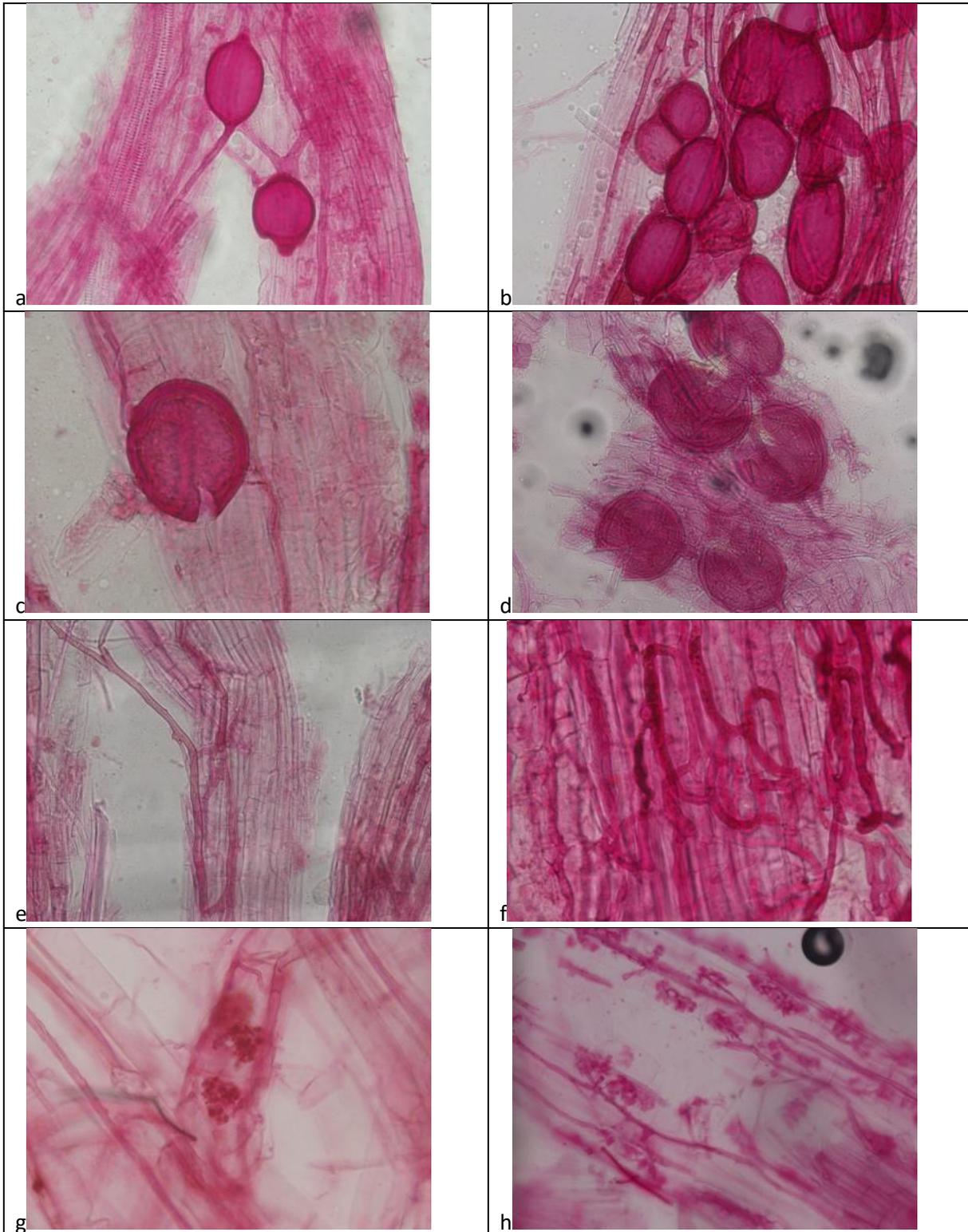


Abb. 1.2. Strukturen von Mykorrhizapilzen in Wurzeln. (a) Vesikel in der Wurzel einer Kontroll-Erdbeerpflanze, (b) Vesikel in der Erdbeerpflanze nach Inokulation mit nützlichen Mikroorganismen, (c) Sporen in der Wurzel einer Kontroll-Erdbeerpflanze, (d) Sporen in der Erdbeerpflanze nach Inokulation mit nützlichen Mikroorganismen, (e) Myzel eines arbuskulären Mykorrhizapilzes in der Wurzel einer Kontroll-Erdbeerpflanze, (f) Myzel eines arbuskulären Mykorrhizapilzes in der Wurzel einer Erdbeerpflanze nach Inokulation mit nützlichen Mikroorganismen, (g) Arbuskel in der Wurzel einer Kontroll-Erdbeerpflanze, (h) Arbuskeln in der Wurzel einer Erdbeerpflanze nach Inokulation mit nützlichen Mikroorganismen.

Quelle: Abteilung für Mikrobiologie und Rhizosphäre, Nationales Institut für Gartenbauforschung.

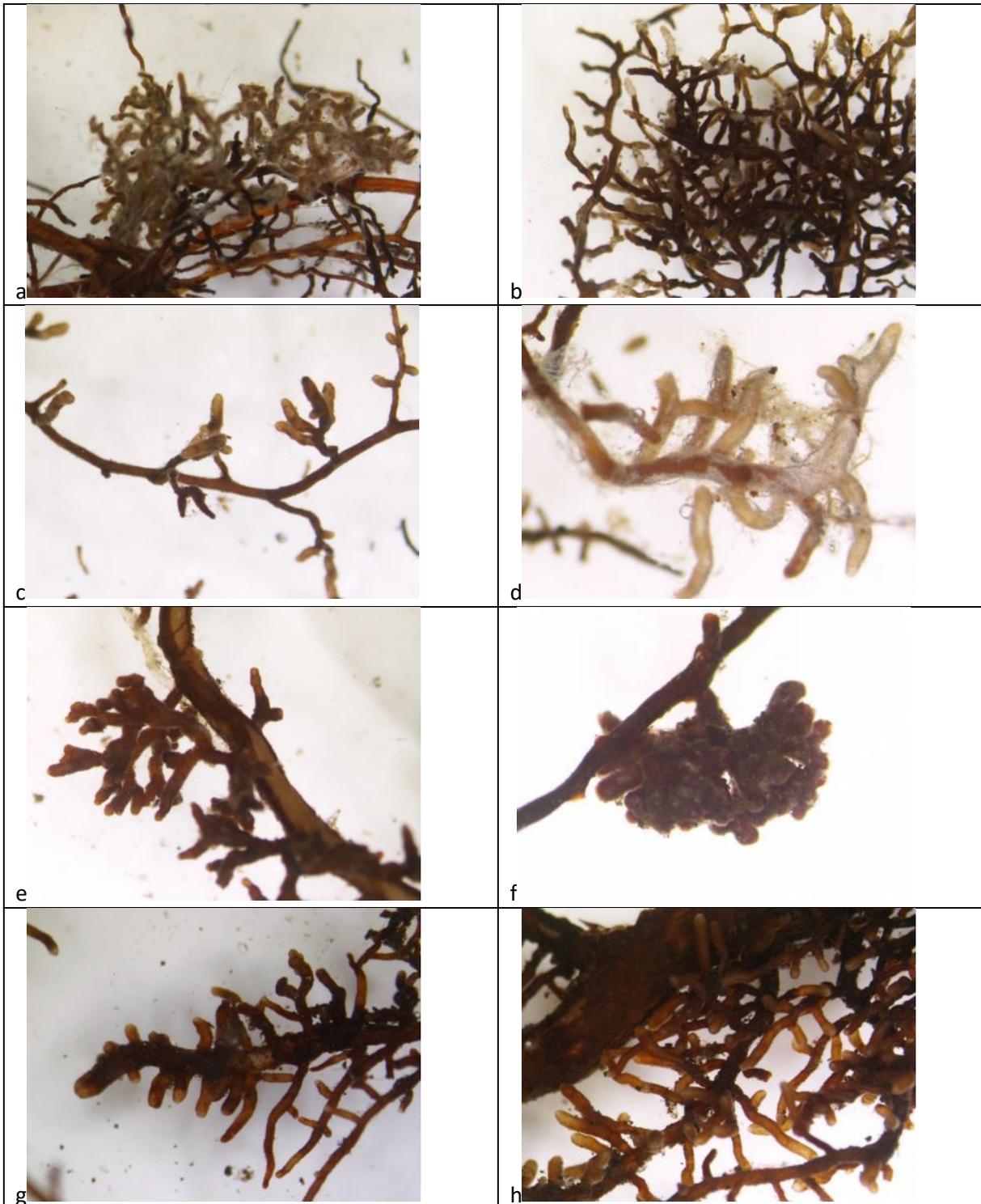


Abb. 1.3. Ektomykorrhizapilze in den Wurzeln von Waldpflanzen. (a) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Rotbuche in der Forstbaumschule Podanin, (b) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Weißbirke in einer Forstbaumschule in Radom, (c) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Hainbuche in der Forstbaumschule Białogard, (d) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln einer Stieleiche in der Forstbaumschule Białogard, (e) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Waldkiefer in der Forstbaumschule Gościniec, (f) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Waldkiefer in der Forstbaumschule Gościniec, (g) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Fichte in der Forstbaumschule Białogard, (h) Ektomykorrhiza auf den Wurzeln der Fichte in der Forstbaumschule Wałcz.  
Quelle: Abteilung für Mikrobiologie und Rhizosphäre, Nationales Institut für Gartenbauforschung.

## 2. Wirkung von AMF auf Pflanzenwachstum, Ertrag und Stresstoleranz

Die praktische Anwendung von Mykorrhizaprodukten wird seit vielen Jahren in mehreren Forschungszentren auf der ganzen Welt erforscht. Eine Reihe von Studien hat positive Auswirkungen der AMF-Behandlung auf das Wachstum einer Reihe von Gartenbaukulturen und Modellpflanzen gezeigt. AMF-Pilze verändern das Wachstum, die Morphologie und die Anzahl der Wurzeln und machen das Wurzelsystem der Pflanzen effizienter bei der Aufnahme von Wasser und Mineralstoffen aus dem Boden. In vielen Fällen sind Pflanzenwurzeln, die von arbuskulären Mykorrhizapilzen besiedelt sind, besser ausgebildet und haben mehr Seitenwurzeln.

Die wechselseitige Symbiose mit AMF bietet den Pflanzen zahlreiche Vorteile. Die bedeutendsten für Landwirte und Züchter sind eine gesteigerte Wasser- und Nährstoffaufnahme sowie eine deutlich ausgeprägte Resistenz gegen verschiedene Umweltbelastungen, sowohl biotische wie Schädlings- und Krankheitserregerbefall als auch abiotische wie Trockenheit, Staunässe und Hitzestress. Es ist bekannt, dass AMF durch die Verbesserung der Wasser- und Nährstoffaufnahme das Pflanzenwachstum und häufig auch den Ertrag fördern. Die Mykorrhizierung erhöht auch die Blattfläche und die photosynthetische Aktivität der Pflanze, was das Wachstum fördert.

Die AMF sind besonders wichtig für die Aufnahme von Phosphor, Stickstoff, Kalium, Magnesium und Mikroelementen, was die Pflanzengesundheit vor allem unter schlechten Bedingungen fördert. Ein Phosphatmangel schränkt das Wachstum der Pflanzen erheblich ein, zumal Phosphat-Ionen im Boden nicht sehr mobil sind. Sie bilden eine Reihe von unlöslichen Komplexen, die ihre Diffusion verlangsamen. Das äußere Myzel der AMF dringt viel tiefer in den Boden ein als die Wurzeln allein und bildet ein Hyphengeflecht, das die Aufnahme von Wasser und mineralischen Verbindungen aus dem Boden durch die Pflanzen und die Freisetzung organischer Verbindungen aus den Wurzeln in den Boden erleichtert. Das Hyphengeflecht reicht nicht nur weit über die Nährstoffaufnahmezone der Wurzeln hinaus und bietet eine größere Oberfläche für die Aufnahme, sondern die feinen Hyphenstränge können auch in kleinere Partikel eindringen und ansonsten unzugängliche Nährstoffe, andere Minimalverbindungen und Wasser aus Poren im Boden extrahieren. (Helgason und Fitter 2005). Marschner und Dell (1994) haben gezeigt, dass bis zu 80 % des in Pflanzen enthaltenen Phosphors von Pilzen der Abteilung Glomeromycota geliefert werden können. Es wurde nachgewiesen, dass eine effiziente Nutzung von Phosphor selbst unter Mangelzuständen im Boden dadurch gefördert wird, dass AMF Enzyme in den Boden absondern, welche Formen von Phosphor auflösen, die sonst für Pflanzen nicht verfügbar sind. Der Phosphor in den Filamenten wird mit der Bewegung des Zytoplasmas verlagert und liegt in einer wasserunlöslichen Form (Polyphosphate) vor, so dass niedrige Konzentrationen von stoffwechselaktivem Phosphor dessen kontinuierliche Aufnahme aus der Bodenlösung ermöglichen. Es hat sich gezeigt, dass Mykorrhiza in Apfelpflanzen auf phosphorarmen Böden die Effizienz der Phosphoraufnahme erhöht, während Mykorrhiza auf phosphorreichen Böden die Aufnahme von Zink- und Kupfer-Ionen erleichtert. Es gibt jedoch mehrere Studien, die zeigen, dass die Assoziation und die Abhängigkeit der AMF in Situationen, in denen Phosphor im Überfluss vorhanden ist, abnimmt. Ein sehr hoher Phosphorgehalt wirkt sich oft negativ auf das Ausmaß aus, in dem Pflanzen ihre Ressourcen in die AMF-Partnerschaft einbringen.

Auch andere wichtige Spurenelemente und Mineralien wie Kalium, Zink, Kalzium, Magnesium und Kupfer werden von AMF zur Pflanze transportiert. Es hat sich gezeigt, dass Pflaumen- und Kirschbäume, die mit einer

AMF-Spezies, *Glomus intraradices*, geimpft wurden, eine positive Wirkung auf den erhöhten Mikronährstoffgehalt des Pflanzengewebes und das Wachstum von Pflanzen auf phosphorarmen Böden hatten. Auch das verbesserte Wachstum von Weinreben verschiedener Sorten infolge der Mykorrhizierung ist eng mit der Aufnahme der folgenden Mineralien aus dem Boden verbunden: Phosphor, Stickstoff, Eisen, Kupfer und Zink.

Heute weiß man, dass AMF auch bei der Stickstoffübertragung auf Pflanzen eine wichtige Rolle spielen, indem sie die Aufnahme von Stickstoff aus dem Boden und die Assimilation von Stickstoff erleichtern. Die Forscher haben in den Arbuskeln Transporter für Stickstoff und andere Elemente sowie Aquaporine für Wasser beobachtet. Bestimmte AMF-Arten transportieren nachweislich auch Aminosäuren, z. B. Glycin und Glutamin, die aus dem Boden in die Wurzeln aufgenommen werden. Siehe Abbildung unten für den Nährstoffaustausch.

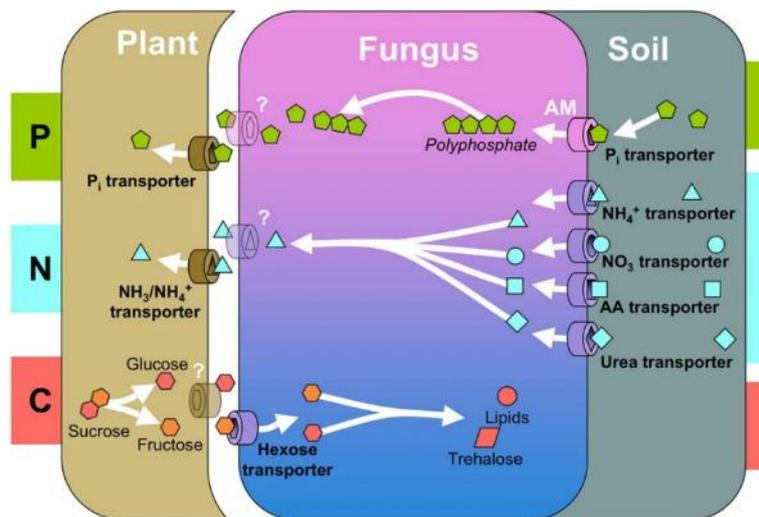


Abb. 1.4. Der Hauptnährstoffaustausch in AMF aus Bonfante und Genre (2010)

Im Allgemeinen beeinflussen nützliche Mikroorganismen das Pflanzenwachstum direkt durch die Synthese von Wachstumsregulatoren, organischen Säuren, Siderophoren, Biofilmbildung und antagonistische Wirkung gegen Boden- und Pflanzenpathogene. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die nützlichen Rhizosphärenbakterien als auch die Pilze in dieser Hinsicht ein hohes Potenzial aufweisen, das zu einem höheren Ertrag und einer besseren Ertragsqualität führt als bei Pflanzen, die mit herkömmlichen Mineraldüngern gedüngt wurden.

Angeichts des globalen Klimawandels und der Zunahme extremer Wetterereignisse ist es von entscheidender Bedeutung, Mechanismen zu finden, die die Widerstandsfähigkeit von Kulturpflanzen gegenüber diesen Belastungen erhöhen. Vieles deutet darauf hin, dass AMF eine wichtige Rolle bei der Wasserregulierung in Pflanzen spielen und zum Beispiel die Toleranz der Pflanzen gegenüber Trockenheit erhöhen. Es wurde festgestellt, dass die Wurzeln von Pflanzen, die in trockenen Umgebungen wachsen, intensiv von Mykorrhizen besiedelt werden, und die Besiedlung von Nutzpflanzen, die in diesen Gebieten wachsen, durch AMF kann die Größe und Qualität der Pflanzenerträge (Al-Karaki et al. 2004) und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Dürreperioden effektiv erhöhen. Ebenso mehren sich die Hinweise darauf, dass AMF den Pflanzen helfen können, Staunässe (durch vermehrte Regenfälle und Hitzestress) zu ertragen.

Es hat sich gezeigt, dass sich die Dynamik der AMF in den Wurzeln je nach Stress und Jahreszeit verändert. So schwankte beispielsweise der Grad der Wurzelbesiedlung von Weinreben (Pinot Noir) in einem 20 Jahre alten Weinberg über zwei Jahre hinweg von 20 % während des Knospenaufbruchs bis zu 50 % Ende Juni/Anfang Juli. Ende Oktober/Anfang November, während einer Periode mit sehr starken Regenfällen, sank der Grad der AMF-Besiedlung dagegen auf fast Null. Ein weiterer Effekt, der beobachtet wurde, ist, dass die Beimpfung der Rebwurzeln mit *Glomus iranicum*-Mykorrhizapilzen die Auswirkungen von Wasserstress verringert, die Photosyntheserate und den Traubenertrag verbessert und auch die Reifung der Tafeltrauben beschleunigt.

Experimente von Martins et al. (1997) zeigten positive Auswirkungen der Mykorrhizierung von Kastanien (*Castanea sativa*) auf das vegetative Wachstum und die photosynthetische Aktivität der Pflanzen. Arbuskuläre Mykorrhizapilze können auch den Ertrag von nicht halophilen Pflanzen erhöhen, die auf salzhaltigen Böden wachsen. Eine weitere Wirkung von AMF ist die Produktion von Glomalinen, das Bodenpartikel zusammenhält und die Bodenaggregation erhöht, was sich stabilisierend auf den Boden auswirkt und dazu beiträgt, Bodenerosion und Auswaschung zu verhindern. AMF unterstützen bodenbildende Prozesse und tragen zur Vielfalt der Pflanzendecke bei, insbesondere auf erodierten und stark kontaminierten Böden.

Mykorrhizapilze spielen über eine Reihe von Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber biotischem Stress wie Schädlings- und Pathogentoleranz. Die Besiedlung der Wurzeln durch AMF kann die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze stimulieren und Faktoren der induzierten systemischen Resistenz hervorrufen, die die Wirkung von Schädlingen und Krankheitserregern verringern können. Darüber hinaus wird die Gesundheit und Vitalität der Pflanzen durch die verbesserte Nährstoff- und Wasserversorgung verbessert, was sie weniger anfällig für Angriffe macht. Darüber hinaus können AMF mit Krankheitserregern um Ressourcen wie Platz und Nährstoffe konkurrieren und so die Besiedlung und Ausbreitung von Krankheitserregern in der Wurzelzone der Pflanze verringern. So aktivieren AM-Pilze in einigen Rebsorten Abwehrmechanismen gegen parasitäre Nematoden und erhöhen gleichzeitig ihre Trockentoleranz.

Diese symbiotische Interaktion ist jedoch mit Kosten für die Pflanze verbunden, die ihre AMF-Partner aufnimmt. Kohlenstoff wird von der Pflanze auf den Pilz übertragen, was bei sehr jungen Pflanzen, in der Anfangsphase der Etablierung und in Situationen, in denen die Pflanzen nicht mit dem gesamten Nährstoffbedarf versorgt werden, zu einem geringeren Wachstum führen kann. Im Allgemeinen steigt das Nutzen-Kosten-Verhältnis, wenn die Pflanze wächst oder mit Stress oder Herausforderungen konfrontiert wird.

In einigen Fällen erhöhen Mykorrhizapilze auch die Effizienz der Aufnahme und Akkumulation von Schwermetallionen (z. B. Kupfer, Zink, Cadmium, Blei oder Kobalt) sowie von Chlorid- und Sulfat-Ionen. Mykorrhizapilze erhöhen auch die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegen die schädlichen Auswirkungen übermäßiger Schwermetalle und Bodenverunreinigungen, z. B. aromatische Verbindungen. Die Mykorrhizierung von Pflanzen trägt jedoch auch zu einer erheblichen Reinigung der im Boden vorhandenen organischen Schadstoffe bei, weshalb solche AMF bei der Phytosanierung kontaminierter Flächen eingesetzt werden.

### 3. Formulierungen und Anwendungsrichtlinien für verschiedene gartenbauliche Anbausysteme

In den letzten Jahren ist die Nachfrage nach Mykorrhizaprodukten für die Landwirtschaft und den Gartenbau und deren Herstellung gestiegen, da viele Landwirte das Potenzial für den Einsatz in nachhaltigen Kulturen erkannt haben. Formulierungen gibt es in einer Vielzahl von Formaten, darunter trockene Granulate und Pulver, Flüssigkeiten, Saatgutbeschichtungen und Beizmittel. Die meisten Formulierungen enthalten je nach Verwendungszweck entweder eine Mischung von AMF-Arten oder ausgewählte einzelne Arten. Die Herstellung von Mykorrhiza-Inokulum-Produkten kann eine Herausforderung darstellen, da sie nur in Gegenwart von Wirtspflanzen (d. h. obligaten Symbionten) gezüchtet werden können.

Mykorrhizapilzprodukte werden in der EU unter der Verordnung über Düngemittel und pflanzliche Biostimulanzien Anhang II geregelt (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1768>). Sie werden als Düngemittel eingestuft, weil sie die Pflanzenernährung und die Bodenfruchtbarkeit verbessern sollen. Mykorrhizapilzprodukte hingegen fallen nicht unter dieselbe Verordnung wie Biokontrollmittel, da sie nicht als Pflanzenschutzmittel eingestuft werden. Die nationalen Gesetze sind in den EU-Ländern unterschiedlich, so dass für die Zulassung von Mykorrhizapilzprodukten die lokalen Richtlinien und Grundsätze befolgt werden müssen. Folglich müssen die Hersteller dieser Produkte das Produkt in jedem EU-Land, in dem sie es verkaufen wollen, registrieren lassen.

Viele Produkte enthalten AMF-Arten, die in vielen landwirtschaftlichen und gärtnerischen Umgebungen vorkommen, insbesondere Rhizophagus- und *Funneliformis*-Arten (früher bekannt als *Glomus*). In dem Maße, wie die Produktionstechnologie zunimmt, steigt auch die Zahl der AMF-Arten, die in Produkten enthalten sind, und der maßgeschneiderten Produkte für verschiedene Umgebungen. Obwohl man davon ausgeht, dass AMF in ihrem Besiedlungspotenzial für verschiedene Arten unspezifisch sind, ist es wichtig, den vielfältigen Pool von AMF-Arten nach ihren Wirts- und Umweltpreferenzen zu klassifizieren. Auf diese Weise lassen sich die besten Strategien für die Formulierung des Inokulums und die Produktions- und Anwendungsverfahren ermitteln, die für unterschiedliche Bedingungen geeignet sind (z. B. Freiland, Gewächshaus, Transplantationsphase, In-vitro-Vermehrungsphase, Stadtbegrünung usw.). Daher ist eine geeignete Technologie für die Herstellung von Inokula sowie von Formulierungsmedien der Schlüssel zu ihrer wirksamen Anwendung.

Obwohl die Beimpfung von Pflanzen mit Mykorrhizapilzen eine bekannte Praxis ist, wird ihr breiterer Einsatz in einigen Fällen immer noch durch die Formulierung von Inokula behindert, die unter Feldbedingungen eine zuverlässige und konsistente Wirkung gewährleisten. Aber es ist wichtig, dass die wachsende Gemeinschaft sich der Verwendung dieser Produkte bewusst wird und wie ihre Anwendung sich von herkömmlichen chemischen Ansätzen unterscheidet. Insbesondere unterscheiden sich die einzelnen Produkte in ihren Anwendungsraten und Anwendungshinweisen. Daher sollten bei der Anwendung die Richtlinien der Hersteller befolgt werden.

Im Allgemeinen sind bei der Anwendung von AMF im Ackerbau eine Reihe von Schlüsselfaktoren zu berücksichtigen:

- Anwendung - Jedes AMF-Inokulum muss direkt auf die Pflanzenwurzeln aufgetragen werden: entweder als Wurzeldip, beim Umpflanzen in einem Loch in der Nähe der jungen Pflanze oder

unter/neben dem Saatgut bei der Keimung. Es ist vorzuziehen, die Pflanzen in ihren frühen Entwicklungsstadien zu inokulieren.

- Umwelt - Die Umwelt kann AMF beeinflussen, und bestimmte Formulierungen können unter bestimmten Umweltbedingungen besser geeignet sein. Insbesondere die Art der Kultur, die Bodenbedingungen und die Anbaumethoden können eine wichtige Rolle für die Wirkung der AMF-Anwendung und ihrer Formulierung spielen. So muss beispielsweise bekannt sein, dass ein hoher Einsatz von Chemikalien die Wirksamkeit von AMF beeinträchtigen kann (d. h. ein sehr hoher Nährstoffgehalt, insbesondere von P, stellt ein Risiko für die Verbindung von AMF mit Wurzeln dar). Bei extremen Umweltbedingungen wie übermäßiger Hitze, niedrigem pH-Wert und hohem Wasserstand ist es ratsam, spezifische AMF-Arten zu wählen, die sich besser an solche Bedingungen anpassen. Es lohnt sich, auf den richtigen pH-Wert des Bodens zu achten, da ein pH-Wert unter 5,5 die Wurzelbesiedlung durch arbuskuläre Mykorrhizapilze einschränkt.
- Behandlung nach der Pflanzung - Die Wirkung der Behandlung nach der Pflanzung könnte einen Einfluss auf die erfolgreiche Assoziation von AMF haben. Ein sehr hoher Einsatz von Fungiziden kurz nach der Pflanzung könnte die Chancen für eine Besiedlung stark verringern. Viele Fungizide und Herbizide sind mit AMF verträglich, allerdings ist eine sorgfältige Auswahl und ein sorgfältiger Zeitpunkt der Anwendung angebracht. AMF brauchen eine lebende Wirtspflanze, um zu überleben. Prozesse, die den Boden ohne lebende Pflanzen lassen, wie Bodenbearbeitung, Rodung von Obstplantagen, Unkrautbekämpfung oder Bracheperioden, würden die Lebensfähigkeit der AMF im Boden schnell beeinträchtigen.
- Kosten-Nutzen-Erwägungen - Die Kosten, die dem Landwirt durch die Ausbringung des Inokulums entstehen, müssen als angemessen und wirtschaftlich tragbar angesehen werden. Die Bewertung des Nutzens für kurzzyklische Kulturen (z. B. Kräuter und Salate) im Vergleich zu mehrjährigen Kulturen (Obstbäume und Wälder) müsste zusammen mit dem Nutzen für die Kulturen analysiert werden, insbesondere für solche, die hohe Ansprüche an die Nährstoffumgebung stellen. Einige Anbausysteme eignen sich möglicherweise besser für den Einsatz von AMF als andere.
- Wechselwirkungen mit anderen Organismen - Die Wechselwirkung zwischen AMF und anderen nützlichen Mikroben scheint ihr Potenzial zu erhöhen. So zeigen viele Studien, dass maßgeschneiderte Gemeinschaften aus unterschiedlichen AMF-Arten und anderen nützlichen Pilzen wie Trichoderma und nützlichen Bakterien einen größeren Nutzen und eine stärkere Besiedlung mit AMF aufweisen.

