



Nutzung von Bakterien aus der Rhizosphäre

- am Beispiel der Stickstoff
Bakterien für Leguminosen

spez. der Sojabohne

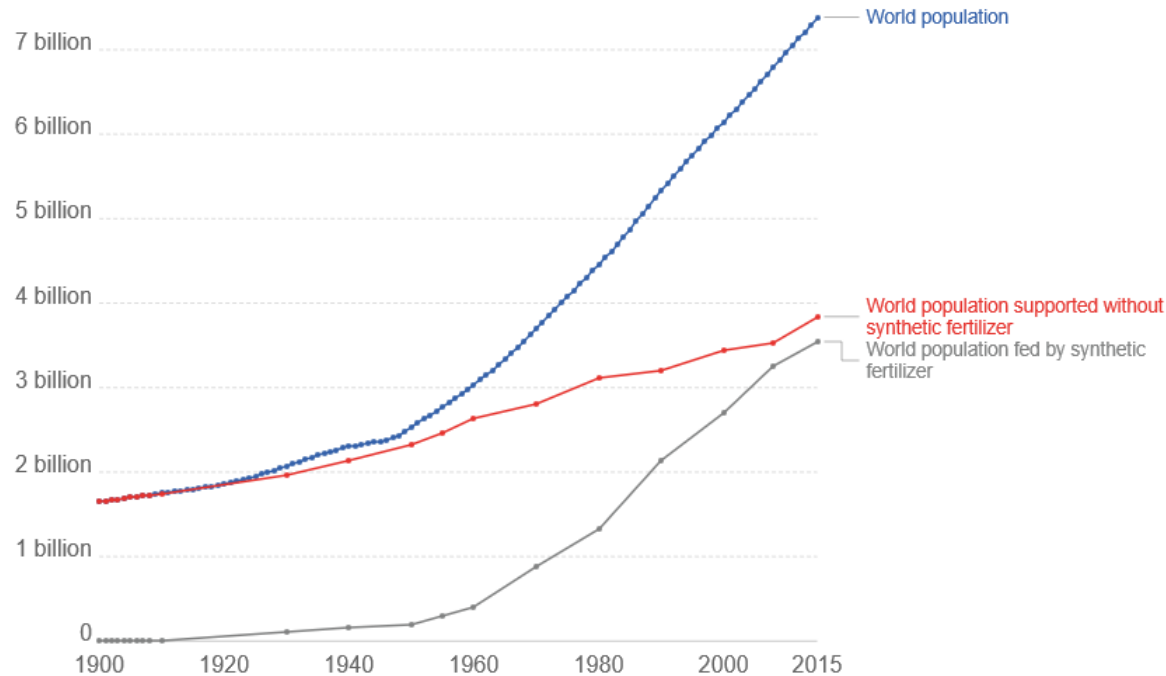
Manfred GÖTZKE – BASF Seed Treatments
Europe - Inoculants
Sept., 2020



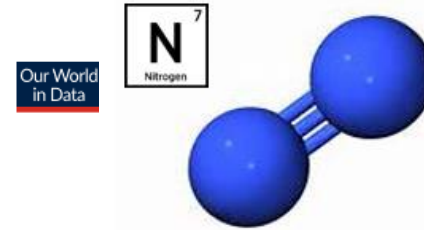
“Retter der Menschheit” – die Haber-Bosch-Synthese

World population with and without synthetic nitrogen fertilizers

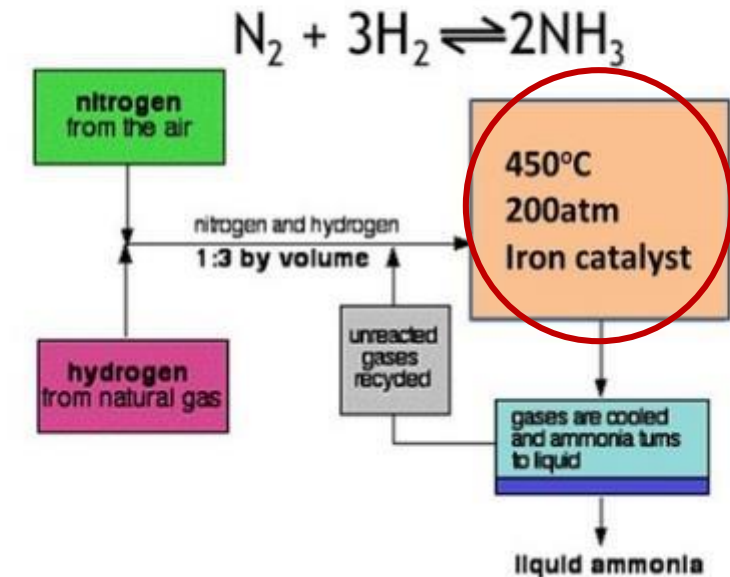
Estimates of the global population reliant on synthetic nitrogenous fertilizers, produced via the Haber-Bosch process for food production. Best estimates project that just over half of the global population could be sustained without reactive nitrogen fertilizer derived from the Haber-Bosch process.



Source: Erisman et al. (2008); Smil (2002); Stewart (2005) OurWorldInData.org/how-many-people-does-synthetic-fertilizer-feed/ • CC BY



Making ammonia The Haber process



N-Dünger-Erzeugung per Haber-Bosch-Verfahren:

- Ernährt fast 50% der Weltbevölkerung!
- Kostenaufwendig durch einen hohen Energiebedarf!
- Dadurch ist ein erhöhter Anteil > 50% fraglich!