#### **4. Bewirtschaftung von Kulturpflanzen zur besseren Nutzung der AMF-Aktivität durch Vorschläge für Bewirtschaftungspraktiken, die die Effizienz der AMF beim Anbau und Ertrag von Kulturpflanzen erhöhen**

Viele Aspekte der konventionellen landwirtschaftlichen Bewirtschaftungsmethoden beeinträchtigen die Vielfalt und den Artenvielfalt der AMF. Der zunehmende Einsatz von Monokulturen, der die oberirdische Artenvielfalt verringert, reduziert die Bodenmikrobiologie unter der Erde, einschließlich der AMF. Der hohe Einsatz chemischer Mittel in der Landwirtschaft, die für den modernen Ackerbau erforderlichen Düngemittelmengen (mit übermäßigem Phosphatgehalt) sowie der Einsatz von Pestiziden und Fungiziden verringern die Populationen dieser wichtigen Mikroben. Die meisten Züchtungsprogramme berücksichtigen nicht, wie neue Genotypen mit den Bodenmikroben interagieren, und viele neuere Sorten haben einen

geringeren Bedarf an der Aufnahme von AMF. Die Böden in der Landwirtschaft mit hohem Input bieten wahrscheinlich weniger günstige Bedingungen für die Mikroben, da sie wenig organische Substanz enthalten und eine geringere Bodenstruktur aufweisen. Viele Kulturpflanzen werden heute auch in erdfreien Substraten wie Kokosfasern angebaut. Diese Substrate sind frei von Mikroben, so dass handelsübliche Präparate entscheidend sein können. All diese modernen Praktiken führen zu einer Verringerung der Bodenbiologie in den Böden der Landwirtschaft und des Gartenbaus.

Wenn der Einsatz von nützlichen Mikroorganismen und AMF im kommerziellen Gartenbau besser genutzt werden soll, müssen wir die Praktiken berücksichtigen, die die Entwicklung von AMF fördern. Wenn kommerzielle Präparate in kommerziellen Systemen eingesetzt werden, müssen wir überlegen, wie wir ihr Überleben und ihre Langlebigkeit im kommerziellen Anbau am besten sicherstellen können. Viele Landwirte denken auch darüber nach, wie einheimische AMF-Populationen wiederbelebt oder durch die Anwendung nachhaltiger Methoden und Eingriffe gefördert werden können.

Es gibt zahlreiche Studien, in denen die Auswirkungen von Anbaumethoden unter verschiedenen Boden- und Klimabedingungen untersucht wurden. Obwohl Umwelt, Bodenart und Standort die in diesen Studien gesammelten Daten variieren lassen, lassen sich allgemeine Muster erkennen:

- Bodenstörung - Bodenbearbeitung und Bodenstörung (z. B. Rodung in Obstplantagen) haben große Auswirkungen auf die AMF-Populationen im Boden. Eine übermäßige Störung des Bodens unterbricht die etablierten Hyphennetze im Boden und verringert die positiven Auswirkungen der AMF. Mechanische Bodenbearbeitung wirkt sich auf AMF-Gemeinschaften aus und führt im Vergleich zu ungestörten Böden zu einer geringeren Sporenzahl, einer geringeren Wurzelbesiedlung, einer geringeren taxonomischen Vielfalt der AMF und einer Abnahme des extra-radikalen Myzels. Oehl et al. [2003] stellten fest, dass intensive Bodenbearbeitung die Vielfalt der Mykorrhizapilze verringert. Diese Arbeit wurde auf Acker- und Grünland durchgeführt, aber die Ergebnisse lassen sich auch auf intensive Obstbaumkulturen übertragen. Um die AMF-Populationen in den Böden zu erhalten und zu fördern, sollten die Landwirte die Beeinträchtigung ihrer Böden so weit wie möglich reduzieren.
- Chemische Anwendung - Obwohl viele Fungizide mit AMF kompatibel sind, sollte darauf geachtet werden, ihre Anwendung zu reduzieren und den Rat von Inokulumherstellern einzuholen, um sicherzustellen, dass die richtige Chemie angewendet wird. Der Zeitpunkt der Anwendung von Fungiziden ist ebenfalls wichtig, und eine übermäßige Bewässerung in der frühen Phase der AMF-Etablierung ist nicht zu empfehlen. Die Verträglichkeit von Glyphosat mit AMF war in den letzten Jahren Gegenstand von Diskussionen, und es ist immer noch nicht ganz klar, wie AMF-Populationen durch diese Chemikalie beeinflusst werden.
- Einsatz von Düngemitteln - Ein sehr hoher Einsatz von Düngemitteln verhindert eindeutig, dass die Pflanzen ihre Ressourcen für die Bildung von Partnerschaften mit AMF einsetzen. Um eine ausreichende Pflanzenproduktion zu gewährleisten, müssen die Landwirte die Pflanzen düngen, doch sollte dies reduziert werden, wenn AMF in dem System gefördert werden sollen, damit der Landwirt Geld für teure Chemikalien spart und auf Nachhaltigkeit hinarbeitet. Ein sehr hoher Gehalt an leicht verfügbarem Phosphor wird die schädlichsten Auswirkungen haben. Um den AMF Ressourcen für die Nahrungssuche zu bieten und für eine bessere Bodenstruktur und Drainage

sorgen, ist es auch wichtig, einen ausreichenden Gehalt an organischer Substanz im Boden zu erhalten.

- Kulturpflanzenvielfalt - Die oberirdische Artenvielfalt ist wichtig, um die Artenvielfalt der AMF zu fördern. In landwirtschaftlichen Betrieben kann dies durch eine größere Vielfalt von Nichtkulturpflanzen erreicht werden, z. B. durch Wildblumenstreifen, Deckfrüchte, Zwischenpflanzungen und Fruchtfolgen. Aufgrund der obligaten Symbiose der AMF würde ein kahler Boden über längere Zeiträume ohne lebende Wurzeln die Populationen stark reduzieren.

Die Umsetzung dieser Bewirtschaftungsstrategien in kommerziellen Betrieben kann sicherstellen, dass ein für AMF günstiges Umfeld geschaffen werden kann. Wenn man versteht, dass unterschiedliche Strategien in Betracht gezogen werden müssen, wenn die Biologie (und nicht die traditionelle Chemie) auf kommerzielle Systeme angewandt wird, könnte der Einsatz von AMF eine wichtige Triebkraft für die Erreichung eines nachhaltigen Anbaus sein. Es sind weitere Forschungsarbeiten erforderlich, um einfache und zuverlässige Feldversuche im kommerziellen Gartenbau zu konzipieren, um die Auswirkungen von AMF-Gemeinschaften auf das Pflanzenwachstum, die Erträge und die Nachhaltigkeit von Agrarökosystemen zu quantifizieren.

Studien zeigen einen Unterschied zwischen der Zusammensetzung der AMF-Gemeinschaft auf Gattungsebene von ökologischen und konventionellen Anbausystemen, wobei ökologische Anbaumethoden die Artenvielfalt der AMF-Familien in den Böden erhöhen, wobei jedoch oft die häufigsten Gattungen in beiden Systemen zu finden sind. Ökologischer Landbau kann die AMF-Gemeinschaften im Boden positiv oder neutral beeinflussen (Manoharan et al. 2017). Im ökologischen Anbau kann die Artenvielfalt der AMF Familie Gigasporaceae im Boden gesteigert werden. Allerdings ist die hohe Konzentration von C und N im Boden der Hauptfaktor, der in herkömmlichen Anbausystemen zu einem Rückgang der AMF-Artenvielfalt führt (Wadhan et al. 2021). Darüber hinaus beeinflussten Bodenfaktoren wie der Gehalt an N, P und K sowie das C/P- und N/P-Verhältnis die gesamte AMF-Gemeinschaft.

Einige Studien zeigen, dass AMF-Gemeinschaften in landwirtschaftlichen Böden auf langfristige landwirtschaftliche Anbausysteme reagieren und gegen kurzfristige Sommertrockenheit resistent sind. Es ist nicht bekannt, ob die Fähigkeit der AMF-Gemeinschaften, Trockenheit zu tolerieren, von den Bodeneigenschaften, der Vielfalt und Zusammensetzung der AMF-Gemeinschaften oder von den damit verbundenen Pflanzengemeinschaften abhängt. Es ist klar, dass wir angesichts des globalen Temperaturanstiegs und der Häufigkeit extremer Wetterereignisse, einschließlich Hitze und Niederschlag, verstehen müssen, wie sich dies auf die AMF-Populationen auswirkt und wie wir diese Pilze besser nutzen können, um die Widerstandsfähigkeit der wichtigsten Gartenbaupflanzen gegenüber diesen Herausforderungen zu erhöhen.

Das Fehlen solider Inokulationsverfahren und groß angelegter Studien mit Kosten-Nutzen-Analysen für den Einsatz von AMF ist nach wie vor ein großes Hindernis für die stabile Einführung von AMF in Anbauprotokolle.

## Referenzen

Al-Karaki G., McMichael B., Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, 14, 263-269.

Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, 1(1), 48.

- Helgason T., Fitter A. 2005. The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist*, 19(3), 96–101.
- Manoharan L., Rosenstock N. P., Williams A., Hedlund K. 2017. Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. *Applied Soil Ecology*, 115, 53-59.
- Marschner H., Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159, 89–102.
- Martins A., Casimiro A., Pais M.S. 1997. Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. *Mycorrhiza*, 7, 161-165.
- Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A., 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied Environmental Microbiology* 69, 2816–2824.
- Smith S. E., Read D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. Academic Press, San Diego.
- Wadhan S.F.M., Reitz T., Heintz-Buschart A., Schädler M., Roscher R., Breitzkreuz C., Schnabel B., Purahong W., Buscot F. 2021. Organic agricultural practice enhances arbuscular mycorrhizal symbiosis in correspondence to soil warming and altered precipitation patterns. *Environmental Microbiology*, 23(10), 6163–6176.

## Kapitel 2. Mikrobielle Produkte für die biologische Schädlingsbekämpfung bei Gartenbaupflanzen

Magdalena Ptaszek<sup>1</sup>, Małgorzata Tartanus<sup>1</sup>, Massimo Pugliese<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Das Nationale Institut für Gartenbauforschung, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLEN

<sup>2</sup>Universität Turin - Agroinnova, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), ITALIEN

Der Pflanzenschutz ist eine der größten Herausforderungen im modernen Gartenbau. Daher werden neue Ansätze entwickelt, darunter der Einsatz von Mikroorganismen als nachhaltige und wirksame Biopestizide. Ziel dieses Kapitels ist es, die Möglichkeiten des Einsatzes nützlicher Mikroorganismen im Pflanzenschutz sowohl gegen blatt- als auch bodenbürtige Krankheitserreger und Schädlinge aufzuzeigen. Darüber hinaus werden die Multifunktionalität von Mikroorganismen in der Pflanzenproduktion sowie die Vor- und Nachteile ihres Einsatzes dargestellt. Viel Aufmerksamkeit wurde den Bedingungen gewidmet, die bei der Anwendung von mikrobiellen Produkten erfüllt sein sollten, sowie den Faktoren, die das Erreichen einer hohen Wirksamkeit beeinflussen, und den praktischen Aspekten der Verwendung von Biopestiziden, die verschiedene Mikroorganismen enthalten. Schließlich wurde auch die Frage der rechtlichen Regelungen für die Vermarktung von Bioprodukten erörtert.

### 1. Verwendung von Mikroorganismen zur biologischen Schädlingsbekämpfung

Mikroorganismen und ihre Gemeinschaften (Mikrobiom) spielen eine grundlegende Rolle für die biologische Vielfalt und das Funktionieren aller anderen lebenden Organismen und treiben die Evolution und ökologische Anpassung seit dem Beginn des Lebens auf der Erde voran. Die Beziehung zwischen Wirt und Mikrobiom wirkt sich unabhängig vom Organismus - Pflanze, Tier oder Mensch - auf die Fähigkeit des Wirts aus, mit abiotischen und biotischen Belastungen umzugehen, und hat biologische (z. B. in der Physiologie oder im Stoffwechsel) und ökologische (z. B. in den Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Parasiten) Auswirkungen, die für die wirtschaftlichen und sozialen Aktivitäten des Menschen von Bedeutung sind. Es wird daher immer deutlicher, dass ein angemessenes Management des Mikrobioms in landwirtschaftlichen Systemen eine nachhaltige und umweltverträgliche Produktion fördern kann. Produkte, die auf Mikroorganismen basieren oder aus ihnen gewonnen werden, können daher ein wirksames Instrument für die Bewirtschaftung des Boden- und/oder Pflanzenmikrobioms sein.

Die Geschichte der Verwendung von nützlichen Mikroorganismen in der Landwirtschaft begann im 19th Jahrhundert. Seitdem wurden viele wichtige Studien über die Isolierung einzelner Bakterien- und Pilzstämmen, ihre Charakterisierung und ihre mögliche Verwendung als Biopestizide oder Biodünger durchgeführt. Biopestizide sind definiert als Pflanzenschutzmittel, die Gruppen von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze sowie Nematoden enthalten. Die Liste der derzeit von der Europäischen Union zugelassenen "mikrobiologischen Wirkstoffe" finden Sie unter: [https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en). In Anbetracht der Bestimmungen der Biodiversitätsstrategie der Europäischen Union, die den Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel bis 2023 um 50 % reduzieren will, werden Biopestizide in der landwirtschaftlichen Praxis weltweit eine Schlüsselrolle spielen. Aus diesem Grund stellt die Verwendung von mikrobiellen Produkten eine praktikable Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln dar. Dies zeigt sich an der zunehmenden Anzahl von mikrobiellen Produkten, die im Rahmen des integrierten Schädlings- und

Krankheitsmanagements erhältlich sind. Es sollte auch erwähnt werden, dass viele Produkte, die mikrobielle Inokulanzen enthalten und eine Aktivität zur Bekämpfung von Krankheitserregern und Schädlingen aufweisen, nicht als Pflanzenschutzmittel registriert sind, sondern als mikrobielle Zubereitungen, die die mikrobielle Aktivität im Boden stimulieren oder sich positiv auf das Pflanzenwachstum und den Ertrag auswirken. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Europäischen Union das Registrierungsverfahren, die Anforderungen und die Kosten für Pestizide auf mikrobieller Basis ähnlich sind wie für chemische Pestizide (Verordnung EG 1107/2009).

Aber das chemische Paradigma, in dem ein Produkt verwendet wird, um Schädlinge effektiv, leicht und rasch zu beseitigen, bleibt bestehen. Biopesticide werden oft als einfacher Ersatz für chemische Pestizide angesehen. Ein solcher Ansatz ist zweifellos nicht passend, da er die verschiedenen Faktoren nicht berücksichtigt, die die Wirksamkeit der Kontrolle mit sogenannten „lebenden Material“-Biopestiziden beeinflussen. Ein alternativer, möglicherweise besserer, komplementärer Ansatz zur Verwendung von Biopestiziden besteht darin, das Anbauumfeld zu verändern, um die Population der einheimischen Mikroorganismen zu erhöhen, um eine gewisse Schädlings- oder Krankheitsschutzmaßnahme zu gewährleisten (konservative Biokontrolle). Bei der Bekämpfung von Schädlingen (z. B. Insekten und anderen Arthropoden) stellen entomopathogene Pilze die Biopestizide dar, die die hilfreichsten Lösungen bereitgestellt haben. Laut einer aktuellen globalen Umfrage sind 129 mykoinsektizide Produkte erhältlich (de Faria und Wraight 2007). Die für diesen Zweck hauptsächlich verwendeten Arten gehören zu den Ascomyceten und umfassen *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* und *Isaria fumosorosea*. Diese Arten sind häufig Generalisten, d. h. sie parasitieren eine Vielzahl von Schadinsektenarten, einige sind jedoch spezialisiert (z. B. parasitiert *B. brongniartii* nur Arten der Gattung *Melolontha*) (Zimmermann 2007). Für Insekten pathogene Viren sind jedoch von zunehmendem Interesse, auch wenn die Entwicklung einer Resistenz eines Schadinsekts gegen einen Insektizidstamm ein wichtiger Faktor bei der Bestimmung des richtigen Einsatzes solcher Produkte zu sein scheint, wie im Fall des Apfel-Granulovirus *carpocapsa* deutlich wurde.

Der Ansatz der Besprühung von Kulturen mit einem mikrobiellen Wirkstoff, d. h. die Ausbringung von Biopestizidformulierungen, ist analog zu dem der synthetischen Pestizide: Die Insektenbekämpfung erfolgt ausschließlich durch den eingesetzten Organismus (Jaroński 2010). Die technischen Gründe für den Einsatz der Überschwemmung hängen mit der Biologie der entomopathogenen Arten zusammen, aber auch mit der Tatsache, dass die meisten Anbausysteme und die damit verbundenen Schädlinge vorübergehend sind, d. h. nur für eine Vegetationsperiode, manchmal nur für einige Wochen. Durch die vorübergehende Unterbrechung des kulturellen Lebensraums werden nicht nur die Schädlinge beseitigt, sondern in vielen Fällen auch die mikrobiellen Wirkstoffe, die sie bekämpfen können. Daher sind wiederholte Anwendungen erforderlich, wodurch ein chemisches Paradigma, das dem Landwirt vertraut ist, auf die Biopestizide übertragen wird, da er die nützlichen Pilze einfach wie chemische Pestizide ausbringt. Für Biofungizide, die zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten eingesetzt werden, gibt es Formulierungen, die sowohl vor als auch nach der Ernte angewendet werden können. Doch auch hier ist die Vielfalt der Arten und Stämme, die für ihre biologische Bekämpfungswirkung bekannt sind, nicht mit der Zahl der als Wirkstoffe zugelassenen Mikroorganismen vergleichbar. Darüber hinaus befassen sich die meisten zugelassenen Stämme (z. B. *Trichoderma* sp.) mit der Bekämpfung von bodenbürtigen Krankheitserregern (Ptaszek et al. 2023). In letzter Zeit wächst jedoch das Interesse an Biofungiziden, die die Möglichkeit bieten, auf dem Feld, aber auch

während der Lagerung auftretende Infektionen (z. B. durch *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. usw.) zu bekämpfen (Sellitto et al. 2021). Durch den Einsatz von Biofungiziden vor der Ernte werden die Risiken vermieden, die sich aus dem Vorhandensein von Pestizidrückständen ergeben, die die in den EU-Rechtsvorschriften festgelegten Grenzwerte nicht einhalten. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass in der letzten Aktualisierung der Verordnung (EG) 1107/2009 über Pestizidwirkstoffe, für die keine Rückstandshöchstgehalte festgelegt werden müssen, 21 der 39 aufgeführten Wirkstoffe auf mikrobieller Basis sind. Zusätzlich zu den Faktoren, die die Wirksamkeit der während des Anbaus verwendeten Bioinokulanzien beeinflussen, muss berücksichtigt werden, dass die Nacherntephase durch physikalisch-chemische Eingriffe (z. B. Waschen oder Veränderung der Lageratmosphäre) gekennzeichnet ist, die zur Konservierung oder Verlängerung der Haltbarkeit der Erzeugnisse eingesetzt werden und somit einen weiteren Faktor der Variabilität darstellen.

Darüber hinaus verringert die Verwendung von Produkten auf mikrobieller Basis das Risiko einer Resistenz gegen Krankheitserreger, die bei der Anwendung von Pestiziden häufig auftritt. Die Wirkung von Mikroorganismen im Pflanzenschutz kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen, sowohl auf direkten als auch auf indirekten. Die direkten Auswirkungen auf den Erreger beruhen auf mikrobiellem Antagonismus durch Antibiose, Konkurrenz um Nährstoffe oder Besiedlung und Parasitismus. Mikroorganismen können auch die Wachstumsbedingungen stören, die für die Entwicklung von Krankheitserregern notwendig sind. Der indirekte Mechanismus beinhaltet die Induktion einer Resistenz in der Pflanze, die zu einer verringerten Proliferation, Aggressivität oder Schädigung des Pathogens führen kann.

Mikroorganismen, die im biologischen Pflanzenschutz eingesetzt werden, müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, um einen wirksamen Beitrag zum Schutz der Pflanzen vor Schädlingen oder Krankheitserregern zu leisten:

- sie müssen für die menschliche Gesundheit sicher sein,
- sie müssen genetisch stabil sein und eine hohe Lebensfähigkeit und Resistenz gegenüber Umweltschwankungen aufweisen,
- sie sollten einen mäßigen Nährstoffbedarf haben und schnell wachsen,
- sie sollten spezifisch für den betreffenden Schädling oder Krankheitserreger sein, um nachteilige Auswirkungen auf Nützlinge und unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden,
- sie sollten mit verschiedenen Anbausystemen kompatibel sein, einschließlich der Verwendung von Düngemitteln und anderen Pflanzenschutzmitteln,
- sie sollten Schädlinge oder Krankheitserreger wirksam bekämpfen können. Ihre Fähigkeit, sich anzusiedeln und mit Krankheitserregern zu konkurrieren, ist ein Schlüsselfaktor.

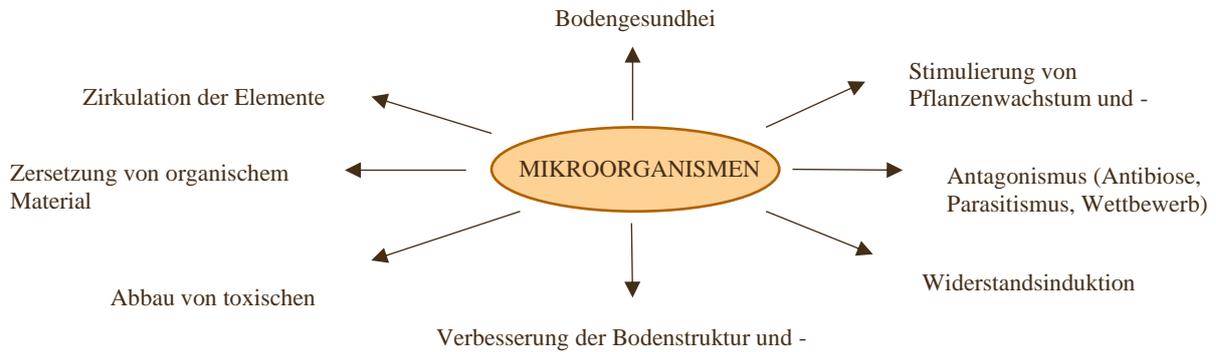


Abb. 2.1. Die wichtigste Funktion von Mikroorganismen

## 2. Biologische Bekämpfung von Schädlingen und Krankheitserregern im Boden: Faktoren, die für eine hohe Wirksamkeit zu berücksichtigen sind

Es ist anzumerken, dass die meisten biologischen Pflanzenschutzmittel auf der Grundlage von Mikroorganismen derzeit einzelne Stämme enthalten und nur eines, als Konsortium registriert ist (*Trichoderma asperellum* Stamm ICC 012+ *Trichoderma gamsi* ICC 080). Während die Wirksamkeit ausgewählter Bakterien- oder Pilzisolats in Labor- oder Gewächshaus tests zufriedenstellend ist, stellt die Wirksamkeit von Bioprodukten unter Feldbedingungen immer noch eine der größten Herausforderungen in der modernen Landwirtschaft dar (Kowalska et al. 2020; Michev et al. 2021). Die Faktoren, die das Erreichen einer hohen Wirksamkeit solcher auf Mikroorganismen basierender Formulierungen einschränken, können auf biotische und abiotische Faktoren zurückzuführen sein, d. h. auf die Konkurrenz durch einheimische Mikroorganismen, die Anfälligkeit gegenüber variablen Umweltbedingungen, aber auch auf Klima- und Witterungsbedingungen, Ausbringungsmethoden und Pflanzenbewirtschaftungspraktiken (Trivedi et al. 2020; Malusà et al. 2021). Für praktische Zwecke können die oben genannten Faktoren in vier Kategorien unterteilt werden: pflanzenabhängig (Pflanze), Bodeneigenschaften (Boden), Formulierungsverfahren (Produkt) und landwirtschaftliche Praktiken (Landwirt) (Abbildung 2.2.).

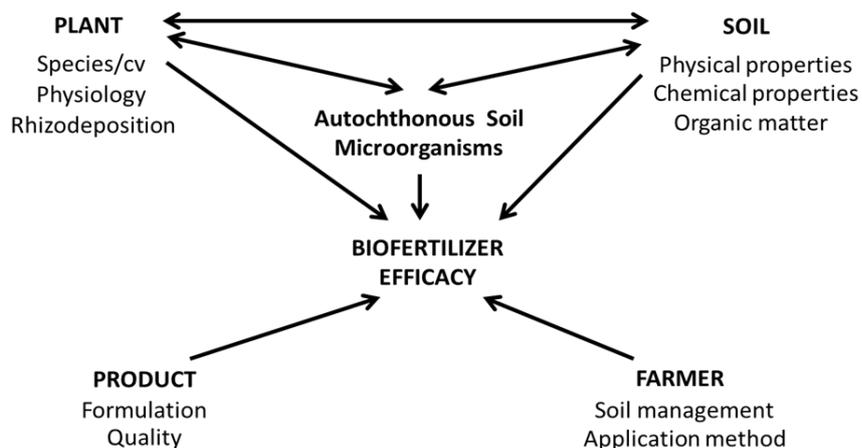


Abb. 2.2. Faktoren, die die Wirksamkeit von Bioprodukten beeinflussen

Der physiologische Zustand der Pflanze ist wichtig für die Wechselwirkung mit Biopestiziden. Blattbestandteile können die Sporenpersistenz und die Anfälligkeit der Insekten für eine Infektion durch Bioinsektizide beeinflussen. Der Nährstoffgehalt der Pflanze beeinflusst auch den allgemeinen Gesundheitszustand der Schadinsekten und kann somit die Wirkung von pilzlichen Entomopathogenen beeinflussen. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass das Vorhandensein von Phytopathogenen die Anfälligkeit des Schädling für insektizide Pilze beeinflussen kann: So wurde beispielsweise festgestellt, dass *M. anisopliae* eine 100 %ige Sterblichkeit des Schädling verursacht, wenn er sich auf mit dem Pilz infizierten Blättern aufhält, aber nur eine 50 %ige Sterblichkeit, wenn der Schädling sich von nicht infizierten Blättern ernährt (Rostas und Hilker 2003).

Die Schwierigkeit, eine gleichbleibende Wirksamkeit gegen Pflanzenpathogene und -schädlinge zu gewährleisten, macht den Einsatz von Biopestiziden trotz ihrer Sicherheit komplizierter und schwieriger. In der Praxis ist das erreichbare Maß an Wirksamkeit definitiv ein "Zahlenspiel": Es müssen genügend Sporen ausgebracht werden, um die Population von Schadinsekten zu reduzieren oder eine Infektion mit Krankheitserregern zu verhindern. Um sicherzustellen, dass Bioinsektizide effektiv angewendet werden können, bestimmen das Verhalten des Insekts (auf der Pflanze oder im Boden), die Wirkungsweise, mit der der Stamm parasitiert (durch Infektion der Haut oder über das Verdauungssystem) und die Morphologie der Pflanze die beste Anwendungsmethode. In ähnlicher Weise bestimmen bei Biofungiziden der biologische Zyklus des Erregers und der Ort der Infektion den Zeitpunkt und die Methode der Anwendung, um eine präventive Besiedlung mit einem Biokontrollmittel gegen den Erreger zu ermöglichen.

Die chemischen (pH-Wert, Gehalt an organischen Stoffen und Nährstoffen) und physikalischen (Textur) Eigenschaften des Bodens beeinflussen die Bakterien- und Pilzgemeinschaften und damit das Besiedlungspotenzial und die Wirksamkeit der auf den Boden ausgebrachten Biopestizide. Die Konkurrenz durch das einheimische Mikrobiom, das ebenfalls von den Bodeneigenschaften beeinflusst wird, erhöht die Variabilität der Anpassungsfähigkeit und Persistenz von Bioinokulanten. Optimale Bedingungen für das mikrobielle Wachstum (Feuchtigkeit, Temperatur, Gehalt an organischer Substanz usw.) begünstigen jedoch im Allgemeinen die Persistenz und die Wurzelbesiedlung durch Bioinokula.

Das Verfahren zur Herstellung des Inokulums ist von entscheidender Bedeutung, um eine qualitativ hochwertige Formulierung zu erhalten, da ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an Mikroorganismen und der Qualität des Endprodukts besteht. Da es sich bei mikrobiellen Wirkstoffen um lebensfähige Bakterien oder Pilze handelt, stellt die Entwicklung einer Formulierung mit langer Haltbarkeit ein zentrales Problem dar. Zur Verlängerung der Lebensdauer der Mikroorganismen und zur Verbesserung der physikalischen und chemischen Parameter der Inokula (Klebstoffe, Emulgatoren, Pufferverbindungen) werden Zusatzstoffe eingesetzt. Die optimale Formulierung schützt die mikrobiellen Zellen während der Lagerung und des Transports und kann die Haltbarkeit des Inokulums im Boden oder auf der Pflanze verlängern, während es gleichzeitig gegenüber der Umwelt inert ist. Es gibt zwei grundlegende Formen von mikrobiellen Zubereitungen: trocken oder granuliert und flüssig. Im Allgemeinen zeigen Granulatformulierungen eine bessere Wirksamkeit unter Bodenbedingungen, während Flüssigformulierungen zwar einfacher anzuwenden sind, aber eine kürzere Haltbarkeit aufweisen. Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Wirksamkeit mikrobieller Produkte beeinflusst, sind die Bedingungen, unter denen sie gelagert werden. Wenn Produkte bei extremen Temperaturen gelagert werden oder eine trockene Formulierung feucht wird, sinkt die Zahl der Mikroorganismen schneller. Landwirte, die bakterien-

oder pilzhaltige Präparate verwenden, sollten sich der Faktoren bewusst sein, die die Haltbarkeit der Formulierung beeinflussen.

Die Festlegung rechtlicher Mindeststandards für die Registrierung und Vermarktung mikrobieller Produkte ist wichtig, um einen Mindestqualitätsstandard zu gewährleisten, der ein weiterer Faktor ist, der die Wirksamkeit von Bioprodukten in der Praxis beeinflusst. Im Falle von Biopestiziden wird ihre Qualität durch ein langwieriges und kostspieliges Zulassungsverfahren und die Überwachung der Produktqualität auf Marktebene sichergestellt, das von jedem EU-Mitgliedstaat eingehalten werden muss.

Das Verständnis der Faktoren, die die nützliche mikrobielle Aktivität beeinflussen, ist für Landwirte von entscheidender Bedeutung, um solche Produkte erfolgreich in die Praxis einführen zu können. Die Struktur des Bodenmikrobioms und folglich die Nachhaltigkeit oder Wirksamkeit beimpfter Bioprodukte wird grundlegend durch landwirtschaftliche Bewirtschaftungspraktiken beeinflusst, mit gegensätzlichen Auswirkungen beim Vergleich intensiver und umweltfreundlicherer Systeme: Praktiken wie Bodenbearbeitung, Pflanzenschutz, mineralische und organische Düngung oder Wasserregime können die Wirksamkeit von im Boden ausgebrachten Biopestiziden verändern.

Beim praktischen Einsatz von Biopestiziden kann die Resistenz gegen synthetische Produkte den größten Einfluss auf ihre Wirksamkeit haben (Karpouzas et al. 2022). Der Ort der chemischen Interaktion zwischen Bioinsektiziden und Rückständen synthetischer Produkte ist die Blattoberfläche, wo die nützliche Pilzspore unter den meisten Bedingungen ruht, bis sie mit der Epidermis des Insekts in Kontakt kommt. Einige Agrochemikalien werden nach der Anwendung schnell vom Blatt absorbiert: Strobilurinfungizide beispielsweise sind *in vitro* für pilzliche Entomopathogene und eine breite Palette von Pilzen giftig, werden aber innerhalb von 15 Minuten nach der Anwendung vom Blatt absorbiert, so dass der Kontakt zwischen bereits vorhandenen oder gleichzeitig ausgebrachten Pilzsporen sehr kurz ist und daher für das Bioinsektizid nicht besonders problematisch. Es versteht sich von selbst, dass Biopestizide, die nach synthetischen Fungiziden ausgebracht werden, nicht mit deren Rückständen in Berührung kommen dürfen, so dass vor der Ausbringung eines Biopestizids die Wartezeit der zuvor ausgebrachten Produkte berücksichtigt werden muss.

Eine weitere Einschränkung für den Einsatz von Biopestiziden im kommerziellen Maßstab ist die richtige Anwendung und Dosierung. Die Wirkung der Dosis ist bei Biopestiziden besonders wichtig. Im Allgemeinen sollten bei der Ausbringung von insektiziden Pilzen auf Feld- oder Gewächshauskulturen mindestens  $10^{-10}$  propagul  $\text{ha}^{-1}$  ausgebracht werden, um ein gutes Maß an Wirksamkeit zu gewährleisten (Jaroński 2010). Dies entspricht  $10^5$  propagul  $\text{cm}^{-2}$  auf einer ebenen Fläche oder theoretisch  $10^4$  propagul  $\text{cm}^{-2}$  auf einer Kultur mit einem normalen Blattflächenindex. Ähnliche Dosen sind auch für Biofungizide erforderlich. Komplizierter wird die Situation bei der Schädlingsbekämpfung im Boden, wo neben der geeigneten Dosis auch der Kontakt zwischen dem Biopestizid und dem Schädling oder Krankheitserreger erleichtert werden muss. Die Ausbringungstechnik spielt daher eine Schlüsselrolle bei der Gewährleistung der Abwehrwirkung. Durch die Konzentration von Biopestiziden auf einer kleinen, gezielten Fläche kann eine 6- bis 30-fache Steigerung der Konzentration erreicht werden. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Konzentration der Keime nach der Ausbringung auf den Blättern in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie Sonnenlicht, Regen, Temperatur, Feuchtigkeit, chemischer Zusammensetzung der Blattoberfläche und pflanzenassoziiertes Mikrobiota abnimmt. Ähnlich verhält es sich im Boden: In vielen Fällen, insbesondere bei bakteriellen Präparaten, ist die Persistenz der Bioinokulanzen im Boden oder in der Wurzelrhizosphäre im Allgemeinen

auf 30-40 Tage nach der Inokulation begrenzt (Bashan et al. 1995). Daher sind mehrere Anwendungen (2-4) pro Vegetationsperiode erforderlich, wobei die Häufigkeit im Falle von Biopestiziden von den Witterungsbedingungen und der Entwicklung von Schädlingen/Pathogenen abhängt. Dies wird bei mikrobiellen Präparaten nicht als Nachteil angesehen, da auch bei synthetischen Präparaten mehrere Behandlungen pro Vegetationsperiode durchgeführt werden.

Auch die Art der Ausbringung kann sich auf die Leistung von Biopestiziden auswirken. Für die Ausbringung, insbesondere von Granulaten, stehen in der Regel bereits Maschinen zur Verfügung. Die Ausbringung von Bioinokulantien durch Saatgutbeizung oder in flüssiger Form auf den Boden bietet eine vergleichbare Wirksamkeit bei der Produktion verschiedener Pflanzenarten (Deaker et al., 2004). Die Ausbringung von Flüssigformulierungen mit einem hydraulischen Sprühgerät beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der für den Pflanzenschutz verwendeten Bakterien nur geringfügig, aber die verlängerte Verarbeitungszeit verringert die Zahl der lebensfähigen Zellen, die die Blattoberfläche erreichen, um bis zu 50 % (Świechowski et al. 2012). Auch die für die Ausbringung verwendete Wassermenge und das Vorhandensein von Hilfsstoffen können die Wirksamkeit von Pilz-Biopestiziden beeinflussen. Besonderes Augenmerk sollte auf den Zeitpunkt der Ausbringung des Bioprodukts gelegt werden: Übermäßige Lichteinwirkung (insbesondere UV-Licht) oder niedrige Luftfeuchtigkeit können die Lebensfähigkeit und Langlebigkeit der Mikroorganismen und damit ihre Wirksamkeit verringern.

Es muss auch sichergestellt werden, dass die in die Umwelt eingebrachten Mikroorganismen geeignete Bedingungen vorfinden, die ihre Vermehrung begünstigen. Wichtig ist auch der Aspekt der ordnungsgemäßen Lagerung von Biopestiziden, die von ihrer Zusammensetzung abhängt.

Aus diesen Gründen werden im Rahmen des EXCALIBUR-Projekts (Horizont 2020) experimentelle Feldversuche zur Untersuchung der neuen multifunktionalen mikrobiellen Bodeninokulantien an drei Modellkulturen in verschiedenen pedoklimatischen Regionen durchgeführt.

#### Biokontrolle von Krankheitserregern im Boden: praktische Beispiele

Bei der biologischen Bekämpfung von Krankheitserregern im Boden werden nützliche Mikroorganismen eingesetzt, um das Wachstum von pathogenen Organismen im Boden zu unterdrücken. Diese Mikroorganismen nutzen verschiedene Mechanismen zur Biokontrolle, darunter Antibiose, Hyperparasitismus, Induktion von Resistenzen und Konkurrenz um Raum und Nährstoffe. So produzieren bestimmte Bakterienstämme wie fluoreszierende Pseudomonaden extrazelluläre Sekundärmetaboliten, die das Wachstum von Krankheitserregern im Boden hemmen. Darüber hinaus lösen einige biologische Bekämpfungsmittel eine induzierte systemische Resistenz in den Wirtspflanzen aus, während andere spezifisch in die Pathogenitätsfaktoren von Pilzen eingreifen. Die Wirksamkeit mikrobieller Produkte bei der Bekämpfung bodenbürtiger Krankheitserreger wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, z. B. von der Vielfalt und Häufigkeit der pathogenen Taxa, dem Bodenmikrobiom und den Umweltbedingungen. Das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Boden, Pflanzen, Krankheitserregern und biologischen Bekämpfungsmitteln ist für die praktische Anwendung von Biokontrollstrategien von entscheidender Bedeutung. Daher zielt die laufende Forschung darauf ab, die Wirksamkeit von Produkten auf Mikrobienbasis zu verbessern und ihre Auswirkungen auf das Bodenmikrobiom zu bewerten (Haas und Défago 2005; Ptaszek et al. 2023; Handelsman und Stabb 1996).

Einige Beispiele für Mikroorganismen, die für die biologische Bekämpfung von Krankheitserregern im Boden verwendet werden, sind:

- *Pseudomonas* spp. - Mitglieder der Gattung *Pseudomonas*, wie z. B. fluoreszierende Pseudomonaden, sind für ihre Fähigkeit bekannt, antimykotische Antibiotika zu produzieren, eine induzierte systemische Resistenz in Wirtspflanzen hervorzurufen und mit Pathogenitätsfaktoren von Pilzen zu interferieren (Haas und Défago 2005).
- *Bacillus* spp. - Bestimmte Stämme von Bacillus-Bakterien, wie *Bacillus amyloliquefaciens*, wurden als Biokontrollmittel zur Bekämpfung von Krankheitserregern im Boden eingesetzt. Sie können eine Vielzahl von antimykotischen Verbindungen produzieren und eine systemische Resistenz in Pflanzen induzieren (Bonaterra et al. 2002).
- *Streptomyces* spp. - Einige Arten von Streptomyces-Bakterien sind auf ihr Potenzial für die biologische Schädlingsbekämpfung untersucht worden. Sie sind dafür bekannt, dass sie eine breite Palette bioaktiver Verbindungen produzieren, darunter Antibiotika und Antipilzmittel (Bonaterra et al. 2002).
- *Trichoderma* spp. - *Trichoderma* ist ein bekannter Biokontrollpilz, der zur Bekämpfung von Krankheitserregern im Boden eingesetzt wird. Er wirkt durch verschiedene Mechanismen wie Mykoparasitismus, Antibiose und Konkurrenz und wurde umfassend auf sein Potenzial zur Bekämpfung einer Reihe von bodenbürtigen pathogenen Pilzen, einschließlich *Fusarium*, *Pythium* und *Rhizoctonia*, untersucht (Graham und Strauss 2021).
- *Fusarium* sp. - Der Einsatz antagonistischer Fusarienstämme zur Bekämpfung von Krankheitserregern im Boden wurde im Rahmen der biologischen Schädlingsbekämpfung untersucht. So hat der *Fusarium*-Stamm K5 eine Krankheitsbekämpfung von 69 % und eine Steigerung der Biomasseproduktion von Basilikum im Vergleich zur inokulierten Kontrolle gezeigt (Pugliese et al. 2008). Der *Fusarium*-Stamm MSA35 ist dafür bekannt, dass er flüchtige Verbindungen zur Bekämpfung von Fusarienwelke produziert (Gilardi et al. 2005).

Diese Mikroorganismen nutzen verschiedene Mechanismen, wie Antibiose, induzierte systemische Resistenz und Interferenz mit Pathogenitätsfaktoren, um das Wachstum von Krankheitserregern im Boden zu kontrollieren.

Es gibt verschiedene Methoden, antagonistische Mikroorganismen zur Bekämpfung von Krankheitserregern im Boden einzusetzen, unter anderem:

- Saatgutbehandlung - antagonistische Mikroorganismen können vor der Aussaat auf das Saatgut aufgebracht werden. Diese Methode stellt sicher, dass die Mikroorganismen in der Rhizosphäre vorhanden sind, wo sie sich ansiedeln und den entstehenden Sämlingen Schutz bieten können.
- Bodenausbringung - Mikroorganismen können direkt in den Boden eingebracht werden, entweder als Drench oder über Bewässerungssysteme. Auf diese Weise können sich die Mikroorganismen in der Rhizosphäre ansiedeln und einen langfristigen Schutz gegen bodenbürtige Krankheitserreger bieten.
- Einarbeitung in Kultursubstrate - für den Anbau von Pflanzen im Gewächshaus oder in Containern können antagonistische Mikroorganismen in die Kultursubstrate eingearbeitet werden, um sie vor Krankheitserregern im Boden zu schützen (Panth et al. 2020; Pandit et al. 2022).

Diese Methoden zielen darauf ab, die Ansiedlung und Aktivität antagonistischer Mikroorganismen in der Rhizosphäre zu gewährleisten, wo sie bodenbürtige Krankheitserreger wirksam bekämpfen und zur Pflanzengesundheit beitragen können.

### 3. Biokontrolle von Schädlingen und Krankheitserregern, die oberirdische Pflanzenorgane befallen: praktische Aspekte

Derzeit werden Biopräparate auf der Grundlage von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilzen im Pflanzenschutz gegen Krankheiten und Schädlinge eingesetzt.

#### Viren

Sie bilden eine große Gruppe von Insektenpathogenen, von denen die Familie der Baculoviridae die zahlreichste ist. Bei den Vertretern dieser Gruppe handelt es sich um Viren mit hoher Selektivität für ihre Wirtinsekten. Schmetterlinge (Raupen der Apfelfruchtfliege, Blattroller usw.) werden am häufigsten befallen, Hautflügler und Käfer viel seltener. Ihre Virulenz ist oft auf eine Familie, eine Gattung oder sogar eine bestimmte Insektenart beschränkt. Außerdem vermehren sie sich nicht in den Zellen von Wirbeltieren und Pflanzen und stellen somit ein umweltfreundliches Mittel der biologischen Schädlingsbekämpfung dar. Die Auswirkungen ihrer Anwesenheit in Insekten wurden bereits im 19. Jahrhundert beobachtet, aber ihr praktischer Einsatz wurde erst mit einem besseren Verständnis der Biologie der Wirte sowie des Infektionsmechanismus und des Entwicklungszyklus der Viren selbst möglich. Baculoviren sind große Viren, die Desoxyribonukleinsäure (DNS) enthalten, die in stäbchenförmigen Proteinkapsiden verpackt ist und sich hauptsächlich in den Kernen der Wirtszellen bildet. Die Kapside sind mit einer Matrix aus Proteinmolekülen, den so genannten Einschlusskörpern, verschmolzen. Diese Proteinmatrix, die bei den Kernpolyederviren (NPV) Polyhedrin und bei den Granuloseviren (GV) Granulin genannt wird, schützt sie vor ungünstigen Umweltfaktoren und ermöglicht ihnen das Überleben außerhalb des Wirtsorganismus. Ihre ausschließliche Eigenschaft, Arthropoden zu infizieren, und ihr Vorkommen in schützenden Einschlusskörpern machen sie zu wertvollen biologischen Wirkstoffen von großer praktischer Bedeutung. Einschlusskörper, die durch Wind und Regen sowie durch einige Wirbeltiere und parasitische Wirbellose, die als Transporter (Vektoren) fungieren, verschleppt werden, können in der Natur viele Jahre lang überdauern und eine Infektionsquelle für anfällige Insekten darstellen. Sie werden vom Insekt mit der Nahrung aufgenommen, lösen sich in seinem Darm auf und infizieren die meisten Wirtsgewebe, was zum Tod des Insekts führt. *Baculoviren* sind in fast allen natürlichen Insektenpopulationen in Polen vorhanden. Ihre zusätzliche Einschleppung in Form von Biopräparaten erhöht jedoch die Infektionshäufigkeit bzw. ermöglicht bei der Einschleppung von hochkonzentrierten Viruspräparaten eine rasche Reduzierung der Schädlingspopulation. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Temperatur eine wichtige Rolle bei der effektiven Wirkung von Viruspräparaten spielt. Sie hat einen großen Einfluss auf den Verlauf der Virusinfektion. Bei Temperaturen unter 20°C verlangsamt sich die Virusvermehrung, während höhere Temperaturen (25-30°C) den viralen Krankheitsprozess beschleunigen. Auch sind die verschiedenen Stadien des Schädlings unterschiedlich empfindlich gegenüber Virusinfektionen - jüngere Stadien sind anfälliger.

#### Bakterien

Unter der großen Gruppe der insektiziden Bakterien in der Natur ist das wichtigste für den Pflanzenschutz gegen Schädlinge die Art *Bacillus thuringiensis*, die einen Proteinkristall produziert, der das sogenannte Delta-

Endotoxin enthält, das für den Tod des Insekts verantwortlich ist. Die Sporen (Endosporen) sind die Überlebensform dieses Bakteriums, die es ihm ermöglicht, auch unter ungünstigen Umweltbedingungen zu überleben. Die Endotoxin-Kristalle und die Sporen der verschiedenen Unterarten und Isolate von *B. thuringiensis* sind in der Regel die Grundbestandteile von Biopräparaten auf Bakterienbasis. Sie werden gegen eine Reihe von wichtigen Schädlingsarten eingesetzt: Schmetterlingsraupen verwenden ein Isolat von *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Fliegenlarven *B. thuringiensis* var. *israelensis* und Käferlarven *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*. Bei dem Kristall handelt es sich um eine Proteinverbindung, die erst aktiviert werden muss, bevor sie ihre Wirkung entfalten kann. Unter normalen Bedingungen weist dieses Protein eine sehr geringe Löslichkeit auf, so dass es für Menschen, höhere Tiere und die meisten Insekten völlig ungefährlich ist. In einem alkalischen Milieu (pH>9,5), wie es z. B. im Mitteldarm von Schmetterlingsraupen herrscht, löst es sich jedoch leicht auf. Daher ist *B. thuringiensis* ein sehr spezifisches Mittel zur Insektenbekämpfung. Das Delta-Endotoxin schädigt das Darmepithel des Insekts und verhindert, dass es Nahrung aufnimmt. Das Insekt stellt die Nahrungsaufnahme ein, und in seinem Körper entwickeln sich aufeinanderfolgende Generationen von Bakterien, die innerhalb der nächsten Tage zum Tod des Insekts führen. Die Hemmung der Nahrungsaufnahme und der verzögerte Tod des Insekts ist ein charakteristisches Merkmal der Infektion mit diesem Bakterium.

Der Einsatz von Bakterien zur Bekämpfung von Blattkrankheiten ist untersucht worden, und einige nützliche Bakterien haben ihr Potenzial für diesen Zweck gezeigt. In einer Studie zur biologischen Bekämpfung von Wurzel- und Blattkrankheiten bei Tomaten wurde beispielsweise festgestellt, dass mikrobielle Konsortien, darunter *Pseudomonas chlororaphis* und *Pseudomonas azotoformans*, antagonistische Wirkungen gegen das Blattpathogen *Botrytis cinerea* zeigten, wenn sie als Blattspray angewendet wurden. Diese Behandlungen verringerten die Fläche der durch *B. cinerea* verursachten nekrotischen Läsionen, wobei die mikrobiellen Konsortien eine Verringerung der Läsionsfläche um bis zu 70 % erreichten (Minchev et al. 2021).

Darüber hinaus werden Bakterien der Gattung *Bacillus* (z. B. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) häufig zum Schutz von Pflanzen vor Krankheiten eingesetzt. Diese Bakterien haben eine antimykotische Wirkung, indem sie verschiedene Verbindungen (Antibiotika, Enzyme, Chemikalien) produzieren, die das Wachstum von Krankheitserregern hemmen, mit diesen um Nahrung und Lebensraum konkurrieren und bei Pflanzen eine Resistenz hervorrufen. Die Verwendung von *Bacillus*-Bakterien im Pflanzenschutz ist häufig Teil nachhaltiger Anbaustrategien, da diese Bakterien für die Umwelt unbedenklich sind und keine negativen Auswirkungen auf andere Organismen haben.

Darüber hinaus hat die Forschung gezeigt, dass bakterielle Biokontrollmittel wie *Bacillus*- und *Pseudomonas*-Stämme das Auftreten und den Schweregrad häufiger bakterieller Krankheiten verringern können, wenn sie als Blattspray angewendet werden (Minchev et al. 2021).

### Hefen

Die in der EU am häufigsten zur Biokontrolle von Pflanzenkrankheiten eingesetzten Hefen sind *Candida oleophila*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia fructicola*, *Cryptococcus albidus* und *Saccharomyces cerevisiae* (Freimoser et al. 2019). Diese Hefearten sind für ihr Potenzial als Biokontrollmittel gegen verschiedene Pflanzenpathogene bekannt, was ihre Bedeutung für nachhaltige landwirtschaftliche Praktiken unterstreicht. *Candida oleophila* zum Beispiel ist für seine starke antagonistische Aktivität gegen Schimmelpilz- und Nacherntkrankheiten von Kernobst bekannt. *Aureobasidium pullulans* wurde zur

biologischen Bekämpfung verschiedener Pflanzenpathogene, darunter Pilze und Bakterien, eingesetzt und ist in der EU als biologisches Bekämpfungsmittel gegen *B. cinerea* bei Trauben, Tomaten und Erdbeeren zugelassen. *Metschnikowia fructicola* hat sich bei der Bekämpfung von Nacherntekrankheiten bei Obst wie Äpfeln und Birnen als wirksam erwiesen. *Cryptococcus albidus* hat nachweislich eine antagonistische Wirkung gegen verschiedene Pflanzenpathogene. *Saccharomyces cerevisiae*, gemeinhin als Bäckerhefe bekannt, wurde zur biologischen Bekämpfung verschiedener Pflanzenpathogene, einschließlich Pilzen und Bakterien, eingesetzt, und verschiedene formulierte Produkte, die getrocknete Hefezellen enthalten, werden auch als Botenstoff verwendet. Diese Hefearten wurden in der EU als Biokontrollprodukte zugelassen, da sie antagonistisch gegen verschiedene Pflanzenpathogene wirken, keine hohen Anforderungen an die Kultivierung stellen und nur geringe Bedenken hinsichtlich der biologischen Sicherheit bestehen. Die Verwendung dieser Hefearten als biologische Bekämpfungsmittel hat das Potenzial, den Einsatz chemischer Pestizide zu verringern, die negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt haben können (Kowalska et al. 2022). Daher stellt die Verwendung von Biokontrollhefen einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung einer nachhaltigen Landwirtschaft dar (Kowalska et al. 2022).

### Pilze

Neben den Pilzen, die Erreger gefährlicher Pflanzenkrankheiten sein können, gibt es auch eine große Gruppe dieser Organismen, die spezifische Fähigkeiten aufweisen, als Antagonisten und Parasiten auf oder in Schadinsekten und Nematoden zu wirken. Pilzinfektionen sind leicht am charakteristischen Aussehen des erkrankten oder toten Insekts zu erkennen, da viele Arten nach dem Tod Myzel und Sporen auf der Außenseite des Wirtskörpers bilden und diesen mit einem dicken Belag bedecken, der oft eine charakteristische Farbe aufweist, z. B. *Metarhizium anisopliae* - grünlich, *Beauveria bassiana* - weiß. Der Entwicklungszyklus der meisten insektiziden Pilze ist ähnlich: Das infektiöse Stadium ist in der Regel die Spore, die, nachdem sie die Kutikula des Insekts erreicht hat, keimt und über den Keimschlauch in das Insekt eindringt. Nach dem Eindringen in den Körper des Wirts vermehrt sich der Pilz in der Hämolymphe und führt zur Lähmung des Insekts, das nach einiger Zeit stirbt. Nach dem Absterben des Insekts entwickelt sich auf der Oberfläche des Insekts ein reichhaltiges Myzel, das neue Sporen hervorbringt, die durch Wind, Wasser, Insekten und andere Tiere übertragen werden können.

Von den fast 100.000 derzeit bekannten Pilzarten sind ca. 800 Arten insektizider Pilze, von denen etwa 12-15 Arten zum biologischen Schutz gegen pflanzenschädigende Insekten eingesetzt werden, vor allem in Gewächshäusern, aber auch im Freiland. Insektizide Pilze sind in der Umwelt weit verbreitet und spielen eine entscheidende Rolle bei der Reduzierung von Insektenpopulationen. Die häufigsten Arten sind *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosorosea* und *Verticillium lecanii*, die mehr oder weniger häufig in biologischen Präparaten verwendet werden. Insektizide Pilze sind sehr empfindlich gegenüber Temperatur und Feuchtigkeit. Sie wirken durch Kontakt und müssen sich auf der Oberfläche des Insektenkörpers befinden, um zu keimen und in das Insekt einzudringen und dessen Tod zu verursachen. Aufgrund der Anforderungen an ein geeignetes Mikroklima werden Pilz-Biopräparate in der Praxis hauptsächlich in Gewächshäusern eingesetzt, obwohl es auch viele Berichte über ihre gute Wirksamkeit unter Freilandbedingungen gibt, z. B. *B. B. brongniartii* zur Reduzierung der Populationen von Maikäferlarven. In Deckfrüchten werden sie zur Verringerung der Populationen von z. B. Weißer Fliege und in Feldkulturen auch von Kartoffelkäfer, Kohlhernie und Braunfäule eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass jährlich etwa 30 % der Getreideblattlauspopulationen mit insektiziden Pilzen infiziert sind.

Epizootien, die durch diese Pilzgruppe verursacht werden, wurden auch in Populationen von Knaulgras, Apfelfruchtbohrer, Kreuzblütler, Apfelhonigkäfer, Rapsglanzkäfer und anderen beobachtet.

Im biologischen Pflanzenschutz gegen Krankheitserreger werden am häufigsten Trichoderma-Stämme eingesetzt. So haben Forschungsarbeiten verschiedener wissenschaftlicher Zentren in der ganzen Welt gezeigt, dass Trichoderma-Stämme oder ihre sekundären Stoffwechselprodukte eine starke antagonistische Aktivität gegen verschiedene pflanzenpathogene Pilze aufweisen. Sie konkurrieren mit pathogenen Organismen und unterdrücken deren Wachstum durch Mechanismen wie die Produktion von Antibiotika und Enzymen, die die Zellwände anderer Pilze abbauen, das Pflanzenwachstum verbessern und die Entwicklung des Wurzelsystems fördern. *Trichoderma* kann auch eine systemische Resistenz in Pflanzen hervorrufen, indem er die Abwehrmechanismen der Pflanze fördert. Dazu gehört die Aktivierung von Signalwegen, die zur Produktion von abwehrrelevanten Verbindungen führen und die Pflanzen widerstandsfähiger gegen Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen machen. Diese Gattung ist auch für ihre Fähigkeit bekannt, eine Vielzahl von Enzymen wie Chitinasen, Glucanasen und Proteasen zu produzieren, die beim Abbau der Zellwände von pathogenen Pilzen eine entscheidende Rolle spielen und so zur Bekämpfung von Krankheiten beitragen (Waghunde et al. 2016; Zin und Badaluddin 2020).

*Ampelomyces quisqualis* ist ein weiteres Beispiel für einen Biokontrollpilz, der sich als wirksam gegen Blattkrankheitserreger wie Mehltau und Rost erwiesen hat. Er fungiert als Hyperparasit, der andere Pilze infiziert und parasitiert und dadurch eine Vielzahl von Pflanzenkrankheiten unterdrückt, auch solche, die das Laub befallen. *Clonostachys rosea* wurde auch auf sein Biokontrollpotenzial gegen verschiedene Blattkrankheiten untersucht. *Clonostachys rosea* nutzt mehrere Mechanismen, darunter Mykoparasitismus, Antibiose und induzierte Resistenz, um Blattkrankheiten in verschiedenen Kulturpflanzen zu unterdrücken (Elad 2003).

Zu den Herausforderungen, die mit dem Einsatz von Pilzen zur biologischen Bekämpfung von Blattkrankheiten verbunden sind, gehören:

- Variabilität und Inkonsistenz - Der großflächige Einsatz von Biokontrollpilzen ist aufgrund der Variabilität und Inkonsistenz ihrer Biokontrollaktivität, die durch Umweltfaktoren beeinflusst werden kann, begrenzt. Diese Variabilität behindert ihre breite Anwendung.
- Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen - Einige Biokontrollpilze sind empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen, die ihre Wirksamkeit beeinträchtigen können. Diese Empfindlichkeit kann eine Herausforderung bei der Aufrechterhaltung einer konsistenten Krankheitsbekämpfung unter unterschiedlichen Umweltbedingungen darstellen.
- Integration mit chemischen Fungiziden - Die Integration der Biokontrolle mit chemischen Fungiziden auf Kalenderbasis oder je nach ökologischen Anforderungen kann eine Herausforderung sein. Diese Integration kann zwar die Krankheitsbekämpfung verbessern, erfordert aber ein sorgfältiges Management, um die Kompatibilität und Wirksamkeit beider Bekämpfungsmethoden sicherzustellen.



*Abb. 2.3. Foto eines erwachsenen Otiorynchus sulcatus, der mit Beauveria bassiana infiziert ist  
Autorin: Małgorzata Tartanus*



Abb. 2.4. Foto der mit *Beauveria bassiana* infizierten Larven von *Melolontha melolontha*  
Autorin: Małgorzata Tartanus

#### 4. Multifunktionale Kapazität von Mikroorganismen: eine Chance für die integrierte Schädlingsbekämpfung

In der Vergangenheit bestand die biologische Schädlingsbekämpfung auf der Grundlage von Mikroorganismen in der Regel in der Verwendung eines einzigen Bakterien- oder Pilzstammes, auch als Ergebnis von Regulierungsansätzen, die Produkte auf Mikrobensbasis als ähnlich wie chemische Verbindungen betrachtet haben. Die Wirksamkeit mikrobieller Inokulanzen, insbesondere derjenigen, die als einzelne Stämme in die Umwelt eingebracht werden, ist sehr unterschiedlich. Der derzeitige Haupttrend im Pflanzenschutz ist daher die Verwendung von Inokulanzen, die aus mehreren Mikroorganismen mit unterschiedlicher Wirkungsweise bestehen, um die Wirksamkeit mikrobieller Produkte zu erhöhen und das Spektrum ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Pathogenarten zu erweitern. Die Konsortien können als Mischung verschiedener Stämme derselben Art oder aus Arten verschiedener Gattungen bestehen (Sarma et al. 2015; Minchev et al. 2021; Ptaszek et al. 2023). Da die Wirkmechanismen verschiedener Bakterien und Pilze variieren, könnten Konsortien, die auf der Kombination nützlicher Mikroorganismen beruhen, die Biokontrolleffekte möglicherweise verstärken. Außerdem besetzen verschiedene Mikroorganismen unterschiedliche Nischen in der Wurzelzone und verringern so die Konkurrenz zwischen ihnen (Sarma et al. 2015; Minchev et al. 2021). Die Konsortien sind der Formulierung von Einzelstämmen auf der Ebene mehrerer Aufgaben überlegen. Sie können unterschiedliche Wirkmechanismen der verschiedenen Mikroorganismen induzieren, die manchmal auch Pflanzenschutzmechanismen umfassen können (z. B. Antagonismus gegenüber Pathogenen und Induktion von Stoffwechselprozessen, die die Toleranz gegenüber Pathogenen erhöhen oder die Pflanze für Schädlinge weniger "schmackhaft" machen), und können daher als "multifunktionale" Produkte betrachtet werden (Kowalska et al. 2020; Minchev et al. 2021). Mehrere Biopestizide, darunter einige insektizide Pilze (z. B. *Beauveria* spp.) und Bakterien (z. B. *Bacillus thuringiensis*),

die derzeit im Pflanzenschutz eingesetzt werden, haben stimulierende Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum gezeigt (Kowalska et al. 2020). Die doppelte Wirkung des Pflanzenschutzes und der Förderung der Nährstoffaufnahme wurde in einigen Studien mit Biopestizidstämmen auf *Trichoderma*-Basis beobachtet. Unter den Bakterien, die zum Schutz vor Krankheitserregern eingesetzt werden, finden Bakterien der Gattung *Bacillus* im Allgemeinen eine kommerzielle Anwendung als Biopestizide, sind aber auch zur Förderung des Pflanzenwachstums wirksam.

Die multifunktionalen Fähigkeiten von Mikroorganismen bieten einen vielversprechenden Weg für die Entwicklung unbedenklicher und nachhaltiger Alternativen im Rahmen des IPM. Die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation (FAO) hält IPM für die beste Kombination von Erreger- und Schädlingsbekämpfungsstrategien unter Berücksichtigung von Ertrag, Gewinn und Sicherheitsprofil. Zahlreiche Feldversuche und praktische Anwendungen belegen die erfolgreiche Integration von Mikroorganismen in IPM-Programme. Diese Studien zeigen die Machbarkeit und Wirksamkeit des Einsatzes von Mikroorganismen in verschiedenen landwirtschaftlichen Bereichen. Mikroorganismen sind ein Schlüsselement für die Aufrechterhaltung des biologischen Gleichgewichts in einem Agrarökosystem. Durch die Nutzung der vielfältigen Wirkmechanismen von Mikroorganismen können nachhaltige Strategien zur Schädlings- und Krankheitsbekämpfung entwickelt werden, die die Gesundheit der Umwelt fördern und die langfristige Nachhaltigkeit der Landwirtschaft gewährleisten. Die Multifunktionalität von Mikroorganismen erstreckt sich auch auf den Nährstoffkreislauf und die Bodengesundheit. Die Produktion und Vermarktung mikrobieller Konsortien stellt die Erzeuger jedoch vor einige technische und vor allem rechtliche Probleme.

Nützliche Mikroorganismen in der Rhizosphäre spielen eine wichtige Rolle bei der Abschwächung von biotischem Stress bei Pflanzen, was ihre Verwendung als Bioinokulantien zur Verringerung des Einsatzes von synthetischen Schädlingsbekämpfungsmitteln in der Landwirtschaft attraktiv macht. Die Mechanismen der Pathogenreduktion durch Mikroorganismen in der Rhizosphäre sind vielfältig (Ptaszek et al. 2023). Einige beruhen auf der direkten Beeinflussung der Vermehrung von Krankheitserregern in der Rhizosphäre durch nützliche Mikroorganismen über verschiedene Mechanismen der Konkurrenz, z. B. um Nährstoffe und Raum, oder der Produktion von Antibiotika. Indirekte Mechanismen beruhen auf der Induktion von Veränderungen in der Wirtspflanze, die die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber dem Pathogen verändern, z. B. durch Induktion einer systemischen Resistenz in der Pflanze.

Andererseits haben viele pflanzenwachstumsfördernde Mikroorganismen Biokontrollfunktionen. Die Beobachtung, dass die Wurzelbesiedlung durch Mykorrhizapilze nicht immer mit einer verbesserten Pflanzenernährung und einem verbesserten Pflanzenwachstum einhergeht, hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass eine erhöhte Toleranz gegenüber biotischen Stressfaktoren ein weiterer wichtiger Nutzen der Symbiose ist. Die erhöhte Widerstandsfähigkeit mykorrhizierter Pflanzen gegenüber Infektionen durch bodenbürtige Krankheitserreger wurde mit der Akkumulation von Phytoalexinen, Flavonoiden und Isoflavonoiden in den von diesen Pilzen besiedelten Wurzelgeweben in Verbindung gebracht. Ein biologischer Schutz durch Mykorrhizapilze wurde auch bei pflanzenparasitären Nematoden nachgewiesen, z. B. durch die Verringerung der Populationen von *Meloidogyne incognita* oder *Pratilenchus penetrans* (45 % und 87 %) in Mykorrhiza-Wurzeln im Vergleich zu Wurzeln ohne Mykorrhiza. Die Komplexität bzw. Multifunktionalität der Beziehung zwischen Wirtspflanze und Mykorrhizapilz wurde beispielsweise in einer Studie nachgewiesen, in der mykorrhizierte Tomatenpflanzen in Gegenwart des Erregers *Alternaria solani* deutlich weniger

Krankheitssymptome aufwiesen als nicht mykorrhizierte Pflanzen, aber erhöhte Phosphatdüngergaben parallel zu einer verringerten Mykorrhizabildung zu einer erhöhten Krankheitschwere auch bei mykorrhizierten Pflanzen führten. Die Induktion der Abwehraktivität durch Mykorrhizapilze wurde auch in den epigäischen Organen der Pflanze nachgewiesen: So waren die Larven der Tomatenmotte (*Helicoverpa arimigera*), die auf den Blättern mykorrhizierter Pflanzen aufgezogen wurden, deutlich kleiner (62 % Gewichtsreduzierung) als die auf nicht mykorrhizierten Pflanzen aufgezogenen.

In diesem Rahmen, welcher wissenschaftliche, kommerzielle und regulatorische Aspekte umfasst, wird die Entwicklung von Instrumenten zur Überwachung der eingeführten mikrobiellen Spezies äußerst wichtig, insbesondere um die korrekte Bewertung der Risiken für die Umwelt und die menschliche Gesundheit zu gewährleisten, aber auch um ihre Nachhaltigkeit zu bewerten, was ein nützlicher Aspekt ist, um die optimale Anwendungsmethode (Zeitpunkt und Dosierung) zu bestimmen, die eine maximale Wirksamkeit ermöglicht. Die Forschung zu diesem Zweck, die sich auch innovativer Methoden bedient, ist im Gange, und es ist daher zu erwarten, dass Technikern und Landwirten Entscheidungshilfesysteme (Decision Support System - DSS) zur Verfügung gestellt werden, um die Anwendung und Wirksamkeit von Bioprodukten zu verbessern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Probleme im Zusammenhang mit der unzureichenden Wirksamkeit mikrobiologischer Produkte möglicherweise auf die noch nicht ausgereifte Produktionstechnologie (Auswahl der Stämme, Formulierung, Anwendung und Überleben) zurückzuführen sind. Der Druck, den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln und Düngemitteln aus nicht erneuerbaren Quellen zu reduzieren, wird dazu führen, dass mikrobielle Produkte trotz ihrer derzeitigen Einschränkungen weiterentwickelt und verbessert werden und zu einer brauchbaren Alternative zu Pestiziden werden. Es ist auch zu erwarten, dass mit dem technologischen Fortschritt und dem zunehmenden Wissen über die Lebensfähigkeit von in die Umwelt eingebrachten Mikroorganismen die derzeitigen Hindernisse für die Verwendung von Bioinokulanten überwunden werden.

## Referenzen

Bashan Y., Puente M.E., Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., Pedrin S. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1938-1945.

Bonaterrea A., Badosa E., Daranas N., Francés J., Roselló G., Montesinos E. 2022. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10(9), 1759.

Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. 2004. Legume seed inoculation technology-a review. *Soil biology and biochemistry*, 36(8), 1275-1288.

de Faria M. R., Wraight S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43(3), 237–256.

Elad Y. 2003. Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 68(4, PART A), 17–24.

Food and Agriculture Organization for the United Nations. NSP—Integrated Pest Management. Available online: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/> (accessed on 15 July 2024)

- Freimoser F. M., Rueda-Mejia M. P., Tilocca B., Migheli Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35 (10), 154.
- Gilardi G., Tinivella F., Gullino M. L., Garibaldi A. 2005. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* / Entwicklung eines Saatgutbehandlungsverfahrens zur Kontrolle von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 112(3), 240–246.
- Graham J.H., Strauss S.L. 2021. Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes. In: Gentry T.J., Fuhrmann J.J., Zuberer D.A. (eds.) *Principles and applications of soil microbiology*. Third Edition. Elsevier, pp 633-654.
- Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307-319.
- Handelsman J., Stabb E.V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, 8(10), 1855.
- Jaroński S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55,159–185.
- Karpouzias D.K., Vryzas Z., Martin-Laurent F. 2021. Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms. (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 94(10), 1161-1194.
- Kowalska J., Tyburski J., Matysiak K., Tylkowski B., Malusà E. 2020. Field exploitation of multiple functions of beneficial microorganisms for plant nutrition and protection: real possibility or just a hope? *Frontiers in Microbiology*, 11, 1904.
- Kowalska J., Krzywińska J., Tyburski J. 2022. Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. *Agriculture*, 12(9), 1404.
- Malusà E., Berg G., Biere A., Bohr A., Canfora L., Jungblut A.D., Kępka W., Kinzle J., Kusstatscher P., Masquelier S., Pugliese M., Razinger J., Tommasini M.G., Vassilev N., Mayling N.V., Xu X., Mocali S. 2021. A holistic approach for enhancing the efficacy of soil microbial inoculants in agriculture: from lab to field scale. *Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development*, 8, 176-190.
- Minchev Z., Kostenko O., Soler R., Pozo M.J. 2021. Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 12, 756368.
- Pandit M.A., Kumar J., Gulati S., Bhandari N., Mehta P., Katyal R., Rawat, C.D., Mishra, V., Kaur J. 2022. Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens*, 11(2): 273.
- Panth M., Hassler S.C., Baysal-Gurel F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture*, 10(1), 16.
- Ptaszek M., Canfora L., Pugliese M., Pinzari F., Gilardi G., Trzciński P., Malusà E. 2023. Microbial-Based Products to Control Soil-Borne Pathogens: Methods to Improve Efficacy and to Assess Impacts on Microbiome. *Microorganisms*, 11(1), 224.

Pugliese M., Liu B.P., Gullino M.L., Garibaldi A. 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115, 220–228.

Regulation (EC) No 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj> (accessed on 15 July 2024).

Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj> (accessed on 15 July 2024).

Rostas M., Hilker M. 2003. Indirect interactions between a phytopathogenic and an entomopathogenic fungus. *Naturwissenschaften*, 90, 63–67

Sarma B.K., Yadav S.K, Singh S., Singh H.B. 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology & Biochemistry* 87, 25-33.

Sellitto V.M., Zara S., Fracchetti F., Capozzi V., Nardi T. 2021. Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: boundaries between pre- and postharvest applications on vegetables and fruits. *Fermentation* 7(2), 60.

Świechowski W., Doruchowski G., Trzciński P. 2012. Effect of spray application parameters on viability of bacterium *Pseudomonas fluorescens* used as bio-pesticide in organic fruit production. In: Granatstein D., Andrews P. (eds.) *Proc. II Int. Congress on Organic Fruit Research Symposium*. ISHS, Leavenworth WA, USA, pp. 18-21.

Trivedi P., Leach J.E., Tringe S.G., Sa T., Singh B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature reviews microbiology*, 18(11), 607–621.

Waghunde R.R., Shelake R.M., Sabalpara A.N. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22): 1952-1965.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6),533–596.

Zin N.A., Badaluddin N.A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences* 65(2), 168-178.

## Kapitel 3. Mikroorganismen zur Förderung des Pflanzenwachstums

*Samuel Bickel<sup>1</sup>, Paweł Trzciniński<sup>2</sup>, Stefano Mocali<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Technische Universität Graz, Petersgasse 12, 8010 Graz, ÖSTERREICH

<sup>2</sup>Institut für Gartenbau - Nationales Forschungsinstitut, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLEN

<sup>3</sup>Rat für landwirtschaftliche Forschung und Wirtschaft, Forschungszentrum für Landwirtschaft und Umwelt, Via di Lanciola 12/A, 50125 Cascine del Riccio, ITALIEN

Bestimmte Boden-, Rhizosphären- und Pflanzenmikroorganismen sind für das Pflanzenwachstum und die Landwirtschaft von wesentlicher Bedeutung. Wir erklären in diesem Abschnitt, auf welche Weise gängige Mikroorganismen und kommerzielle Stämme das Wachstum von Pflanzen unterstützen können. Wir befassen uns mit der Nutzung und Auswahl von Prä-, Pro- und Postbiotika zur Förderung des Pflanzenwachstums und zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit und Bodengesundheit. Abschließend werden die praktischen Aspekte für die korrekte Anwendung von pflanzenwachstumsfördernden Mikroorganismen erörtert.

### 1. Mikroorganismen, die das Pflanzenwachstum fördern können

Pflanzenwachstumsfördernde Mikroorganismen (Plant Growth-Promoting Microorganisms - PGPM) sind eine wichtige Gruppe, die hauptsächlich aus Bakterien und Pilzen besteht und wesentlich zur Verbesserung des Pflanzenwachstums beiträgt (Glick 2012). Unser Verständnis dafür, wie diese nützlichen Mikroben zur Verbesserung der landwirtschaftlichen Nachhaltigkeit und der Produktivität der Pflanzen genutzt werden können, kann durch den Einsatz kommerzieller PGPM-Stämme und die fortlaufende Forschung an neuartigen Mikroorganismen verbessert werden. Die drei Hauptgruppen von PGPM sind: (1) pflanzenwachstumsfördernde Rhizobakterien, die die Oberfläche von Pflanzenwurzeln besiedeln, (2) endophytische Bakterien, die im Inneren der Wirtspflanze leben, und (3) Mykorrhizapilze, die mit Pflanzenwurzeln symbiotische Beziehungen eingehen. Die wichtigsten Funktionen der PGPM und ihre Verbindung mit dem Pflanzenwirt sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

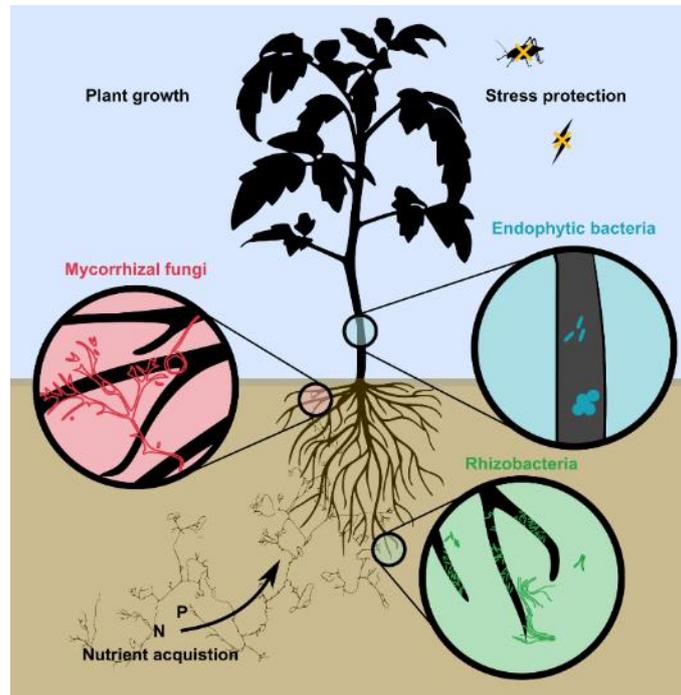


Abb. 3.1. Drei Hauptgruppen von Mikroorganismen, die das Pflanzenwachstum fördern.

Darüber hinaus spielt die mikrobielle Vielfalt des Bodens und der Pflanzen eine entscheidende Rolle bei der Förderung des Pflanzenwachstums durch verschiedene Mechanismen, die der Gesundheit und Entwicklung der Pflanzen zugute kommen. Eine vielfältige mikrobielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre kann die Verfügbarkeit von Nährstoffen für Pflanzen erhöhen. Diese vielfältige Gemeinschaft umfasst Mikroorganismen, die in der Lage sind, das Pflanzenwachstum zu fördern, indem sie die Nährstoffaufnahme und den Nährstoffkreislauf verbessern. Eine hohe mikrobielle taxonomische und funktionelle Vielfalt in der Rhizosphäre wird mit der Unterdrückung von Krankheiten in Verbindung gebracht, die durch bodenbürtige Krankheitserreger verursacht werden, und kann das Pflanzenwachstum fördern. Die Vielfalt und Aktivität mikrobieller Gemeinschaften kann zu einer verbesserten Pflanzenleistung und einem geringeren Auftreten von Krankheiten beitragen, was letztlich das Wachstum und die Gesundheit der Pflanzen fördert. Der Artenvielfalt an nützlichen Mikroben im Boden ist positiv mit der Bodenqualität korreliert, was zu einem besseren Pflanzenwachstum, einem geringeren Auftreten von Krankheiten und einem höheren Nährstoffgehalt führt. Das Vorhandensein vielfältiger mikrobieller Gemeinschaften beeinflusst die biologischen und chemischen Eigenschaften des Bodens und trägt zu einer verbesserten Pflanzengesundheit und zum Funktionieren des Ökosystems insgesamt bei. Darüber hinaus kann die Dynamik der Pflanzengemeinschaft und die Ökosystemprozesse durch die unterirdische mikrobielle Gemeinschaft beeinflusst werden. Die Interaktionen zwischen Pflanzen und einer hohen Artenvielfalt von Mikroorganismen können außerdem die Eigenschaften von Pflanzen beeinflussen und die Anpassung der Pflanzen im Laufe der Zeit formen.

Die komplizierten Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und verschiedenen mikrobiellen Gemeinschaften unterstreichen die Bedeutung der mikrobiellen Vielfalt für die Gesundheit der Pflanzen und das Funktionieren des Ökosystems.

### 1.1. Wirkungsweise - wie fördern die Mikroorganismen das Pflanzenwachstum?

Wie bereits erwähnt, spielen Mikroorganismen durch verschiedene Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Förderung des Pflanzenwachstums. Zu diesen Mechanismen gehören die Produktion von Phytohormonen, die Unterstützung bei der Nährstoffbeschaffung, die Bereitstellung einer systemischen Resistenz gegen Pathogene und der Schutz der Pflanzen vor Stress.

#### Phytohormone

Einer der wichtigsten Wege, wie Mikroorganismen das Pflanzenwachstum fördern, ist die Produktion von Pflanzenhormonen. Diese sogenannten Phytohormone sind Signalmoleküle, die verschiedene Aspekte des Pflanzenwachstums und der -entwicklung regulieren. Viele PGPM können Phytohormone wie Auxine, Cytokinine und Gibberelline synthetisieren, die die Wachstumsprozesse von Pflanzen beeinflussen. So wurde beispielsweise berichtet, dass *Azotobacter spp.*, *Rhizobium spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* und *Paenibacillus polymyxa* Cytokinine synthetisieren, bei denen es sich um wichtige Phytohormone handelt, die pflanzliche Wachstumsprozesse wie Zellteilung, -dehnung und -differenzierung beeinflussen (Glick 2012). Mehrere Bakterienarten können indolische Verbindungen wie das Auxin-Phytohormon Indol-3-Essigsäure (Indole Acetic Acid - IAA) produzieren, das eine wichtige Rolle bei den Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen spielt und das Pflanzenwachstum stimulieren kann (Souza et al. 2015). Die Produktion von IAA durch *Pseudomonas putida* wurde mit einer signifikanten Steigerung der Pflanzenwachstumsparameter und des Ertrags bei Tomatenpflanzen in Verbindung gebracht. Andere Taxa wie Bacilli-Arten, die mit der Rhizosphäre von Weizen assoziiert sind (einschließlich *Bacillus endophyticus*, *Paenibacillus xylanexedens*, *Planococcus citreus*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Sporosarcina sp.* und *Staphylococcus succinus*), weisen multifunktionale und wachstumsfördernde Eigenschaften auf, zu denen möglicherweise auch die Produktion von Phytohormonen gehört. PGPM, die Phytohormone synthetisieren können, können über verschiedene Mechanismen zur Förderung des Pflanzenwachstums und der Pflanzenentwicklung beitragen.

#### Verfügbarkeit von Nährstoffen

Eine weitere wichtige Wirkungsweise von Mikroorganismen zur Förderung des Pflanzenwachstums besteht in der Förderung der Nährstoffaufnahme durch Pflanzen. PGPM können beispielsweise phosphorhaltige Mineralien auflösen, atmosphärischen Stickstoff fixieren und Siderophore produzieren, die Eisen chelatisieren, um es für die Pflanzenwurzeln besser zugänglich zu machen. Indem sie die Nährstoffverfügbarkeit verbessern, fördern diese Mikroorganismen das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen insgesamt. Mikrobielle Inokulantien mit wurzelwachstumsfördernden und nährstoffmobilisierenden Eigenschaften wurden als Strategie zur Verbesserung der Nährstoffaufnahme von Pflanzen vorgeschlagen. Durch die Wechselwirkung mit organischen und anorganischen Düngemitteln können diese Inokulanten die Nährstoffaufnahme durch die Pflanzen erleichtern und zu einem besseren Wachstum und einer besseren Entwicklung beitragen. Es wurde berichtet, dass bestimmte nützliche Rhizobakterien die Nährstoffaufnahme von Pflanzen erhöhen, indem sie die Effizienz der Stickstoffaufnahme aus Düngemitteln steigern. Dies wurde in Studien nachgewiesen, in denen <sup>15</sup>N-Isotopentechniken verwendet wurden, um die Bewegung von Stickstoff in Pflanzengewebe zu verfolgen. Interessanterweise können mikrobielle Inokulantien, die *Bacillus spp.* und arbuskuläre Mykorrhizapilze (AMF) enthalten, das Pflanzenwachstum und den Ertrag steigern, was zu einer verbesserten Effizienz der Nährstoffaufnahme führt.

Diese PGPM können den Pflanzen helfen, mehr Nährstoffe, einschließlich Stickstoff, Phosphor und Kalium, aus dem Boden zu extrahieren, wodurch die Nährstoffaufnahme verbessert wird. Andererseits können *Sphingomonas spp.*, die Auxine und Siderophore produzieren, das Pflanzenwachstum und die Nährstoffaufnahme fördern, indem sie die Entwicklung von Wurzelhaaren und Seitenwurzeln stimulieren. Die vielfältigen Wechselwirkungen von PGPM spielen eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der Nährstoffaufnahme durch Pflanzen, was letztlich zu einem besseren Wachstum, einer effizienteren Nährstoffaufnahme und einer insgesamt besseren Pflanzengesundheit führt.

#### Schutz vor biotischem Stress und systemische Resistenz

Mikroorganismen können auch zum Pflanzenwachstum beitragen, indem sie in den Pflanzen eine systemische Resistenz hervorrufen. PGPM können die Abwehrmechanismen der Pflanzen aktivieren und sie dadurch widerstandsfähiger gegen Krankheitserreger und Krankheiten machen. Diese systemische Resistenz hilft den Pflanzen, verschiedene Stressfaktoren zu bekämpfen und ihre Gesundheit und Vitalität zu erhalten (Vacheron et al. 2013). PGPM wurden als Auslöser der systemischen Resistenz in Pflanzen durch verschiedene Mechanismen identifiziert, darunter die Produktion von Siderophoren, die Produktion von Antibiotika, die Bildung von Phytohormonen und die Aktivierung von systemischen Resistenzwegen. Die Fähigkeit von PGPM, Siderophore zu produzieren, trägt zu ihrer antagonistischen Wirkung gegen Pathogene bei und unterstützt die Induktion systemischer Resistenz bei Pflanzen. Die durch Rhizosphärenbakterien induzierte systemische Resistenz verleiht ein breites Resistenzspektrum und verbessert die Fähigkeit der Pflanzen, sich gegen verschiedene Arten von Krankheitserregern zu verteidigen, und wurde bei einer Reihe von Pflanzenarten wie Arabidopsis, Bohne, Nelke, Gurke, Rettich, Tabak und Tomate beobachtet. Auch hier spielt die mikrobielle Vielfalt, die mit der Pflanze in Berührung kommt, eine Schlüsselrolle, da sie Variabilität für das Training des pflanzlichen Immunsystems bietet. Durch die Auslösung einer induzierten systemischen Resistenz kann PGPM die Abwehrmechanismen der Pflanze stärken und ihre Widerstandsfähigkeit gegen Pathogenangriffe verbessern.

#### Schutz vor abiotischem Stress

Darüber hinaus bieten Mikroorganismen den Pflanzen Schutz vor Stress, insbesondere unter ungünstigen Umweltbedingungen. Indem sie die Rhizosphäre besiedeln und mit den Pflanzenwurzeln interagieren, können PGPM den Pflanzen helfen, abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Salzgehalt und Schwermetalltoxizität zu tolerieren. Diese Fähigkeit zum Schutz vor Stress stärkt die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen und sichert ihr Überleben in schwierigen Umgebungen. Aus rauen Umgebungen isolierte Rhizosphärenbakterien verbessern nachweislich die Trockentoleranz von Weizen. Diese Bakterien steigern die Biomasseproduktion und verringern die Produktion von Stressgiften, was zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegen Trockenheit beiträgt. Der Biofilm der Rhizosphärenbakterien spielt zusammen mit Bodenmulch eine schützende Rolle gegen Trockenheitsstress (Timmusk et al. 2014). So konnte beispielsweise *Paenibacillus polymyxa*, das aus dem Mikrobiom der Rhizosphäre von Wildgerste in Nordisrael isoliert wurde, die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber Trockenheit verbessern, was das Potenzial dieser Art zur Förderung der Dürre-resistenz von Nutzpflanzen unterstreicht. Auch *Stenotrophomonas rhizophila* und andere nützliche Mikroben sind in der Lage, Wurzelgewebe zu besiedeln, so dass die Bakterien eng mit der Wirtspflanze interagieren können, was möglicherweise den Austausch nützlicher Stoffe erleichtert und die Stresstoleranz der Pflanzen erhöht. *S. rhizophila* weist eine ausgeprägte Salztoleranz auf,

indem es hochwirksame Osmolyte wie Glucosylglycerin, Trehalose und Spermidin produziert, die das Überleben der Pflanzen unter rauen Umweltbedingungen fördern. Diese Stressschutzmittel begünstigen das Pflanzenwachstum und unterstützen den Wurzelschutz, was zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber verschiedenen Stressfaktoren beiträgt (Alavi et al. 2013). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PGPM eine Kombination von Mechanismen einsetzen, darunter die Produktion von Osmoschutzmitteln, eine verbesserte Anpassungsfähigkeit an die Umwelt, den Schutz der Wurzeln vor Stress und die Besiedlung von Wurzelgewebe, um Pflanzen vor Stress zu schützen und ihr Wachstum und Überleben in schwierigen Umgebungen zu fördern.

### 1.2. Kommerzielle PGPM-Stämme - von der Forschung zur Anwendung

In der Forschung untersuchen Wissenschaftler ständig neue Stämme von Mikroorganismen mit pflanzenwachstumsfördernden Eigenschaften. Diese "Forschungsstämme" werden einer strengen Bewertung unterzogen, um ihre Wirkmechanismen, ihre Wirksamkeit bei der Förderung des Pflanzenwachstums und ihre potenziellen Anwendungen in der Landwirtschaft zu verstehen. Durch die Untersuchung dieser Stämme wollen die Forscher die Wissensbasis über die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroben erweitern und innovative Strategien für eine nachhaltige Pflanzenproduktion entwickeln. Boden- und Pflanzenimpfstoffe auf PGPM-Basis haben vielversprechende Ergebnisse bei der Verringerung des Einsatzes von chemischen Düngemitteln gezeigt und werden derzeit als Komponenten integrierter Nährstoffmanagementstrategien weiter untersucht (Adesemoye et al. 2009).

In der kommerziellen Landwirtschaft hat die Verwendung spezifischer PGPM-Stämme an Bedeutung gewonnen. Diese kommerziellen Stämme werden aufgrund ihrer Wirksamkeit bei der Förderung des Pflanzenwachstums und der Verbesserung der Ernteerträge ausgewählt. Durch die Nutzung der positiven Auswirkungen dieser Mikroorganismen können Landwirte die Produktivität und Nachhaltigkeit ihrer Praktiken verbessern. Zu den beliebtesten kommerziell genutzten PGPM gehören *Rhizobia*, *Pseudomonas spp.*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.* Diese im Handel erhältlichen mikrobiellen Inokulanzen werden üblicherweise als Biodünger oder Bioenhancer-Produkte verwendet, die einzelne Arten oder mehrere Stämme nützlicher Mikroorganismen enthalten, deren Fähigkeit, das Pflanzenwachstum zu fördern, die Nährstoffaufnahme zu verbessern, die Toleranz der Pflanzen gegenüber Stressfaktoren zu erhöhen und zu einer nachhaltigen Pflanzenproduktion in kleinbäuerlichen Agrarökosystemen beizutragen, eingehend untersucht wurde. Tabelle 1 gibt einen Überblick über gängige PGPM, ihre Wirkmechanismen und die Vorteile, die sie den Pflanzen bieten.

Tab. 1. Übliche pflanzenwachstumsfördernde Mikroorganismen (PGPMs).

Mikroorganismus	Mechanismen der Wirkung	Vorteile für Pflanzen	Beispiel
Rhizobakterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produktion von Phytohormonen</li> <li>• Auflösen von Nährstoffen (z. B. Phosphor)</li> <li>• Induktion einer systemischen Resistenz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verbessertes Pflanzenwachstum und -entwicklung</li> <li>• Verbesserte Nährstoffaufnahme</li> <li>• Erhöhte Resistenz gegen Krankheitserreger</li> </ul>	<u><i>Bacillus subtilis</i></u> produziert Phytohormone wie Auxine, löst Nährstoffe wie Phosphor auf und induziert eine systemische Resistenz bei Pflanzen
Endophytische Bakterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aufbau enger Beziehungen zu Pflanzen</li> <li>• Produktion von wachstumsfördernden Substanzen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verbessertes Pflanzenwachstum</li> <li>• Schutz vor Krankheiten und Stress</li> </ul>	<u><i>Pseudomonas fluorescens</i></u> geht symbiotische Beziehungen mit Pflanzen ein, sondert wachstumsfördernde Substanzen wie Indolelessigsäure (IAA) ab und unterstützt die Nährstoffaufnahme
(Arbuskuläre) Mykorrhizapilze	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erleichterung der Aufnahme von Nährstoffen, insbesondere von Phosphor</li> <li>• Verbesserung der Pflanzentoleranz gegenüber Stressfaktoren</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verbesserte Nährstoffaufnahme</li> <li>• Gesteigerte Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Umweltbelastungen</li> </ul>	<u><i>Rhizophagus irregularis</i></u> (ehemals <i>Glomus intraradices</i> ) bildet arbuskuläre Mykorrhiza-Assoziationen mit Pflanzenwurzeln, die die Phosphoraufnahme erleichtern und die Stresstoleranz der Pflanzen erhöhen

## 2. Nutzung von Prä-, Pro- und Postbiotika zur Förderung des Pflanzenwachstums und zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit und -gesundheit

In den letzten 20-30 Jahren wurden zahlreiche PGPM isoliert, charakterisiert und unter kontrollierten und natürlichen Bedingungen als Biodünger und Biokontrollmittel getestet. Die Ergebnisse bestätigten die positive Wirkung der ausgewählten Mikroorganismen auf das Pflanzenwachstum und die Pflanzengesundheit, die Erhöhung des Nährstoffgehalts und die Verbesserung der Bodeneigenschaften, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Der Schwerpunkt der wissenschaftlichen Tätigkeit im Bereich der mikrobiellen Inokulationen liegt nun auf der Entwicklung umweltfreundlicher und effizienter mikrobieller Formulierungen und der Analyse, wie die eingeführten Mikroorganismen die mikrobielle Gemeinschaft, die Diversität und die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Mikroorganismus beeinflussen.

In diesem Rahmen befasste sich das EXCALIBUR-Projekt<sup>1</sup> mit der biologischen Vielfalt aus verschiedenen Blickwinkeln und konzentrierte sich dabei auf die Bodengesundheit im Gartenbau, um so die sektorübergreifende Integration von Menschen, Böden, Pflanzen und Ökosystemen im Sinne eines "One Health"-Ansatzes zu stärken. In Anbetracht der Komplexität des Bodensystems gingen wir über die vereinfachte Sichtweise einzelner Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroben oder Boden und Pflanzen hinaus und betrachteten die Schlüsselfaktoren, die dieses komplexe Ökosystem beeinflussen, einschließlich der Pflanze, des Bodens und der Bodenorganismen als gesamten "Metaorganismus", der in der Lage ist, die verschiedenen Stoffwechselprozesse (Ströme), die zur Pflanzengesundheit und Produktivität beitragen, zu vermitteln und zu beeinflussen. Eine Kombination von Prä-, Pro- und Postbiotika wurde daher eingesetzt, um das nützliche Mikrobiom des Bodens zu steuern und zu stimulieren. Kurz gesagt, haben wir Bewirtschaftungspraktiken mit neu entwickelten Formulierungen integriert, die nützliche mikrobielle Bioinokula (probiotischer Ansatz) und Bioeffektoren (präbiotischer Ansatz) enthalten, um zu verstehen, wie diese die Produktivität der Pflanzen, die biologische Vielfalt des Bodenlebens und die Bodenfruchtbarkeit beeinflussen. Der „präbiotische Ansatz“ zielt darauf ab, die Fähigkeit der Pflanzen zu verbessern, die biologische Vielfalt, die sie umgeben, zu nutzen, indem die Bodenmikrobiota und Pflanzenendophyten stimuliert werden. Der „probiotische Ansatz“ hingegen beinhaltet die Einführung von nützlichen Mikroorganismen in den Boden/die Pflanze, um die Pflanzenernährung oder den Pflanzenschutz zu verbessern. EXCALIBUR ging diese Herausforderung mit einem systemischen Ansatz an und untersuchte: (i) wie sich Anbausysteme auf die biologische Vielfalt im Boden und ihre Dynamik auswirken; (ii) wie die einheimische biologische Vielfalt die Wirksamkeit neuer Bioprodukte, insbesondere im Hinblick auf Pflanzenernährung und -schutz, beeinflusst; (iii) wie Anbaustrategien mit Bioinokula verbessert werden können, um den Landwirten auf Betriebsebene stabile Erträge zu bieten und die biologische Vielfalt auf regionaler Ebene bzw. auf Landesebene zu schützen.

Die Umsetzung einer Strategie, die Präbiotika, Probiotika und Postbiotika integriert, kann zu verschiedenen Vorteilen für das Pflanzenwachstum und die Bodenfruchtbarkeit führen. Prä- und Postbiotika verbessern die Verfügbarkeit von Pflanzennährstoffen, unterdrücken Krankheiten, verbessern die Bodenstruktur und die Stresstoleranz. Insgesamt tragen sie zu einer nachhaltigen Landwirtschaft bei, indem sie ein gesundes Bodenmikrobiom fördern, die Abhängigkeit von chemischen Düngemitteln und Pestiziden verringern und die

---

<sup>1</sup> <https://cordis.europa.eu/project/id/817946>

Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Umweltbelastungen erhöhen. Bei der Umsetzung präbiotischer, probiotischer und postbiotischer Strategien in der Landwirtschaft müssen jedoch Faktoren wie die mikrobielle Verträglichkeit, die Anwendungsmethoden und die Umweltbedingungen berücksichtigt werden. Laufende Forschung ist erforderlich, um diese Ansätze zu optimieren und ihre langfristigen Auswirkungen auf die Bodengesundheit und die Pflanzenproduktivität zu verstehen.

### 2.1. Wie wählt man ein pflanzliches Präbiotikum, Probiotikum oder Postbiotikum aus?

Auf der Grundlage der obigen Überlegungen konnten drei Strategien für ein mikrobiell gesteuertes Management von Boden-Pflanze-Systemen ausgewählt werden, die auf Präbiotika, Probiotika und Postbiotika basieren (Abb. 3.2.).

#### Präbiotika

Präbiotika sind Produkte, die die mikrobielle Vielfalt und die Gesundheit des Bodens verbessern, indem sie das Wachstum von Bodenmikroorganismen fördern, die bereits im System Boden-Pflanze vorhanden sind. Präbiotika sind natürliche Produkte, in der Regel agroindustrielle Abfälle wie Biokohle, Klärschlamm, Kompost, Humus, tierischer Dünger und chitinhaltige Abfälle, die (insbesondere in degradierten Böden) die Bodenstruktur und die biochemische Aktivität verbessern und die mikrobielle Population und Vielfalt erhöhen. Kompost und tierischer Dünger können jedoch als so genannte "symbiotische" Produkte betrachtet werden, da sie Mikroorganismen (einige von ihnen mit nützlichen Eigenschaften) enthalten. Auf Festkörperfermentation basierende Inokulantien können ebenfalls als Symbionten definiert werden, da sie multifunktionale Mischungen aus mineralisierten organischen Stoffen (mit präbiotischen und Trägerfunktionen) und pflanzenfreundlichen Mikroorganismen (mit probiotischen, das Pflanzenwachstum fördernden oder biokontrollierenden Funktionen) sind (Vassileva et al. 2020). Wenn probiotische Mikroorganismen beispielsweise ein Phosphat solubilisieren, könnte die symbiotische Mischung zusätzlich mit pflanzenverfügbarem Phosphat angereichert werden. Ähnliche symbiotische Eigenschaften wurden bei mikrobiellen Inokulanten beobachtet, die in natürlichen Gelen in Gegenwart von Zusätzen mit nützlicher mikrobieller stimulierender Wirkung eingekapselt sind.

#### Probiotika

Probiotika gelten gemeinhin als nützliche Mikroorganismen, die gesundheitsfördernde und nährstoffmobilisierende Eigenschaften aufweisen. Nach dem Einbringen in den Boden sollten Probiotika eine kritische Biomasse entwickeln, damit sie ihre pflanzenfördernden Eigenschaften entfalten können. Besonders attraktiv sind Bakterien mit hoher Enzymaktivität (ACC-Deaminase), Produktion von Phytohormonen (Auxine, Cytokinine, Gibberelline) und osmotischen Stoffwechselprodukten (z. B. Trehalose, Glycinbetain). Da das mikrobielle Wachstum von den Pflanzen-Bodeneigenschaften sowie den Umweltbedingungen abhängt, scheint es für einen einzelnen Mikroorganismus oder ein mikrobielles Konsortium schwierig zu sein, die erforderliche kritische Zellzahl zu erreichen. Nach rigorosen Studien zur Isolierung, Selektion und Charakterisierung von PGPM konzentrieren sich die Forscher daher auf die Entwicklung wirtschaftlicher biotechnologischer Verfahren zur Produktion von Biomasse/Sporen und zur Formulierung, die das Überleben und Wachstum des Inokulums gewährleisten. Eine der vielversprechendsten Formulierungstechniken ist die Verkapselung in Makro- und Mikrokügelchen aus Polysacchariden, die eine kontinuierliche Abgabe des Inokulums in den Boden gewährleistet und die

Auswirkungen von Boden- und Umweltstressfaktoren einschließlich der einheimischen mikrobiellen Gemeinschaft verhindert. Es sollten Doppel-/Mehrfach-Impfstoffe in Kombination mit Biostimulanzien und anderen Zusatzstoffen, einschließlich Saatgut (intelligente All-in-One-Bioformulierungen), entwickelt werden, um die herkömmlichen chemischen Düngemittel zu ergänzen. Eine weitere Option zur Vermeidung von Problemen in jeder Phase der Produktion, Formulierung, Lagerung und Etablierung/Wirkung der PGPM im Boden ist die Verwendung ihrer pflanzenfreundlichen Metaboliten (Postbiotika).

### Postbiotika

Postbiotika sind Stoffwechselnebenprodukte oder -substanzen, die von PGPM erzeugt werden und spezifische wachstumsfördernde und/oder biokontrollierende Wirkungen auf Pflanzen ausüben, wodurch die mit der Anwendung mikrobieller Zellen verbundenen Risiken vermieden werden. Spezifische Beispiele für solche Metaboliten sind Phytohormone, flüchtige Stoffe und Quorum-Sensing-Verbindungen. Welche Risiken birgt die Verwendung von Mikroorganismen in Boden-Pflanze-Systemen? Falsche Formulierungsverfahren ohne Osmoseschutzmittel, UV-Schutzmittel, Füllstoffe mit Nährwert und andere pflanzenfördernde Zusatzstoffe können unter Feldbedingungen zu uneinheitlichen Ergebnissen führen. Zu den weiteren Risiken gehören verschiedene abiotische und biotische Faktoren, die die Geschwindigkeit der mikrobiellen Besiedlung, das Vorhandensein anderer, kompetenterer Komponenten der mikrobiellen Population, den Bedarf der Pflanzen und die Fähigkeit, nützliche Mikroorganismen anzuziehen und zu ernähren, beeinflussen. Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass die Protokolle für die Feldanwendung von PBM keine Garantie dafür bieten, dass sie ihre Nische der Etablierung und Funktion finden werden. Außerdem ist noch nicht klar, welche Art von Metaboliten die eingeführten Mikroorganismen im System Boden-Pflanze freisetzen werden. Diese komplexen Bedingungen bestimmen die Überlebensrate der Inokulanten und die Erfüllung ihrer Zielfunktionen (Kaminsky et al. 2019). Die Analyse all dieser Aspekte zeigt, dass endophytische Mikroorganismen besser vor ungünstigen Umweltbedingungen geschützt und darüber hinaus funktionell effizienter sind.

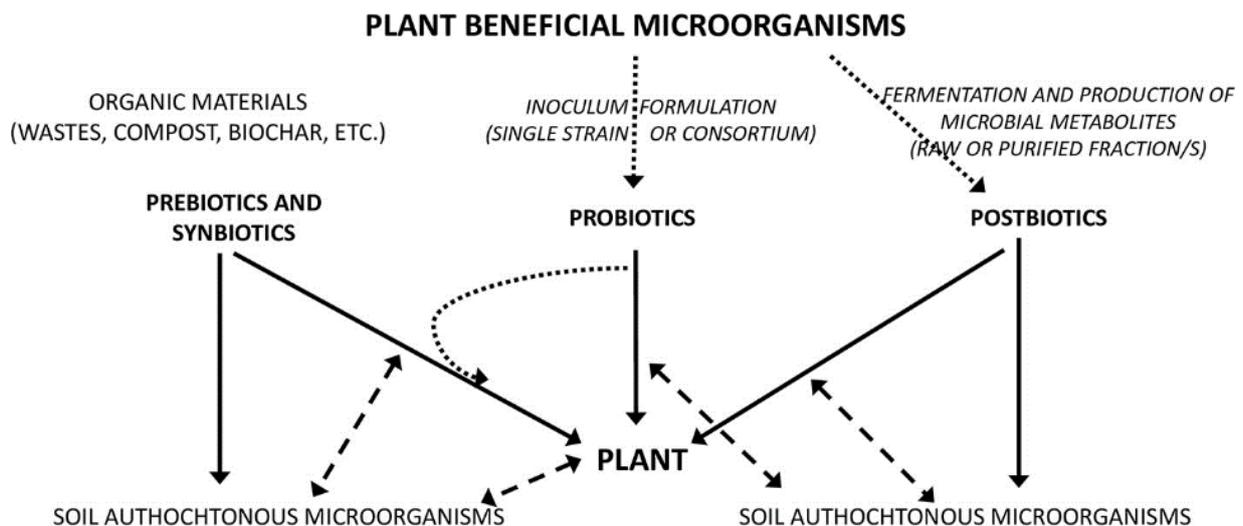


Abb. 3.2. - Diagramm, das die drei Strategien für das mikrobielle Management von Boden und Pflanzen zeigt, die auf präbiotischen, probiotischen und postbiotischen Ansätzen basieren. Die durchgezogenen Linien zeigen die direkte Wirkung, die gestrichelten Linien die Wechselwirkungen, die gepunkteten Linien die Formulierungs-/Produktionsprozesse (Quelle: Vassileva et al. 2020).

### 3. Praktische Aspekte für den richtigen Einsatz von pflanzenwachstumsfördernden Mikroorganismen

Da es sich bei Mikroorganismen um Lebewesen handelt, muss das Produkt, das auf ihnen basiert, richtig angewendet werden, um die Organismen am Leben zu erhalten. Es gibt viele entscheidende Aspekte, die das Überleben und die Wirksamkeit von Bakterien- und Pilzinokula beeinflussen, aber es gibt einige allgemeine Regeln:

1. Die richtigen Lagerungsbedingungen - Exposition der Präparate gegenüber hohen oder niedrigen Temperaturen, starkem Licht oder Feuchtigkeit - können die Anzahl der lebensfähigen Zellen im Produkt schnell verringern.
2. Die Verwendung hängt von der Art des Mikroorganismus ab - einige nützliche Mikroorganismen wie arbuskuläre Mykorrhizapilze (AMF) müssen direkt in den Boden eingebracht werden, vorzugsweise in der Nähe der Wurzelzone, während andere, die als biologische Bekämpfungsmittel oder Endophyten im direkten Kontakt wirken, auf die Blätter oder andere Pflanzenteile gesprüht werden können.
3. Die Witterungsbedingungen sollten für den Einsatz der Mikroorganismen geeignet sein - die Anwendung der mikrobiellen Produkte sollte ähnlich erfolgen wie die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (Vermeidung von hohen oder niedrigen Temperaturen, Regen usw.).
4. Einige agrotechnische Praktiken könnten die Wirksamkeit der mikrobiellen Inokula verringern - zum Beispiel hemmt die Düngung, insbesondere mit Phosphor, das Wachstum der AMF; die gleichzeitige Anwendung von Pflanzenschutzmitteln und nützlichen Mikroorganismen könnte die Mikroben teilweise oder ganz zerstören.
5. Im Gegensatz zu chemischen Pflanzenschutzmitteln oder Düngemitteln sind mikrobielle Produkte nicht schnell wirksam und sollten zur Vorbeugung eingesetzt werden. Außerdem wirken die biologischen Bekämpfungsmittel nicht als systemische Fungizide und können daher nicht zur "Entfernung" von Krankheitserregern aus den Pflanzen eingesetzt werden.

Die Behandlungsmethoden können je nach Zweck unterteilt werden, d. h. Spritzanwendung, Bodenbehandlung oder Saatgutbehandlung. Außerdem unterscheidet sich die Behandlung in einigen Fällen zwischen Feld- und Gewächshausanbau.

Die Sprühanwendung wird hauptsächlich zur Behandlung der oberirdischen Pflanzenteile eingesetzt. Aufgrund der rauen Bedingungen durch Sonneneinstrahlung, fehlende Nährstoffquellen und Austrocknung der Pflanzen müssen die Behandlungen während der Vegetationsperiode mehrmals wiederholt werden. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden endophytische Bakterien, beispielsweise aus der Gattung *Methylobacterium*. Es besteht auch die Möglichkeit, ein Inokulum auf die Bodenoberfläche aufzubringen, um sie mit nützlichen Mikroorganismen anzureichern. Diese Methode ist jedoch eher unwirksam, da die Mikroben Probleme haben, in den Boden einzudringen und/oder die Wurzelzone zu erreichen. Der Vorteil der Sprühmethode besteht darin, dass sie mit den üblichen Landmaschinen leicht durchzuführen ist. Allerdings gibt es Einschränkungen bei der Anwendung dieser Methode. Eine längere und intensive Flüssigkeitszirkulation im Flüssigkeitssystem des Sprüheräts führt zum Absterben der Bakterienzellen durch mechanische Beschädigung (Doruchowski et al. 2015). Darüber hinaus könnten die Größe der Aerosolisierungsrate (eine geringere Überlebensrate wurde mit kleineren Tröpfchen in Verbindung gebracht), die Temperatur (die höchste Überlebensrate wurde bei 12 °C festgestellt) und die relative

Luftfeuchtigkeit (das optimale Feuchtigkeitsniveau lag bei 70-80 %) das Überleben der Bakterienzellen beeinflussen (Marthi et al. 1990).

Die Saatgutbehandlung wird durchgeführt, um Pflanzen mit symbiotischen Mikroorganismen zu impfen, sie vor Krankheitserregern zu schützen oder die Keimung zu beschleunigen. Es gibt verschiedene Methoden der Saatgutbehandlung, aber im Allgemeinen beruht diese Methode auf der Beschichtung der Samen mit einem Inokulum, das mit Bindemitteln und gegebenenfalls mit Zellschutzmitteln vermischt ist. Üblicherweise werden Pflanzen mit arbuskulären Mykorrhizapilzen oder Leguminosen mit symbiotischen stickstofffixierenden Bakterien wie *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* geimpft. Außerdem könnte das Saatgut mit biologischen Bekämpfungsmitteln wie *Trichoderma* spp. oder *Bacillus* spp. behandelt werden, um die Wahrscheinlichkeit eines Befalls durch Pflanzenschädlinge zu verringern. Abgesehen von der Inokulation des Saatguts kann die gleiche Technik auch zur Behandlung von Setzlingen beim Umtopfen oder vor dem Einpflanzen verwendet werden. Der Vorteil der Behandlung von Saatgut oder Sämlingen mit symbiotischen Bakterien oder Pilzen besteht darin, dass die Inokulation in der Regel nur einmal durchgeführt werden muss und die Saatgutbehandlung in den meisten Fällen mit einfachen Maschinen erfolgen kann. Im Gegensatz dazu ist die Behandlung von Setzlingen komplizierter, da die jungen Pflanzen empfindlich sind und menschliche Arbeitskraft oder spezielle Ausrüstung erfordern.

Bei der Bodenausbringung werden die nützlichen Mikroben direkt in die Wurzelzone der Pflanzen oder in den Boden eingebracht. Eine andere Methode besteht darin, die Mikroorganismen mit dem Kultursubstrat zu mischen, um es mit den nützlichen Bakterien oder Pilzen anzureichern (häufiger unter Gewächshausbedingungen), bevor die Pflanzen oder Samen gepflanzt werden. Die Ausbringung von Mikroorganismen in den Mutterboden (mit speziellen Düngemitteln oder als mikrobielles Präparat) könnte mit herkömmlichen landwirtschaftlichen Maschinen leicht durchgeführt werden. Aufgrund wirtschaftlicher Beschränkungen beläuft sich die Dosierung kommerzieller Präparate jedoch je nach Formulierung in der Regel auf mehrere Kilogramm oder Liter pro Hektar. Daher ist das Verhältnis der ausgebrachten Mikroorganismen pro cm<sup>3</sup> Boden gering, da das Inokulum über die gesamte Fläche des Feldes verteilt wird (also dort, wo es Pflanzen gibt und dort, wo es keine Pflanzen gibt). Im Gegensatz dazu ermöglicht die direkte Einbringung des Inokulums in die Wurzelzone eine höhere Konzentration von Mikroben an dem Ort, an dem sie die Wurzeln beeinflussen oder das Mikrobiom der Rhizosphäre beeinflussen können. Wissenschaft, höhere Konzentration, die eingeführten Mikroorganismen haben eine größere Chance auf Erfolg im Boden. Beim EXCALIBUR-Projekt beispielsweise wurde das biologische Bekämpfungsmittel auf *Trichoderma*-Basis kurz vor dem Einpflanzen der Setzlinge in die Pflanzlöcher eingebracht. Nach der Vegetationsperiode wurde die Pilzpopulation im behandelten Boden von dem eingeführten Pilz dominiert (Abb. 3.3.). Diese Methode ist jedoch bei bereits wachsenden Pflanzen nur schwer durchführbar und bei der Anwendung von Mikroorganismen auf verpflanzte Setzlinge arbeitsintensiv und zeitaufwändig. Die am häufigsten verwendeten Mikroorganismen bei der Bodenausbringung sind AMF, stickstofffixierende Bakterien, Phosphorlöser und biologische Bekämpfungsmittel.

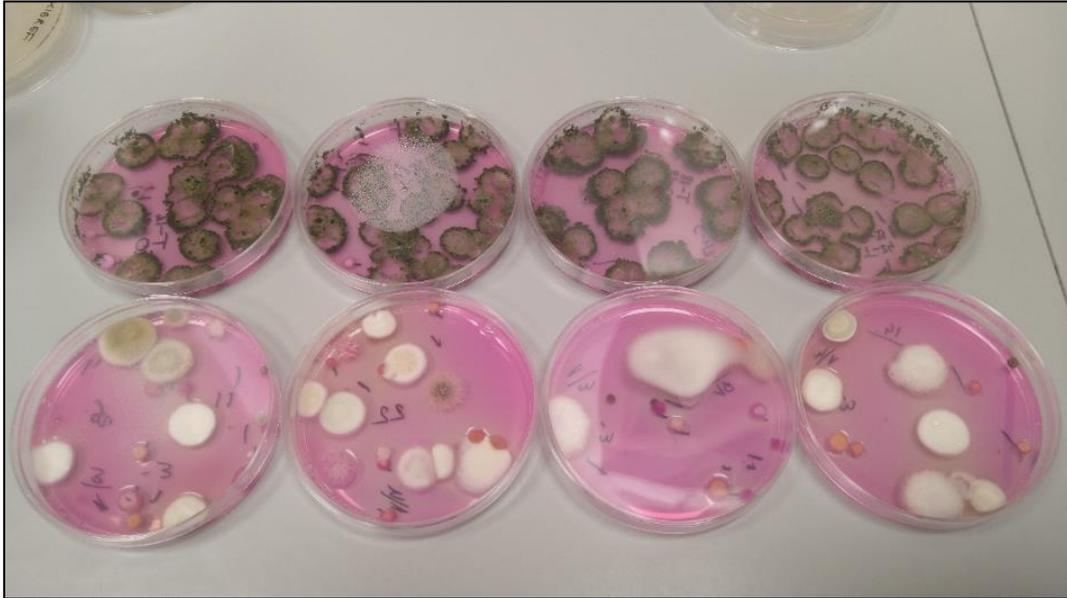


Abb. 3.3. Vergleich der Pilzpopulationen im mit *Trichoderma* behandelten Boden (obere Plattenreihe) und im unbehandelten Kontrollboden (untere Plattenreihe). Die grünen Kolonien gehören zur Gattung *Trichoderma*.

Autor: Paweł Trzciniński.

Eine andere Art der Bodenausbringung ist die Einführung von Mikroorganismen durch Bewässerungssysteme. Diese Methode ist einfach durchzuführen, da die Mikroorganismen den Pflanzen mit dem Bewässerungswasser zugeführt werden. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass nur wasserlösliche Formulierungen verwendet werden können und dass nach jeder Anwendung alle Elemente des Bewässerungssystems mit Wasser gespült werden müssen, um sie von den Rückständen des Inokulums zu reinigen. Wissenschaftlich gesehen enthalten die mikrobiellen Produkte neben den Bakterien oder Pilzen auch Träger- oder Füllstoffe, die von den Mikroorganismen oft als Nahrung und Energiequelle genutzt werden können. Infolgedessen könnten einige Teile des Bewässerungssystems, insbesondere Tropfkörper, durch die Biomasse verstopft werden. Die häufigsten Mikroorganismen, die in den verstopften Tropfeinspritzern gefunden werden, sind Pilze der Gattung *Trichoderma* (Boari et al. 2008; Trzcinski et al. 2013).

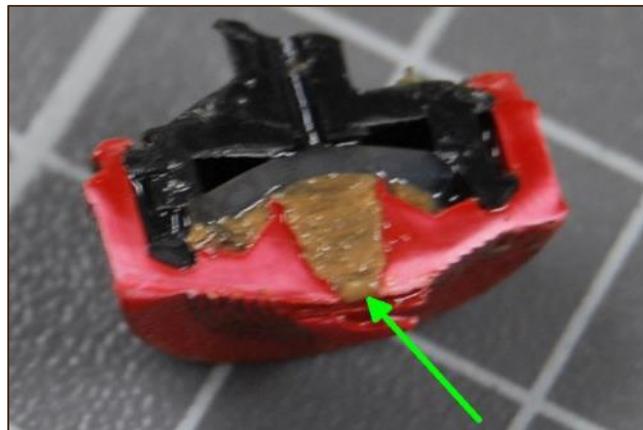
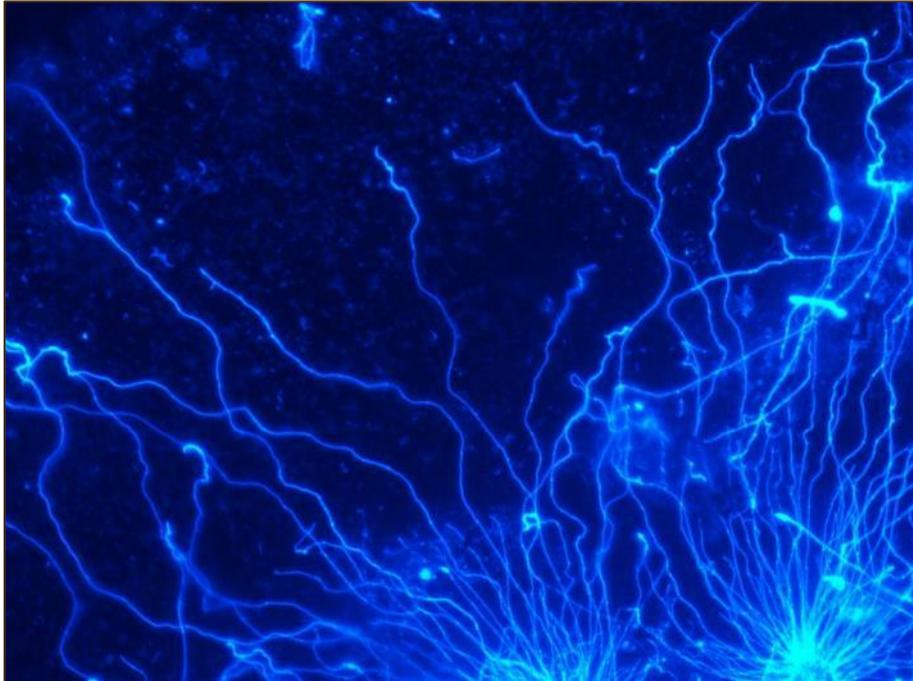
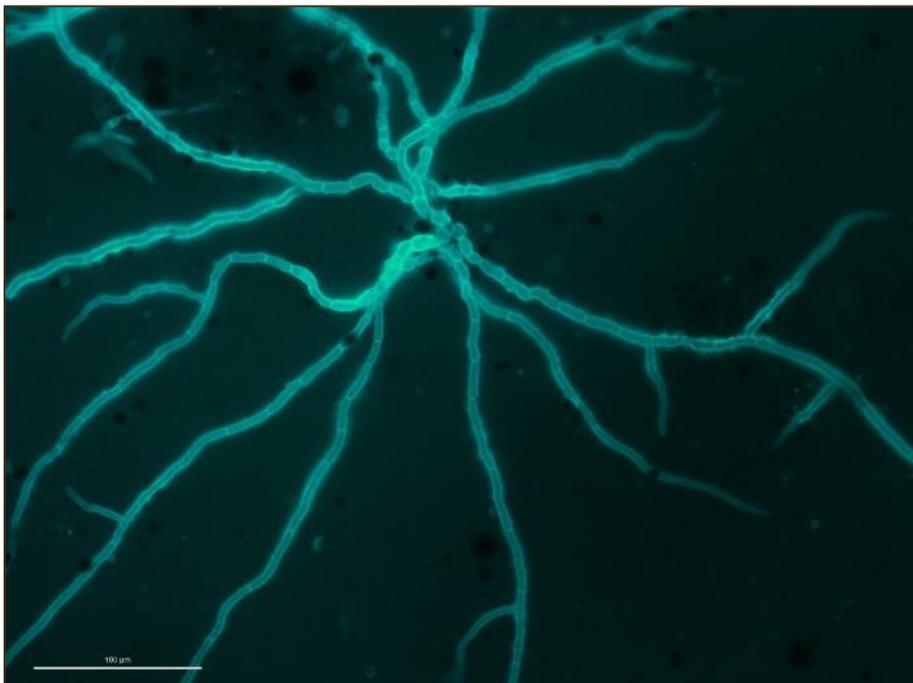


Abb. 3.4. Durch Biomasse auf Pilzbasis verstopfter Tropfkörper.

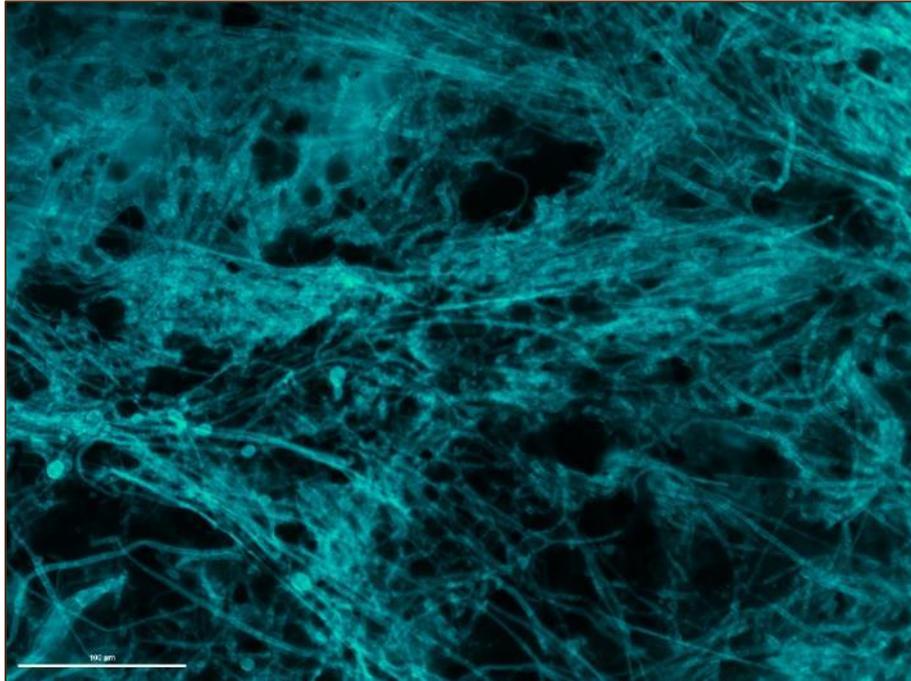
Autor: Paweł Trzciniński.



*Abb. 3.5a. Pilze, die auf der Innenseite des Tropfstrahlers wachsen. Das Präparat wurde mit KOH und Calcofluorweiß angefärbt und unter einem Mikroskop mit UV-Licht beobachtet.  
Autor: Paweł Trzcziński.*



*Abb. 3.5b. Pilze, die auf der Membran des Tropfstrahlers wachsen. Das Präparat wurde mit KOH und Calcofluorweiß angefärbt und unter einem Mikroskop mit UV-Licht beobachtet.  
Autor: Paweł Trzcziński.*



*Abb. 3.6. Struktur der Pilzbiomasse aus dem verstopften Tropfkörper. Das Präparat wurde mit KOH und Calcofluorweiß gefärbt und unter einem Mikroskop mit UV-Licht betrachtet.*

*Autor: Paweł Trzciński.*

## Referenzen

- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology*, 58(4), 921–929.
- Alavi P., Starcher M. R., Zachow C., Müller H., Berg G. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Frontiers in plant science*, 4, 141.
- Boari A., Zuccari D., Vurro M. 2008. ‘Microbigation’: Delivery of biological control agents through drip irrigation systems. *Irrigation Science*, 26(2), 101–107.
- Doruchowski G., Świechowski W., Trzciński P., Sas-Paszt L., Hołownicki R. 2015. Effect of spray application parameters on viability of rhizobacteria used as bio-pesticides in organic fruit production. 448, 60–61.
- Glick B.R. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012, 1–15.
- Kaminsky L. M., Trexler R. V., Malik R. J., Hockett K. L., Bell, T. H. 2019. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. *Trends in Biotechnology*, 37(2), 140-151.
- Marthi B., Fieland V. P., Walter M., Seidler R. J. 1990. Survival of bacteria during aerosolization. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3463–3467.
- Souza R.D., Ambrosini, A., Passaglia L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419.

Timmusk S., Abd El-Daim I. A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., Stenström E., Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLOS ONE*, 9(5), e96086.

Trzcinski P., Sas-Paszt L., Treder W. 2013. Mikrobiologiczne przyczyny zapychania się kroplowników. *Hasło Ogrodnicze*, 02.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356.

Vassileva M., Flor-Peregrin E., Malusá E., Vassilev N. 2020. Towards Better Understanding of the Interactions and Efficient Application of Plant Beneficial Prebiotics, Probiotics, Postbiotics and Synbiotics. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1068.

## Kapitel 4. Produktionstechnologie für mikrobiologische Produkte

*Katarzyna Góralaska<sup>1</sup>, Magdalena Jopek<sup>1</sup>, Anna Gierut-Kot<sup>1</sup>, Jakub Drewniak<sup>1</sup>, Roksana Rakoczy-Lelek<sup>1</sup>,  
Maria Bylica<sup>1</sup>, Radosław Wilk<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>INTERMAG sp. z o.o., Al. 1000-lecia 15G, 32-300 Olkusz, POLEN

Ziel dieses Kapitels ist es, das faszinierende Gebiet der Mikrobentechnologie vorzustellen, dass nicht nur unsere Sichtweise auf Mikroorganismen verändert, sondern auch das Potenzial hat, revolutionäre Auswirkungen auf unsere tägliche Realität zu haben. Indem wir diesen Bereich verstehen und vorantreiben, können wir die Tür zu Entdeckungen, innovativen Produkten und Nachhaltigkeit im globalen Maßstab öffnen.

### 1. Arten von Formulierungen (in einem praktischen Kontext - wofür, welche wir verwenden und warum).

Bei der Konzeption und Entwicklung mikrobiologischer Produkte mit pflanzenfördernden Eigenschaften sind die folgenden Punkte entscheidend, um ein gutes Endprodukt zu erhalten (Vassileva et al. 2021):

1. Isolierung und Charakterisierung eines effizienten Mikrobenstammes;
2. Entwicklung eines effizienten Fermentationsprozesses für die Produktion von Biomasse und/oder Sporen;
3. ein effizientes Formulierungsverfahren

Weniger untersucht, aber von entscheidender Bedeutung ist die Wahl der geeigneten Formulierungstechnik, um die höchste Effizienz und Stabilität des Produkts in Boden-Pflanze-Systemen zu gewährleisten. Unter den auf dem Markt erhältlichen Formulierungen dominieren flüssige und feste Produkte (Ibañez et al., 2023). Die Wahl des Formulierungsverfahrens hängt mit der Art der Fermentation zusammen - es ist der technologische Prozess, der schließlich die Biomasse/Sporen produziert, die formuliert werden sollten. So stellen einige Unternehmen sporenhaltige Biokontrollprodukte auf der Grundlage der Feststofffermentation her, während andere Unternehmen flüssige zellhaltige Produkte auf der Grundlage der Flüssig-Submersfermentation bevorzugen.

Flüssige Formulierungen basieren auf wässrigen Lösungen, Öllösungen oder Öl-in-Wasser-Emulsionen, wobei seltener Polymere verwendet werden. Mikroorganismen in flüssigen Lösungen benötigen oft Zusätze wie Nährlösungen mit basischen Nährstoffen oder Substanzen, die die gesamte Formulierung stabilisieren (Chaudhary et al. 2020). Umgekehrt müssen bei frei fließenden Produkten Trägermaterialien verwendet werden, um die Persistenz der Mikroorganismen zu unterstützen. Diese Materialien sollten umweltneutral sein und sich durch eine spezifische, zell- bzw. sporenhaltende, poröse Struktur auszeichnen. Materialien wie Torf, Talk, Braunkohle, Kaolinit und Zeolith sind häufig verwendete Träger. Bei INTERMAG verwenden wir Bakterien zur Herstellung von Bulk-Formulierungen, die durch Trocknung von Biomasse bei niedrigen Temperaturen und Druck (Gefriertrocknung) gewonnen werden. Es sollte erwähnt werden, dass die in Bulk-Formulierungen verwendeten Träger die Überlebensrate der Bakterien erhöhen, sie vor Änderungen des Feuchtigkeitsgehalts schützen und das Volumen des Produkts vergrößern, was zu einer gleichmäßigen Verteilung der Mikroorganismen während der Anwendung führt (Singleton et al. 2022) und somit ihre Entwicklung und Wirksamkeit in Boden-Pflanzen-Systemen erhöht.

Flüssige und frei fließende Formulierungen haben ihre eigenen spezifischen Eigenschaften, die bei der Herstellung eines mikrobiellen Produkts berücksichtigt werden sollten. Was in wissenschaftlichen Arbeiten nicht diskutiert wird, ist die Tatsache, dass die flüssige Form der Produkte eine leichtere und schnellere Zubereitung der Arbeitsflüssigkeit für die Anwendung ermöglicht. Außerdem muss keine Aufschlammung vorbereitet werden, wie dies bei frei fließenden Formulierungen der Fall ist. Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht darin, dass flüssige Formulierungen eine bessere Mischbarkeit mit anderen Agrochemikalien aufweisen, wodurch die Gefahr des Verstopfens der Düsen beim Spritzen verringert wird. Aus praktischer Sicht erhöhen die geringere Gefahr des Verstopfens von Düsen und die Möglichkeit, sie mit anderen Formulierungen zu mischen, die Flexibilität und die Anwendungseffizienz. Es sei darauf hingewiesen, dass Flüssigformulierungen anfälliger für Lagerungsbedingungen sein können, die den Abbau oder die Oxidation von Formulierungsbestandteilen beeinflussen können.

Die Verpackungen sind in der Regel größer, und die Konzentration der Mikroorganismen in Lösung ist geringer als bei Bulk-Formulierungen. Die hohe Konzentration von Mikroorganismen in frei fließenden Produkten ermöglicht die Verwendung kleinerer Verpackungen, wodurch sie leichter und einfacher zu transportieren und zu lagern sind. Allerdings ist die Ausbringung dieser Produkte potenziell schwieriger. Die Notwendigkeit, das Pulver gleichmäßig in der Arbeitsflüssigkeit zu verteilen, und das Risiko, dass unlösliche Fraktionen während der Anwendung ausfallen, erfordern einen größeren Aufwand bei der Herstellung der Lösung. Erwähnenswert ist, dass frei fließende Formulierungen eine höhere Stabilität über einen längeren Zeitraum aufweisen und somit länger haltbar sind.

Alle Arten von Formulierungen, die Mikroorganismen enthalten und für das Inverkehrbringen bestimmt sind, müssen auf ihre Stabilität über die Zeit, die Temperatur und die Verträglichkeit mit anderen Agrochemikalien getestet werden, wenn eine kombinierte Verwendung empfohlen wird. Aus industrieller Sicht kann das Einbringen mehrerer verschiedener Arten von Agrochemikalien in eine einzige Tankmischung, die zuvor nicht für die kombinierte Verwendung getestet wurde, zu nachteiligen Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und den in den verschiedenen Arten von Formulierungen enthaltenen Wirkstoffen führen, was einen Verlust der biologischen Wirksamkeit einer solchen Tankmischung zur Folge haben kann. Die für die Prüfung mit der zu prüfenden mikrobiellen Formulierung hergestellte Reservoiremischung sollte ebenfalls mindestens vier Stunden lang stabil sein. Bei Mischbarkeitstests werden die Abundanz und das Überleben von Mikroorganismen in Intervallen bestimmt.

Bei unserer Arbeit haben wir versucht, bei der Entwicklung eines neuen Produkts eine strenge Qualitätskontrolle hinsichtlich der Formulierung und der Prüfung der Wirksamkeit bei einer bestimmten Pflanzenart sowie der Auswirkungen auf die Umwelt und der möglichen Phytotoxizität bei überhöhten Dosen durchzuführen. Dementsprechend ist es unsere Absicht, neue formulierte Produkte zu entwickeln, die nach der Lagerung mindestens 12 Monate lang stabil und geeignet sein sollten.

## 2. Technologie zur Herstellung mikrobieller Produkte

In der heutigen dynamischen Welt ist die Technologie zur Herstellung mikrobieller Produkte eine faszinierende Branche, die viele Bereiche revolutioniert, von der Landwirtschaft über die Medizin bis hin zum Umweltschutz. Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze sind Gegenstand intensiver Forschung und eine Quelle für innovative Lösungen und moderne Produkte.

Die mikrobielle Technologie basiert auf der Verwendung von Mikroorganismen zur Herstellung einer Vielzahl von Substanzen, von Enzymen und Antibiotika bis hin zu speziellen landwirtschaftlichen Präparaten (Kuila und Sharma 2018). Es besteht eine enge Wechselwirkung zwischen Biowissenschaft, Chemie, Verfahrenstechnik und den praktischen Aspekten der industriellen Produktion. Mikroorganismen spielen in dieser Technologie eine Schlüsselrolle, denn sie fungieren als biologische Fabriken, die verschiedene chemische Verbindungen synthetisieren können. Mikroorganismen werden so angepasst, dass sie durch Fermentation oder genetische Veränderung die gewünschten Stoffe produzieren, wodurch neue industrielle und landwirtschaftliche Produktionsmöglichkeiten entstehen. Die Technologie zur Herstellung mikrobieller Produkte ist in vielen Bereichen anwendbar. In der Landwirtschaft produzieren Mikroorganismen Stoffwechselprodukte, die die Ernteerträge, die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen und die Bodenstruktur verbessern. In der Medizin sind sie eine Quelle für Antibiotika und biotechnologische Arzneimittel. In der Lebensmittelindustrie stellen sie fermentierte Produkte her. Im Umweltschutz werden sie zur Behandlung von Abwässern und Böden eingesetzt.

Trotz vieler Vorteile bringt die Technologie auch Herausforderungen mit sich. Die Einführung innovativer Lösungen, das Management komplexer Prozesse und die Aufrechterhaltung nachhaltiger Praktiken sind einige der Themen, die unsere Aufmerksamkeit erfordern. Die Entwicklung moderner Techniken der mikrobiellen Gentechnik eröffnet gleichzeitig neue Perspektiven und wirft ethische und regulatorische Fragen auf.

## 2.1. Auswahl und Isolierung von Mikroorganismen

Mikroben haben Umgebungen besiedelt, in denen sie eine Chance zum Überleben haben, was zu einem breiten Spektrum von Orten führt, von solchen, in denen optimale Bedingungen für die meisten Bakterien herrschen, bis zu extremen Orten, an denen hochspezialisierte Bakterien leben. Mikroorganismen spielen eine große Rolle in der Umwelt. Sie sind für den Kreislauf der biogenen Elemente in der Biosphäre (Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor) verantwortlich und verteilen einen großen Teil der biogenen Elemente in den lebenden Organismen. Molekularer Stickstoff ist ein wichtiger Bestandteil der Luft, der jedoch für höhere Organismen unzugänglich ist. Dank der Aktivität von Mikroorganismen wird er aus pflanzenverfügbaren Verbindungen umgewandelt. Die Zahl der Bakterienarten in einem Gramm Boden schwankt zwischen einigen hundert und mehr als elftausend (Elander und Chang 1979). Die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft hängt von mehreren physikalisch-chemischen Faktoren ab sowie von der Art des Bodens und den Pflanzenarten, die den Boden bewohnen, der landwirtschaftlichen Praxis, der geografischen Zone, dem Nährstoffgehalt, dem Salzgehalt und der Umweltverschmutzung. Sie wirken sich auf die Verwitterung von Mineralien aus und tragen so zu Veränderungen der bodenbildenden Prozesse bei (Bednarski und Fiedurek 2012). Darüber hinaus zersetzen und mineralisieren sie organische Stoffe. Indem sie Huminstoffe erneuern, formen und verbessern sie die Bodenstruktur. Sie verhindern Erosion und schützen den Boden vor Austrocknung. Sie erleichtern die Bodenсанierung, indem sie an der Zersetzung von Pestiziden, Kohlenwasserstoffen und Antibiotika mitwirken.

Die Auswahl von Mikroorganismen für landwirtschaftliche Produkte wie Düngemittel, Biostimulanzien und Pflanzenschutzmittel ist ein Prozess, der darauf abzielt, Stämme von Mikroorganismen mit nützlichen Eigenschaften auszuwählen. Der erste Schritt besteht darin, die Ziele zu definieren, die der Mikroorganismus

erfüllen soll. Dazu kann zum Beispiel die Fähigkeit gehören, Stickstoff zu fixieren, Stoffe zu produzieren, die das Pflanzenwachstum fördern, oder die Fähigkeit, Krankheitserreger zu unterdrücken.

Die Auswahl der nützlichen Mikroorganismen erfolgt in folgenden Schritten:

- Primärselektion und Isolierung einer Reinkultur,
- Sekundärauswahl.

Die primäre Isolierung von Mikroorganismen aus bestimmten Umgebungen beinhaltet die Auswahl von Mikroorganismen, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Nach der Isolierung der Mikroorganismen folgt ihre gründliche Charakterisierung. Ihre physiologischen, biochemischen und genetischen Eigenschaften werden untersucht. So lässt sich feststellen, ob die Mikroorganismen die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Die Sekundärselektion umfasst Isolate mit der höchsten Ausprägung der gewählten Eigenschaft (Steele und Stowers 1991).



Abb. 4.1. Kolonien von Bakterienisolaten, die auf Trypticase-Soja-Agar (TSA)-Medium gezüchtet wurden, was die mikrobielle Vielfalt bei der Isolierung und Auswahl pflanzenfreundlicher Mikroorganismen bestätigt.

Quelle: Intermag sp. z o.o.

Screening-Tests der spezifischen Aktivität spielen eine wichtige Rolle bei der Auswahl spezifischer Mikroorganismen. Labortests zur Bestätigung der Eigenschaften von Mikroorganismen umfassen eine Vielzahl von Methoden und Techniken, die eine gründliche Analyse ihrer Morphologie, Physiologie, Genetik und anderer charakteristischer Merkmale ermöglichen.



Abb. 4.2. Ein Beispiel für die selektive Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Bacillus* auf festen Medien. Linkes Bild - chromogenes Medium zur Differenzierung von säurebildenden Mikroorganismen. Rechtes Bild - Mannitol-Salz-Agar-Medium zur Diversifizierung der Kohlenhydratquelle für gram-positive Bakterien.

Quelle: Intermag sp. z o.o.

Die grundlegende Auswahltechnik ist die Methode der Anreicherung des Mediums. Dabei wird ein geeignetes Milieu geschaffen, das für das Wachstum bestimmter Mikroorganismen geeignet ist und gleichzeitig hemmend oder tödlich für Nichtzielorganismen wirkt. Anaerobe Mikroorganismen zum Beispiel überleben nicht in Gegenwart von Sauerstoff. Die Resistenz gegen Schwermetalle, Antibiotika, Oxidationsmittel und organische Lösungsmittel kann auch auf selektive Umgebungen für Mikroorganismen mit spezifischen Eigenschaften angewendet werden.

Bedeutende Fortschritte bei der Entwicklung von Analyseinstrumenten haben einen erheblichen Einfluss auf die Fähigkeit, nach bestimmten Verbindungen zu suchen. Die instrumentelle Analyse ist sowohl beim sekundären als auch beim primären Screening nützlich, wenn einfachere Techniken nicht verfügbar sind. Instrumente wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC), Massenspektrometrie (MS), Kernspinresonanzspektrometrie (NMR) und andere ermöglichen einen schnelleren, selektiven und hochempfindlichen Nachweis von Stoffwechselprodukten. Von zunehmender Bedeutung ist der Einsatz von molekularbiologischen und bioinformatischen Werkzeugen zur schnellen Überprüfung des genetischen Potenzials von Mikroorganismen. Welche Tests im Einzelnen durchgeführt werden, hängt von der Art des Mikroorganismus und dem Zweck der Untersuchung ab (Olicón-Hernández et al. 2022).

Mikroorganismen, die sich unter Laborbedingungen bewährt haben, werden unter Feldbedingungen getestet. So lässt sich ihre Wirksamkeit unter realistischen landwirtschaftlichen Bedingungen beurteilen. Die besten Mikroorganismen werden auf der Grundlage der Testergebnisse für die weitere Züchtung ausgewählt. Dieser Prozess umfasst die Auswahl von Genotypen mit erwünschten Eigenschaften und deren Massenvermehrung unter kontrollierten Bedingungen.

## 2.2. Stammsammlung

Sobald der Mikroorganismus identifiziert und charakterisiert ist, sollte er unter Bedingungen gelagert werden, die seine physiologische, biotechnologische und genetische Stabilität gewährleisten. Dieser Prozess wird als Banking bezeichnet und umfasst die Aufbewahrung der isolierten ausgewählten Stämme für weitere Experimente und ihre Charakterisierung.

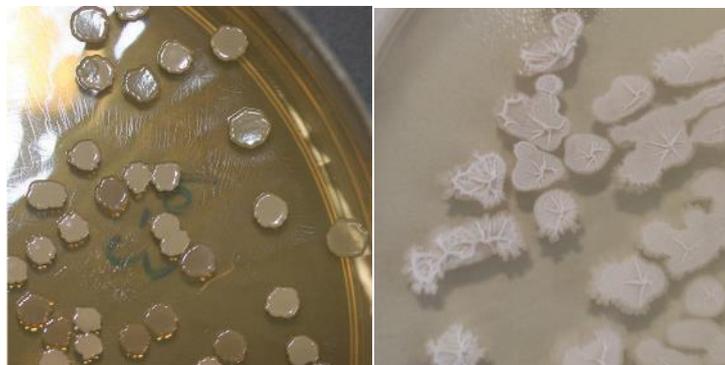


Abb. 4.3. Reine Bakterienkulturen, isoliert aus Umgebungen. Linkes Bild *Bacillus pumilus*, rechtes Bild *Bacillus subtilis*.  
Quelle: Intermag sp. z o.o.

Ausgewählte Isolate werden in unseren eigenen Beständen und/oder in externen Einrichtungen gelagert - Stammsammlungen von Mikroorganismen. Mikroorganismenbanken sind ein wichtiges Instrument in Wissenschaft, Medizin, Industrie und Landwirtschaft. Neue Arten oder Stämme mit bisher unbekanntem Merkmalen, die in wissenschaftlichen Veröffentlichungen beschrieben werden, sollten allen Interessierten zugänglich sein. Aus Sicherheitsgründen sollten die Isolate auf verschiedene Arten gelagert werden. Mikroorganismen werden in der Sammlung in gefriergetrocknetem Zustand, tiefgefroren bei  $-80\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff bei Temperaturen bis zu  $-195\text{ °C}$  oder in speziellen Behältern mit einem Konservierungsmittel gelagert (Stackebrandt et al. 2014).



*Abb. 4.4. Behältersysteme für die Lagerung von Mikroorganismen bei niedrigen Temperaturen*

Jede Kultur wird sorgfältig dokumentiert und enthält Informationen über die Art, den Stamm, die Kulturbedingungen, die physiologischen Eigenschaften und andere wichtige Daten. Das Microbial Banking spielt eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der biologischen Ressourcen, trägt zum wissenschaftlichen und technologischen Fortschritt bei und gewährleistet die Kontinuität und Reproduzierbarkeit der Herstellung von Präparaten auf der Basis aktiver Mikroorganismen.

### 2.3 Inokulum

Ein mikrobielles Inokulum ist eine Bezeichnung für eine mikrobielle Kultur, die unter bestimmten Bedingungen angebaut wird und zur Einführung eines groß angelegten Kultivierungsprozesses genutzt wird. Im Zusammenhang mit der mikrobiellen Formulierungstechnologie für die Landwirtschaft spielt das Inokulum eine Schlüsselrolle als Quelle von Mikroorganismen, die nach einem Fermentationsprozess in Formulierungen eingebracht werden, die auf Boden und Pflanzen wirken. Es dient als Ausgangspunkt, um die notwendige Anzahl aktiver und gesunder Mikroorganismen bereitzustellen, die sich positiv auf die agrotechnische Umwelt auswirken. Der Prozess der Herstellung des mikrobiellen Inokulums besteht aus sorgfältig kontrollierten Schritten. Er beginnt mit der Sammlung eines aktiven Stammes von Mikroorganismen, der dann in kleinerem Maßstab kultiviert wird, um ein Inokulum zu bilden. Dabei wird auf die richtigen Kulturbedingungen geachtet, wie z. B. die Zusammensetzung des Mediums, die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit, um die Fähigkeit der Mikroorganismen zur effektiven Vermehrung sicherzustellen. Die Qualität des Inokulums ist ein Schlüsselfaktor für die Wirksamkeit der mikrobiellen Zubereitungen. Die Mikroorganismen im Inokulum müssen aktiv sein, mit Krankheitserregern im Boden konkurrieren, die Nährstoffverfügbarkeit verbessern und ein gesundes Pflanzenwachstum fördern. Die Erzeuger achten auf die Kontrolle der Kulturparameter durch Überwachung der mikrobiologischen und genetischen Qualität. Die Wirksamkeit des mikrobiellen Inokulums in der Landwirtschaft hängt hauptsächlich von seiner Fähigkeit ab,

sich an die Bodenbedingungen anzupassen. Die Erzeuger müssen den Prozess der Anzucht von Mikroorganismen so anpassen, dass sie sich an die spezifischen Umweltbedingungen, unter denen sie eingesetzt werden, gewöhnen. Diese Anpassung ermöglicht es den Mikroorganismen, den Boden besser zu besiedeln und die Pflanzen positiv zu beeinflussen.

Sobald das optimale Inokulum in kleinerem Maßstab erreicht ist, wird das Verfahren auf größere Mengen skaliert. In Bioreaktoren und Fermentern werden Mikroorganismen unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet, um große Mengen aktiver Mikroorganismen für die Verwendung in landwirtschaftlichen Formulierungen zu produzieren.

Die letztendliche Wirksamkeit von mikrobiellen Präparaten in der Landwirtschaft hängt direkt mit der Qualität des Inokulums zusammen. Ein ordnungsgemäß aufbereitetes Inokulum stellt sicher, dass eine angemessene Anzahl aktiver Mikroorganismen auf das Feld gebracht wird, was sich in einer verstärkten Biostimulation der Pflanzen, einer Verringerung von Bodenpathogenen und einer verbesserten allgemeinen Bodengesundheit niederschlägt. Die Überwachung des Herstellungsprozesses des Inokulums und seiner mikrobiellen Zusammensetzung ist der Schlüssel zur Aufrechterhaltung hoher Qualitäts- und Effizienzstandards in der Produktionstechnologie von mikrobiellen Präparaten für die Landwirtschaft.

## 2.4. Medien

Nährmedien sind ein grundlegendes Element in der Technologie der mikrobiellen Präparate für die Landwirtschaft. Es handelt sich um speziell zusammengesetzte Nährstoffe, die den Mikroorganismen die richtigen Bestandteile für ihr Wachstum und ihre Aktivierung liefern sollen. Ein Wachstumsmedium oder Kulturmedium ist eine feste, flüssige oder halbfeste Kombination von Stoffen, die das Wachstum von Mikroorganismen fördern soll. Bei der Herstellung von mikrobiellen Formulierungen ist ein angemessen ausgewähltes Wachstumsmedium entscheidend für die Qualität und Produktivität der Mikroorganismen, die in das landwirtschaftliche Umfeld eingebracht werden. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Medien ist auf die Anforderungen der einzelnen zu kultivierenden Mikroorganismen zugeschnitten. Sie enthalten in der Regel Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor-, Makro- und Mikronährstoffquellen sowie andere Nährstoffe. Je nach Art der Mikroorganismen können die Nährlösungen so angepasst werden, dass ihr Wachstum und ihre Aktivität maximiert werden. Die optimale Zusammensetzung der Nährlösung ist entscheidend für die Gewinnung großer Mengen aktiver Mikrobenkulturen. In einigen Fällen könnte es wirtschaftlich attraktiv sein, agroindustrielle Abfälle als Produktionsmedium zu verwenden (Vassilev et al. 1998).



*Abb. 4.5. Im Labor üblicherweise verwendete mikrobiologische Medien.  
Quelle: Intermag sp. z o.o.*

Mikrobiologische Medien spielen eine Schlüsselrolle bei der Anzucht von Mikroorganismen in größerem Maßstab. Die Hersteller von mikrobiologischen Präparaten stimmen die Medien sorgfältig auf die Besonderheiten der kultivierten Stämme ab, was ein schnelles und gesundes Wachstum der Mikroorganismen ermöglicht. Sie bieten Nährstoffe, Stabilität und einheitliche Kulturbedingungen, was für die Gewinnung wirksamer Präparate wichtig ist. Die Zusammensetzung der Nährmedien beeinflusst die Eigenschaften der Mikroorganismen, die bei der Herstellung mikrobiologischer Zubereitungen kultiviert werden. Richtig eingestellte Nährböden können die Produktion von Metaboliten, die enzymatische Aktivität oder die Fähigkeit, mit Krankheitserregern zu konkurrieren, beeinflussen. Eine sorgfältige Kontrolle der Zusammensetzung von Nährlösungen ermöglicht es, Mikroorganismen für bestimmte landwirtschaftliche Anwendungen maßzuschneidern und so die Wirksamkeit der Formulierungen zu erhöhen.

Die Herstellung mikrobieller Medien erfordert sorgfältiges Mischen und eine kontrollierte Zufuhr von Nährstoffen. In dieser Phase müssen die Hersteller darauf achten, dass die Inhaltsstoffe im richtigen Verhältnis zueinander stehen, um die Anforderungen der zu kultivierenden Mikroorganismen zu erfüllen. Die Kontrolle von Parametern wie pH-Wert, Temperatur und Nährstoffkonzentration ist entscheidend für das Erreichen optimaler Kulturbedingungen.

Die Endqualität mikrobieller Zubereitungen in der Landwirtschaft hängt eng mit der Qualität der verwendeten mikrobiellen Medien zusammen. Die effektive Zusammensetzung des Mediums wirkt sich positiv auf die Vermehrung, Aktivität und Lebensfähigkeit der Mikroorganismen aus, was sich in der Wirksamkeit der Formulierung auswirkt. Die Hersteller kontrollieren dieses Element des Prozesses genau, um sicherzustellen, dass das Medium die erwarteten Eigenschaften der Mikroorganismen unterstützt und die Konsistenz des Endprodukts gewährleistet. Die genaue Abstimmung des Mediums auf die Bedürfnisse der kultivierten Mikroorganismen ist eine wesentliche Voraussetzung für optimale Ergebnisse in diesem Bereich.

## **2.5. Schlüsselkomponenten der Produktionslinie**

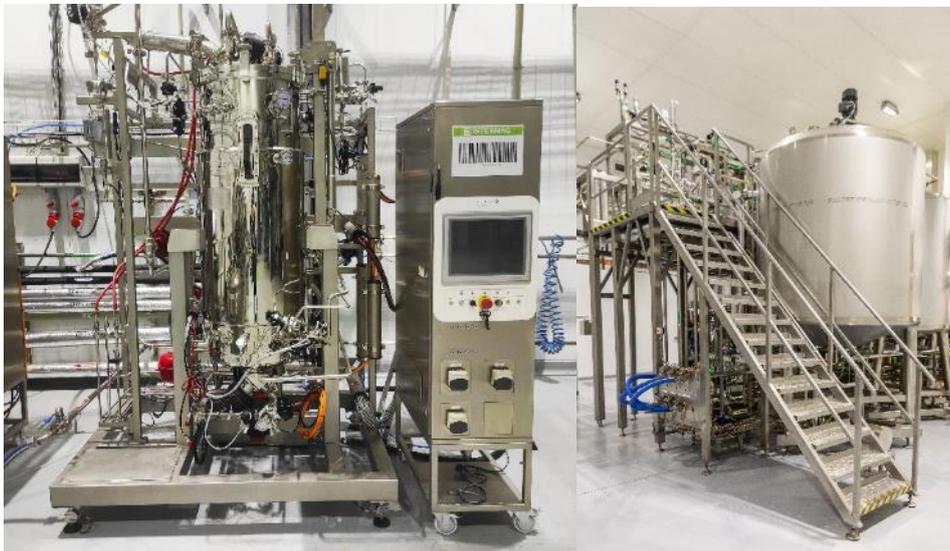
Das Schlüsselement einer jeden biotechnologischen Anlage ist der Bioreaktor, um den herum die gesamte Anlage zur Herstellung des Endprodukts aufgebaut ist. Je nach Bedarf kann dies Mischer, Zentrifugen, Filtersysteme, Trockner, Gefriertrockner, Klärbecken und Dekanter umfassen.

Bei den meisten biotechnologischen Verfahren, bei denen Mikroorganismen eingesetzt werden, geht es darum, sie aus ihrem natürlichen Lebensraum über eine Petrischale in Bioreaktoren, auch Fermenter genannt, zu bringen. Bioreaktoren und ihre Prozesse sind in der Regel das Herzstück jeder Biotechnologie. In ihnen findet das Wachstum des Mikroorganismus und die Herstellung oder Verarbeitung des gewünschten Produkts statt. Rein technisch gesehen ist ein Bioreaktor ein: "Ein geschlossener Raum beliebiger Größe und Form, in dem die Möglichkeit eines Impuls-, Wärme- und Massenaustauschs mit der Umgebung sowie die Möglichkeit einer chemischen Reaktion besteht. Der Bioreaktor sollte jeden Biokatalysator enthalten, für den solche Betriebsbedingungen geschaffen werden, um die gewünschte Wirkung in Form eines vorbestimmten Ablaufs einer biochemischen Reaktion oder eines Wachstums von Zellen eines lebenden Organismus zu erzielen." (Olicón-Hernández et al. 2022).

Wie bereits erwähnt, ist die Definition eines Bioreaktors sehr allgemein gehalten, so dass Bioreaktoren auf der Grundlage verschiedener Strukturelemente, Funktionsweisen oder Biokatalysatoren zahlreichen Klassifizierungen unterworfen sind. Die allgemeinste Unterteilung bezieht sich auf die Art und Weise, in der der Prozess durchgeführt wird:

- Bioreaktoren für die submerse Kultur,
- Bioreaktoren für die Kultur auf festen Medien,
- Bioreaktoren für die Kultur mit einem immobilisierten Biokatalysator.

Die Art des für das Verfahren verwendeten Bioreaktors hängt hauptsächlich von den Wachstumsanforderungen des Mikroorganismus ab. Die am häufigsten verwendeten Fermenter sind die für aerobe submerse Prozesse. Bei dieser Art von Fermentern befindet sich das Medium in flüssigem Zustand und der Biokatalysator ist darin suspendiert.



*Abb. 4.6. Bioreaktoren für die Herstellung von mikrobiellen Produkten bei INTERMAG.  
Quelle: Intermag sp. z o.o.*

Wie bereits erwähnt, ist der Bioreaktor ein wesentlicher Bestandteil der meisten biotechnologischen Produktionsverfahren, und jede nachfolgende Komponente wird entsprechend dem Betrieb eines bestimmten Bioreaktors oder seiner Baugruppen ausgewählt. Eine derartige Einrichtung kann Mischer zur Vermischung von Biomasse und Formulierungsbestandteilen, Filtrationsmembranen oder Zentrifugen zur Trennung der Biomasse von der Kulturflüssigkeit, Trockner oder Gefriertrockner zur Herstellung eines Massenprodukts, Homogenisatoren zur Freisetzung des Bioprodukts aus den Zellen und zahlreiche andere Geräte umfassen, die oft speziell für die Produktion eines bestimmten Produkts konzipiert und gebaut werden.

## 2.6. Technologie zur Herstellung von Biopräparaten

Ein Stoffwechselprodukt, ein Nachverdauungsmedium, ein Mikroorganismus in verschiedenen Formen oder eine Mischung aus diesen dreien sind alle Beispiele für Biopräparationen. Theoretisch ist es am einfachsten, eine Post-Digestion-Mischung zu erhalten, die sowohl den Mikroorganismus als auch das Post-Digestion-

Medium mit allen Metaboliten enthält. Eine solche Produktion basiert auf der Vermehrung des Mikroorganismus in Batch-Kultur, d. h. Zubereitung des Mediums, Inokulation, Kultur und Sammlung der erzeugten Biomasse. In der Praxis ergeben sich hier mehrere Probleme im Zusammenhang mit der Lebensfähigkeit des Mikroorganismus im Endprodukt, der Stabilität der Sekundärmetaboliten, die die Eigenschaften des Produkts ausmachen, der Lagerung der Biomasse selbst sowie des Produkts und vor allem der geeigneten Verpackung, um das Risiko einer Kontamination mit unerwünschter Mikroflora auszuschließen, für die die Biomasse selbst als Medium dienen kann.

Um die Eigenschaften des Bioprodukts möglichst lange zu erhalten, wird eine reduzierte Lagertemperatur verwendet, was bei Produkten auf Basis von Bakterien wie *Rhizobium* spp. oder *Azotobacter* spp. gut funktioniert. Produkte mit sporenbildenden Bakterien, z.B. *Bacillus* spp., zeichnen sich gerade wegen der Stabilität der Sporenformen durch eine längere Haltbarkeit aus.

Feste Formulierungen erfordern eine weitere Verarbeitung der Biomasse nach der Kultivierung, d. h. eine geeignete Verdichtung und die Zugabe von Schutz- und Trägersubstanzen. Die gebräuchlichsten Methoden zur Herstellung von Trockenformulierungen sind die Sprüh- und Gefriertrocknung. Beide Verfahren zielen darauf ab, der Biomasse das Wasser zu entziehen, aber sie tun dies auf unterschiedliche Weise.

Die Gefriertrocknung, auch bekannt als Sublimationstrocknung, ist ein Prozess, der bei niedrigen Temperaturen und unter Vakuum stattfindet. Bei der Vorbereitung des Mikroorganismus für das Gefriertrocknungsverfahren wird die Biomasse so weit wie möglich konzentriert, d. h. zunächst durch Filtration oder Zentrifugation von Wasser befreit. Die konzentrierte Biomasse wird dann mit einem Kälteschutzmittel gemischt, d. h. einer Substanz, die die Zellen des Mikroorganismus davor schützen soll, während des ersten Gefriertrocknungsschritts, d. h. dem Einfrieren auf bis zu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durch Eiskristalle zerbrochen zu werden. Beliebte Schutzmittel sind Maltodextrin, Saccharose, Magermilchpulver, Trehalose und Glycerin. Der größte Vorteil der Gefriertrocknung liegt in der hohen Konzentration des Produkts, wodurch dem Produkt fast vollständig das Wasser entzogen und seine Haltbarkeit verlängert wird. Es handelt sich jedoch um ein kostspieliges Verfahren, was sich letztlich im höheren Preis des Handelsprodukts niederschlägt.



Abb. 4.8. Die Produktions-Gefriertrocknungsanlage bei INTERMAG.

*Quelle: Intermag sp. z o.o.*

Die Sprühtrocknung ist ein Hochtemperaturverfahren, bei dem die Biomasse in heißer Luft pulverisiert wird. Die Vorbereitung der Biomasse besteht wie bei der Gefriertrocknung darin, sie zu verdichten, um die größtmögliche Menge an Trockensubstanz zu erhalten, die im Trockner die entsprechenden Körner des Endprodukts ergibt. Bei der Sprühtrocknung werden Mikroorganismen eingesetzt, die hohen Temperaturen ausgesetzt sind (hauptsächlich sporenbildende Bakterien, z. B. *Bacillus* spp.), oder es werden geeignete stabilisierende Stoffe verwendet, z. B. Molkenprotein, Maltodextrin, Stärke, Polysaccharide.

Für Produkte, die auf einem bestimmten Metaboliten basieren, wie z. B. NOD-Faktoren oder spezifische Enzyme, muss die Kultur von Mikroorganismen unter Bedingungen erfolgen, die den Stoffwechsel der Mikrobe für die Produktion steuern. Dies kann durch Änderung der physikalischen Bedingungen der Kultur oder der geeigneten Zusammensetzung des Kulturmediums erreicht werden.



*Abb. 4.7. Produktionslinie für mikrobielle Produkte bei INTERMAG.*

*Quelle: Intermag sp. z o.o.*

## 2.7. Überwachung und Kontrolle von Variablen, die das mikrobielle Wachstum und die Qualitätskontrolle beeinflussen

Die Überwachung der Kultur von Mikroorganismen ist ein wichtiger Prozess in Labors, in der biotechnologischen Industrie, in der pharmazeutischen Produktion und in der wissenschaftlichen Forschung. Dazu gehören die Kontrolle der Kulturbedingungen, die Bewertung des mikrobiellen Wachstums, die Verfolgung der Metabolitenproduktion und die Aufrechterhaltung der Reinheit und Qualität der Kultur. Die Überwachung von mikrobiellen Kulturen ist in Forschung und Industrie unerlässlich, um die Prozesskontrolle zu gewährleisten, die Leistung zu optimieren und konsistente Ergebnisse zu erzielen. Im Bereich der industriellen Biotechnologie ist die mikrobielle Kultur ein grundlegender Schritt bei der Herstellung einer Vielzahl von Substanzen, von Arzneimitteln bis hin zu landwirtschaftlichen Produkten. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, müssen die Variablen, die die Mikroorganismen beeinflussen, genau überwacht werden. Dieser Prozess umfasst die Kontrolle der Umweltparameter, der Kulturdichte (Zellzahlen), der Metaboliten Produktion und der Reinheit der Kultur.

Ein bekanntes Schema für das Wachstum von Mikroorganismen in stationärer Kultur ist die sogenannte Batch-Kultur. Die Wachstumskurve eines Mikroorganismus wie auch die Produktion eines biotechnologischen Produkts weist vier charakteristische Phasen auf:

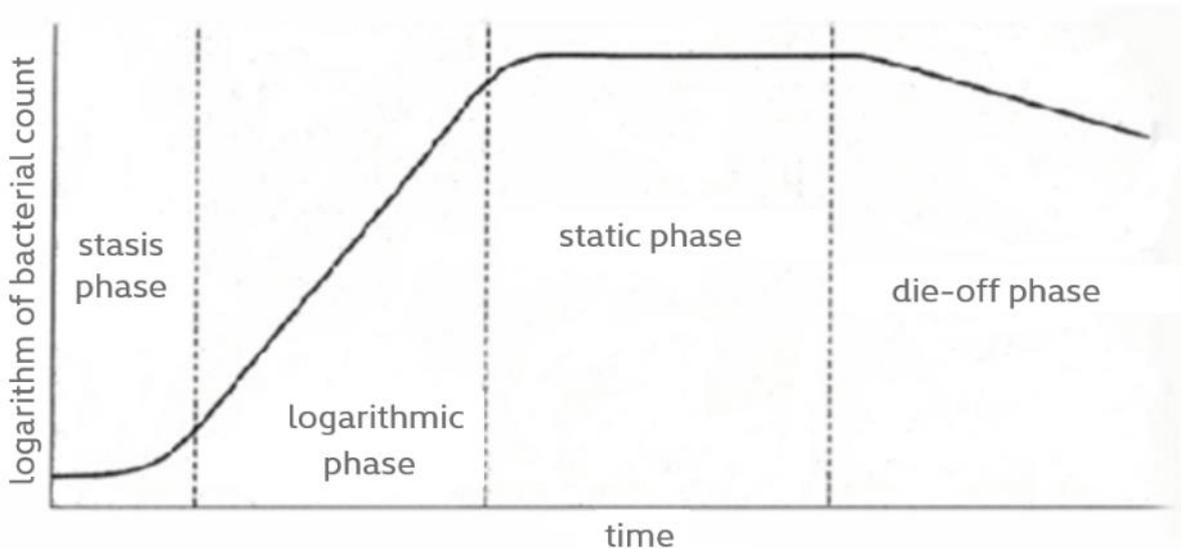


Abb. 4.9. Wachstumskurve einer Batch-Kultur.  
Quelle: Schlegel 2004

1. Stase oder Vorstase oder der Zeitraum, in dem sich der Mikroorganismus an die neue Kulturumgebung anpasst und sein Wachstum beginnt;
2. Die logarithmische Phase oder schnelle Wachstumsphase hängt von der Verfügbarkeit von Nährstoffen und der Anhäufung von Metaboliten ab, die das Wachstum der Kultur begrenzen, wie es bei der alkoholischen Gärung der Fall ist;
3. Die stationäre Phase, auch Lag-Phase oder Anzahl der Zellteilungen genannt, ist gleich der Anzahl der absterbenden Zellen;
4. Die Absterbephase beginnt, wenn die Zellen schnell absterben.

Dieses Diagramm ist wichtig für die Überwachung des Produktionsprozesses, da es notwendig ist, die relevanten Momente des Produktionsprozesses auf der obigen Kurve richtig einzuordnen. Eine geschickte Prozesssteuerung, die auf der Kenntnis des Zustands der Kultur und der Anforderungen der Mikroorganismen in den verschiedenen Wachstumsphasen beruht, ermöglicht eine effiziente Steuerung des Prozesses und eine hohe Produktionseffizienz. Die Prozesssteuerung und die Kulturen werden durch physikalische und chemische Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration beeinflusst.

Die Temperatur hat einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität und den mikrobiellen Stoffwechsel. Die Temperaturregelung in Bioreaktorkulturen erfolgt durch Erhitzen und Kühlen des Wassermantels des Bioreaktors (meist in großen industriellen Fermentern verwendet) oder durch Wärmetauscher, die sich im Kulturgefäß befinden (beliebt in kleinen Laborreaktoren). Die Temperaturregelung in Bioreaktoren ist mehrstufig und umfasst die Regelung der Temperatur des Kulturgefäßes, der Temperatur des Heizmantels oder des Wärmetauschers sowie des Heiz- und Kühlmediums.

Der richtige pH-Wert ist für die richtige Proteinstruktur und die Funktion der Enzyme unerlässlich. Jeder Mikroorganismus hat einen bestimmten pH-Toleranzbereich der Lösung, in dem er überleben kann, und einen bestimmten engen optimalen Bereich, in dem er am effizientesten wachsen kann. Der pH-Wert wird anhand der Messwerte der im Bioreaktor angebrachten pH-Elektroden kontrolliert.

Für aerobe Mikroorganismen ist ein angemessener Sauerstoffgehalt entscheidend, während Anaerobier ein sauerstoffarmes Milieu benötigen. Die Gasverteilung ist der kritischste Punkt bei der Kultivierung von aeroben Mikroorganismen wie *Bacillus* spp. Die Form des Reaktors, das verwendete Rührwerk und dessen Leistung, die Form der Belüftungsvorrichtung und ihre Position im Kulturgefäß sind wichtige Faktoren für die Gasverteilung. Die Kontrolle der relativen Sättigung des Mediums mit Sauerstoff erfolgt mit Hilfe von Sauerstoffelektroden. Bei anaeroben Organismen sollte der Sauerstoff aus dem Medium entfernt werden, indem es mit einem Inertgas wie Stickstoff gesättigt wird, da er für viele Organismen, wie z. B. Methanbakterien, schädlich ist. In Bioreaktoren mit mechanischem Rührer erfordert die Aufrechterhaltung der gewünschten Sauerstoffversorgung der Kultur eine Intensivierung des Rührens während der Phase des erhöhten Sauerstoffbedarfs, was zu hohen Scherkräften im Rührer führen kann.

Zusätzlich zu den physikalisch-chemischen Variablen des Bioreaktors ist es sehr wichtig, das Wachstum der Mikroorganismen und die Qualität des Mediums während der Kultur zu kontrollieren. Je nach Zielprodukt wird die Verwertung von Substratbestandteilen durch den Mikroorganismus, z. B. Glukose, mit Streifenfesttests gemessen, oder in fortschrittlicheren Systemen mit Nahinfrarotspektroskopie das Wachstum eines Metaboliten über die Zeit, z. B. die Antibiotikaproduktion durch *Streptomyces*. Andererseits kann man das Wachstum von Mikroaggregaten an sich kontrollieren, indem man die Bakterien *in situ* mit OD 600-Sonden für die optische Dichte zählt oder mit anspruchsvolleren Lösungen zytometrische und elektrische Kapazitätsmessungen der Kultur durchführt, die mit der Anzahl der lebensfähigen Zellen in der Lösung korrelieren.

## 2.8. Hygienische Überlegungen für die gesamte Linie

Im Idealfall sollte die gesamte biotechnologische Produktion unter sterilen Bedingungen stattfinden, von der Beimpfung des ersten Kolbens bis zur Herstellung des Endprodukts. Die Gewährleistung der Sterilität der Kulturen ist der wichtigste und ressourcenintensivste Prozess in der industriellen Mikrobiologie, da er bereits bei der Planung der Räumlichkeiten und Produktionslinien sowie der Zielprodukte beginnt. Die grundlegende Qualitätsnorm für Produktionslinien in der Biotechnologie sind die von der US-amerikanischen FDA und 3A aufgestellten Anforderungen, die eine Reihe von Vorgaben enthalten, wie z. B. perfekt glatte, elektropolierte Schweißflächen, die mit dem Produkt in Kontakt kommen. Dieses Verfahren wirkt sich auf die weitere Nutzung der Anlage aus, da eine feine Rauheit Biofilme einschließen kann, was zu einer Kontaminationsporosität des Materials führt, die eine Entgasung des Behälters während der Sterilisation verhindern kann, was zu einer Nicht-Sterilität des Bioreaktors oder anderer Behälter führt. Der nächste Schritt besteht in der Auswahl geeigneter Materialien für die vorgesehene Produktion, d. h. Materialien, die hohen Temperaturen bei der Dampfsterilisation und aggressiven Reinigungschemikalien bei Reinigungs- und Desinfektionsprozessen standhalten.

## 3. Biologische Wirksamkeit und Kommerzialisierung

### 3.1. Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Laborbedingungen

Die Überprüfung der biologischen Wirksamkeit von mikrobiellen Formulierungen ist ein wichtiger Schritt im Prozess ihrer Entwicklung und Bewertung. Sie umfasst eine Reihe von Labortests, um zu bestätigen, dass die Mikroorganismen in den Formulierungen die erwartete biologische und physikochemische Aktivität aufweisen. In diesem Zusammenhang kann die Wirksamkeit die Fähigkeit umfassen, Phosphor zu

solubilisieren, Stickstoff zu assimilieren, Krankheitserreger zu bekämpfen, die Pflanzengesundheit zu verbessern oder die mikrobielle Struktur des Bodens zu beeinflussen.

Zur Bewertung der biologischen Wirksamkeit von mikrobiellen Zubereitungen werden verschiedene Labormethoden eingesetzt. Dabei kann es sich um In-vitro-Tests, mikroskopische Analysen, molekularbiologische Techniken oder Untersuchungen zur Produktion von Metaboliten durch Mikroorganismen handeln. Je nach Zweck und Art der Zubereitung werden spezifische Verfahren eingesetzt, um ein vollständiges Bild der biologischen Wirksamkeit zu erhalten. Ein häufig verwendeter Test ist die antagonistische Analyse, bei der die Fähigkeit der Mikroorganismen in einer Formulierung, mit Krankheitserregern zu konkurrieren, geprüft wird. Antimikrobielle Tests können zum Beispiel zeigen, ob eine mikrobielle Formulierung das Wachstum und die Entwicklung von pathogenen Mikroorganismen hemmt, was ein wichtiger Indikator für die Wirksamkeit ist.

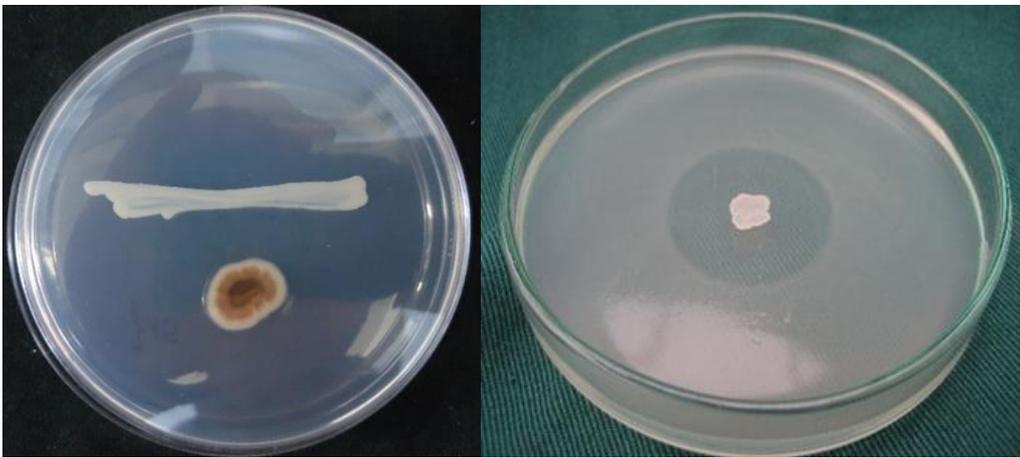


Abb. 4.10. Ein Beispiel für die Überprüfung der Eigenschaften von Mikroorganismen im Hinblick auf ihre Biokontrollaktivität - *Bacillus amyloliquefaciens* gegenüber *Botrytis cinerea* (links) und Siliziumauflösung von *Paenibacillus polymyxa* (rechts).  
Quelle: InterMag sp. z o.o.

Ein weiterer Test der Eigenschaften von Mikroorganismen ist ihre Fähigkeit, Nährstoffe wie Phosphor zu lösen oder Stickstoff zu assimilieren.

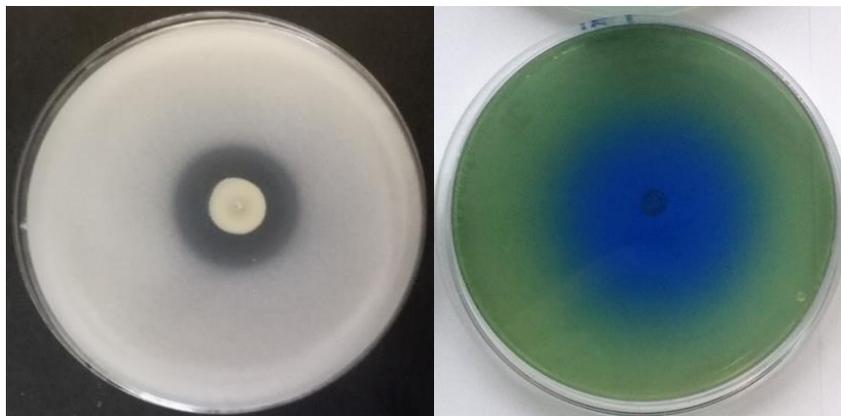


Abb. 4.11. Eigenschaftsprüfung - (links) Phosphorsolubilisierung durch *Bacillus pumilus* - die Verfärbung um die Mikroorganismen zeigt einen korrekt ablaufenden Prozess an; (rechts) Stickstofffixierung durch *Paenibacillus polymyxa* - das Auftreten von Blau um die Bakterienkolonie zeigt eine aktive Stickstofffixierung an.  
Quelle: InterMag sp. z o.o.

Genetische und molekulare Analysen ermöglichen die Identifizierung von Mikroorganismen in Zubereitungen und die Überwachung ihrer biologischen Aktivität; eine genaue Analyse der Genexpressionsmengen von DNA oder RNA kann Informationen über die Reaktion von Mikroorganismen auf Laborbedingungen liefern, was zur Bewertung ihrer Leistungsfähigkeit beiträgt. Die Überwachung des Wachstums und der Aktivität von Mikroorganismen in mikrobiologischen Zubereitungen ist entscheidend für die Beurteilung ihrer Fähigkeit, sich unter bestimmten Bedingungen anzusiedeln und zu vermehren. Die Messung von Parametern wie der Anzahl der Zellen, der Menge der ausgeschiedenen Chemikalien oder der Zellteilungsrate liefert wichtige Informationen über die biologische Wirksamkeit (Sana et al. 2023).

Die abschließende Überprüfung der biologischen Wirksamkeit von mikrobiellen Formulierungen umfasst Tests, die unter Bedingungen durchgeführt werden, die die natürliche Umgebung simulieren, wie z. B. Boden oder Wasser. So wird überprüft, ob die Mikroorganismen ihre gewünschten Eigenschaften auch unter komplexeren Bedingungen beibehalten, was für die Bewertung ihrer Eignung unter realen landwirtschaftlichen Bedingungen entscheidend ist.

### 3.2. Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter kontrollierten Bedingungen

Die Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter kontrollierten Bedingungen ist der Prozess der Bewertung der Wirksamkeit eines Stammes oder einer Formulierung unter kontrollierten Bedingungen, d. h. Phytotron, Gewächshaus im Pflanzenanbau. Ziel dieses Prozesses ist es, zu verstehen, wie gut eine zu prüfende Substanz oder ein zu prüfendes Produkt in einem biologischen Kontext (Umfeld) funktioniert, d. h. wie es sich auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen auswirkt.

Etappen der Überprüfung der biologischen Wirksamkeit (im Pflanzenbau) unter kontrollierten Bedingungen:

1. Versuchsplanung - Festlegung des Versuchszwecks und der Methodik, Definition der erwarteten Ergebnisse und Auswahl der geeigneten Parameter.
2. Vorbereitung eines kontrollierten Raums - Schaffung einer Versuchsumgebung, in der Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Beleuchtung kontrolliert werden können, um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.
3. Anwendung des Stoffes oder Produktes - bestimmungsgemäße Anwendung des Stoffes oder Produktes.
4. Überwachung biologischer Parameter während des Wachstums - Untersuchung biologischer Parameter wie Pflanzenhöhe, Chlorophyllgehalt, Gehalt an Makro- und Mikronährstoffen und mehr.
5. Bestimmung der biologischen Parameter nach Abschluss des Anbaus - Untersuchung der biometrischen Parameter der Pflanzen, d. h. des vegetativen Gewichts.
6. Statistische Analyse der Daten - Verarbeitung und Analyse der gesammelten Daten, Vergleich der Versuchsergebnisse mit der Kontrollgruppe und Interpretation der erhaltenen Ergebnisse.

In der wissenschaftlichen Forschung ist es besonders wichtig, die biologische Wirksamkeit zu überprüfen, insbesondere in den Feldern Landwirtschaft, Biologie, Biotechnologie und Medizin. Es erlaubt Forschern, Wissenschaftlern und Unternehmen, die landwirtschaftliche Formulierungen produzieren, zu bewerten, ob ein neues Produkt oder eine neue Substanz die gewünschte Wirkung unter kontrollierten Bedingungen entfaltet. Dies ist unverzichtbar, bevor es in der Praxis der Landwirtschaft angewendet werden kann.

### 3.3. Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Feldbedingungen

Die Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Feldbedingungen bezieht sich auf die Bewertung der Wirksamkeit von Substanzen oder Produkten in der Umwelt unter Feldbedingungen. Im Gegensatz zu den kontrollierten Bedingungen in einem Phytotron gibt es unter Feldbedingungen eine Vielzahl von Umweltfaktoren, wie z. B. unterschiedliche Wetterbedingungen, unterschiedliche Bodenzusammensetzungen und die Auswirkungen verschiedener Organismen in einem Ökosystem. Schritte zur Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Feldbedingungen:

1. Planung des Experiments unter Feldbedingungen - Entwicklung eines Forschungsplans, der die spezifischen Feldbedingungen berücksichtigt, unter denen das Experiment durchgeführt werden soll;
2. Vorbereitung des Standorts - Auswahl eines geeigneten Gebiets für den Versuch, Vorbereitung des Standorts im Hinblick auf die Forschungsziele und Anwendung der erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen, wie ethische Regeln oder Versuchsgenehmigungen;
3. Anwendung des Stoffes oder Produktes - Anwendung des Stoffes oder Produktes unter natürlichen Bedingungen, unter Berücksichtigung der Besonderheiten des Stoffes oder Produktes, der Pflanzenart und der Umwelt;
4. Überwachung der biologischen Parameter der Kultur auf dem Feld - Durchführung von Messungen an ausgewählten Pflanzen in den Parzellen, Bestimmung des Wachstums, der Wuchsstärke und der Gesundheit der Pflanzen, Messung des Chlorophyllgehalts, Überwachung der Vegetationsindizes, z. B. NDVI.
5. Messung der Quantität und Qualität der Erträge;
6. Datenerhebung und statistische Analyse - Analyse der gesammelten Daten im Zusammenhang mit der Wirkung der Substanz oder des Produkts auf das Wachstum, die Entwicklung und den Ertrag der Pflanzen sowie den Einfluss externer Faktoren.
7. Die Überprüfung der biologischen Wirksamkeit unter Feldbedingungen ist wichtig, weil sie Aufschluss darüber gibt, wie sich Produkte oder Stoffe in der tatsächlichen Umgebung auf die Pflanze auswirken. Dieser Ansatz ist in der Landwirtschaft, im Naturschutz und in der Ökologie von grundlegender Bedeutung, da die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt komplex sind und sich unter Laborbedingungen nur schwer darstellen lassen.

Kurz gesagt, der Prozess der Überprüfung der biologischen Wirksamkeit mikrobieller Formulierungen ist ein mehrstufiger Prozess, der eine Vielzahl von Testmethoden kombiniert. Die Beachtung präziser, zuverlässiger und repräsentativer Tests ermöglicht es den Herstellern, mikrobielle Formulierungen anzubieten, die unter kontrollierten Bedingungen wirksam sind und die Erwartungen in einem vielfältigen und dynamischen landwirtschaftlichen Umfeld erfüllen.

### 3.4. Löslichkeit, Mischbarkeit und Stabilität von Biopräparaten

Die Überprüfung der Stabilität von mikrobiellen Formulierungen ist ein wichtiger Schritt bei ihrer Herstellung und Verwendung. Unter Stabilität versteht man die Fähigkeit einer Zubereitung, ihre biologischen, physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Eigenschaften über einen bestimmten Zeitraum und unter verschiedenen Lagerungsbedingungen zu erhalten. In Labortests wird geprüft, ob die Mikroorganismen in der Formulierung ihre Wachstumsaktivität beibehalten und nicht abgebaut werden, wenn sie verschiedenen Faktoren wie Temperatur, Licht oder Feuchtigkeit ausgesetzt sind. Stabilitätsprüfungen umfassen auch die

Überwachung möglicher Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Formulierung und die Beurteilung, ob ein Abbau der Wirkstoffe stattfindet. Dies ist wichtig, da die Wirksamkeit einer mikrobiellen Formulierung in der Landwirtschaft weitgehend davon abhängt, dass die Integrität der Mikroorganismen während der Lagerung erhalten bleibt. Sorgfältige Stabilitätstests ermöglichen es den Herstellern, die Haltbarkeit einer Formulierung genau zu bestimmen und den Landwirten zu versichern, dass sie von einem Produkt mit gleichbleibender Qualität und Wirksamkeit profitieren werden. Dazu gehören die Lagerung der Biopräparate bei unterschiedlichen Temperaturen, die Durchführung von Analysen der mikrobiellen Zusammensetzung, wie z. B. die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen und die Analyse der genetischen Vielfalt nach einem bestimmten Zeitraum, sowie die Bewertung der physikalischen und chemischen Veränderungen. Die Stabilität wird in verschiedenen Maßstäben geprüft, von Labortests über Tests im Pilotmaßstab bis hin zu großen Produktionstests, um zu beurteilen, ob das Produkt seine Eigenschaften während der verschiedenen Produktions- und Lagerungsphasen beibehält.

Die Prüfung der Löslichkeit von mikrobiologischen Zubereitungen ist ein wichtiger Aspekt für ihre Wirksamkeit und Anwendung. In diesem Zusammenhang wird geprüft, inwieweit sich die Formulierungen in verschiedenen Trägersubstanzen wie Wasser oder anderen Hilfsstoffen auflösen und gleichmäßig verteilen können. Löslichkeitstests sind von entscheidender Bedeutung, da sie sich auf die Gleichmäßigkeit der Anwendung einer Formulierung im Zielgebiet auswirken und die Wirksamkeit und Effizienz der Mikroorganismen im Feld bestimmen. Die Hersteller führen diese Tests in der Regel unter Laborbedingungen durch und simulieren dabei verschiedene Anwendungsbedingungen. In der Praxis umfassen die Löslichkeitstests die Bewertung der Zeit, die das Produkt benötigt, um sich vollständig aufzulösen, den Grad der Auflösung bei verschiedenen Temperaturen oder pH-Werten sowie die Bewertung etwaiger physikochemischer Veränderungen. Die sorgfältige Überwachung dieser Parameter ermöglicht es den Herstellern, mikrobielle Formulierungen anzupassen, um optimale Anwendungsmethoden zu gewährleisten. Eine wirksame Vorbereitung mikrobieller Formulierungen für die Anwendung ist wichtig für den erfolgreichen Einsatz in der Landwirtschaft, im Gartenbau und im Umweltschutz. In Löslichkeitstests wird untersucht, wie sich ein Bioprodukt in Wasser unterschiedlicher Härtegrade oder in anderen Substanzen auflöst. Dazu werden Lösungen von Biopräparaten in verschiedenen Lösungsvermittlern hergestellt und der Grad der Löslichkeit bestimmt. Für feste Produkte, die aktive Mikroorganismen enthalten und direkt auf einen festen Untergrund aufgebracht werden, sind keine Löslichkeitstests erforderlich.

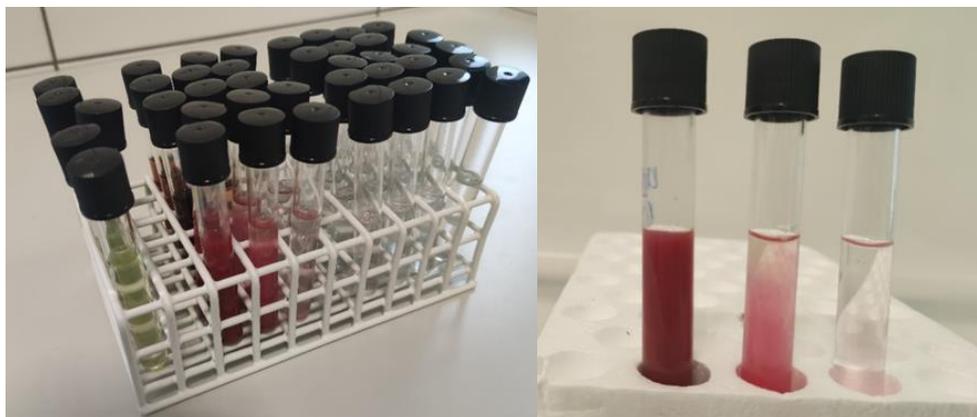


Abb. 4.12. Mischbarkeitstests von Agrochemikalien mit mikrobiellen Produkten in einer Mehrkomponentenspritze.  
Quelle: Intermag sp. z o.o.

Die Prüfung der Mischbarkeit und Verträglichkeit mikrobieller Formulierungen mit anderen Stoffen ist ein wichtiger Schritt bei ihrer Anwendung in der landwirtschaftlichen Praxis. Unter Mischbarkeit versteht man die Fähigkeit einer Formulierung, sich gleichmäßig mit anderen Stoffen wie Düngemitteln oder Pestiziden zu vermischen, ohne dass es zu unerwünschten Ablagerungen oder Veränderungen der physikochemischen Struktur kommt. Die Kompatibilität hingegen bezieht sich auf die Fähigkeit einer Formulierung, mit verschiedenen Chemikalien zu interagieren, ohne ihre Wirksamkeit zu verlieren, d. h. im Falle von mikrobiologischen Formulierungen die Lebensfähigkeit der aktiven Mikroorganismen zu erhalten. Mischbarkeits- und Kompatibilitätstests werden unter Laborbedingungen durchgeführt, wobei die Stabilität der Formulierung in verschiedenen Mischungen und mögliche Wechselwirkungen mit anderen Stoffen bewertet werden. Auf diese Weise können die Hersteller den Landwirten mikrobielle Formulierungen anbieten, die leicht mit anderen in der Agrotechnik verwendeten Mitteln mischbar sind, ohne ihre Wirksamkeit zu verlieren. Sorgfältige Forschung in diesem Bereich trägt dazu bei, das Risiko unerwünschter chemischer Wechselwirkungen zu minimieren und so die wirksame und sichere Anwendung mikrobiologischer Präparate in der landwirtschaftlichen Praxis zu gewährleisten (Ledakowicz 2012).

## Referenzen

- Bednarski W., Fiedurek J. 2012. Podstawy biotechnologii przemysłowej. Wydawnictwo WNT.
- Chaudhary T., Dixit M., Gera R., Shukla A.K., Prakash A., Gupta G., Shukla P. 2020. Techniques from improving formulation of bioinoculants. 3 Biotech, 10, 1-9.
- Elander R.P., Chang L.T. 1979. Microbial Culture Selection. In: Peppler H.J., Perlman D. (eds.) Microbial Technology, Second Edition. Academic Press, 243-302.
- Kuila A., Sharma V. (Eds.) 2018. Principles and Applications of Fermentation Technology. John Wiley & Sons.
- Ledakowicz S. 2012. Inżynieria biochemiczna. Wydawnictwo WNT.
- Olicón-Hernández D.R., Guerra-Sánchez G., Porta C.J., Santoyo-Tepole F., Hernández-Cortez C., Tapia-García E.Y., Chávez-Camarillo G.M. 2022. Fundamentals and concepts on screening of microorganisms for biotechnological applications. Mini review. Current Microbiology, 79(12), 373.
- Sana S., Sheikh A., Maheen Z., Mukhtar N., Ali S., Aftab M., Liaqat I. 2023. Fundamentals of Microbiology: A Laboratory Manual. Scintific Knowledge Publisher.
- Schlegel H.G. 2004. Mikrobiologia ogólna. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Singleton P.W.; Keyser H.; Sande E. 2022. Development and Evaluation of Liquid Inoculants. In: Herridge D. (ed.) Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. ACIAR Proceeding, 109e, 52-66.
- Stackebrandt E., Smith D., Casaregola S., Varese G.C., Verkleij G., Lima N., Bridge P. 2014. Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. SpringerPlus, 3, 1-4.
- Steele D.B., Stowers M.D. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. Annual Review of microbiology, 45, 89-106.

Vassilev N., Vassileva M., Azcón R., Fenice M., Federici F., Barea J.M. 1998. Fertilizing effect of microbially treated olive mill wastewater on Trifolium plants. *Bioresource technology*, 66(2), 133-137.

Vassileva M., Malusà E., Sas-Paszt L., Trzcinski P., Galvez A., Flor-Peregrin E., Shilev S., Canfora L., Mocali S., Vassilev N. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. *Microorganisms* 9(6), 1254.