Der andere Weg Stickstoff zu erzeugen – N-fixierende Bakterien !

.... zumindest bei Leguminosen Arten

Systematik	
Abteilung:	Proteobacteria
Klasse:	Alphaproteobacteria
Ordnung:	Rhizobiales
Familie:	Bradyrhizobiaceae
Gattung:	<i>Bradyrhizobium</i>
Art:	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>



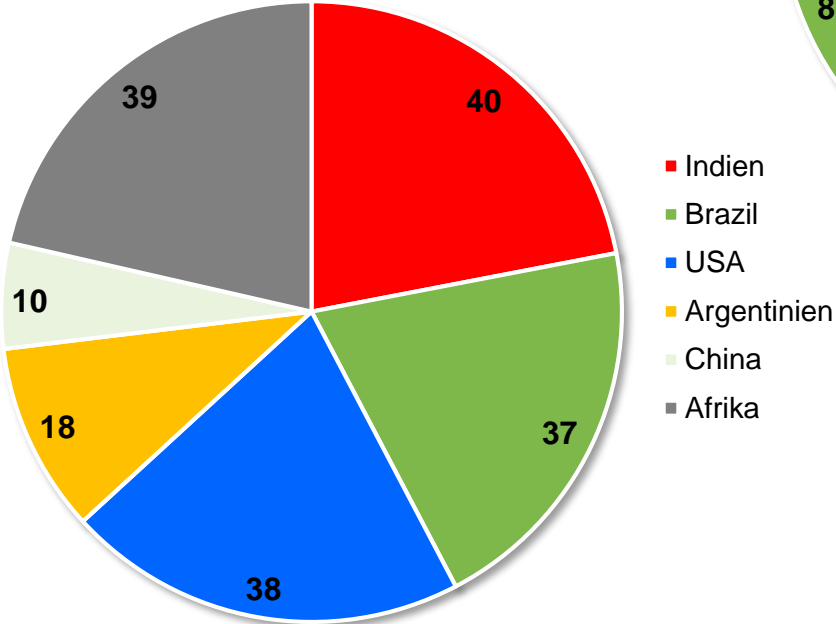
Mikroskopische Aufnahme von *Bradyrhizobium japonicum* (x 60.000) – wirtsspezifisch für die Sojabohne

- N-fixierende Bakterien (**Rhizobien** – auch **Knöllchen-Bakterien** genannt) entnehmen N_2 aus der Luft und reduzieren es per Sonnenenergie (Kohlenhydrate von der Pflanze) zu Ammoniak NH_3 . Die Pflanze erzeugt daraus Proteine für das Pflanzenwachstum → **Symbiose**.
- Nur bei Leguminosenarten vorzufinden!
- Die Rhizobien sind natürliche, bodenbürtige Bakterien; leider nicht sehr konkurrenzfähig. Keine Sporen-Bilder!
- Die Symbiose ist wirtsspezifisch!
- Je nach Rhizobienart kann bis über 400 kg N/ha erzeugt werden, häufiger aber um 100/150kg N/ha, je nach Rhizobienart.
- Die N-Fixierung ist kostengünstig und umweltfreundlich → keine N – Auswaschung oder Verschwendung (keine “Fütterung” der Unkräuter)!

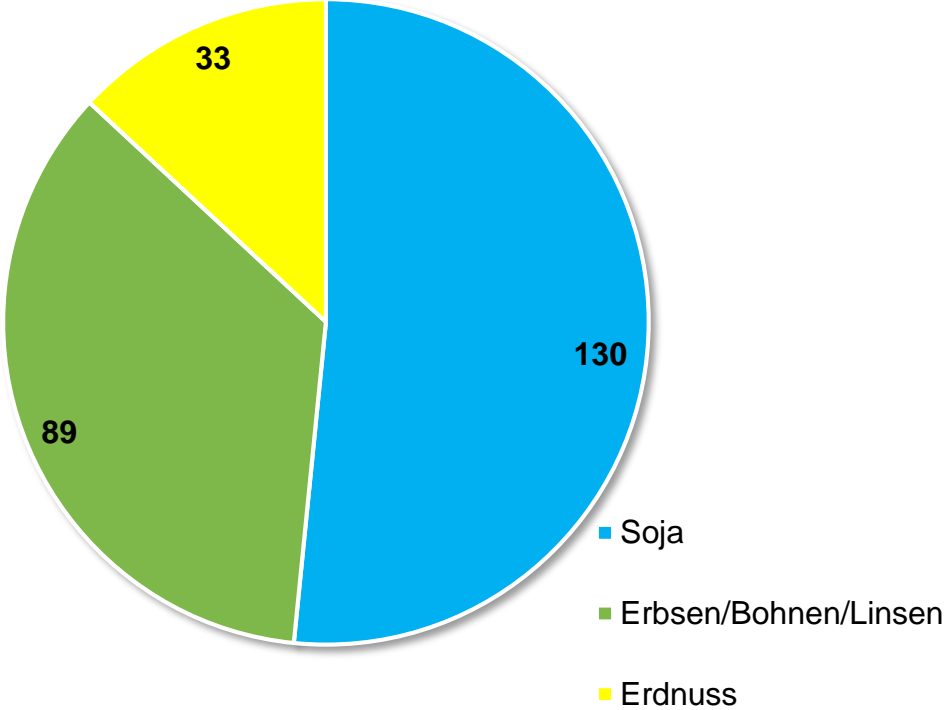
Globaler Leguminosenanbau

- 252 Mio. ha weltweit (2017)
- 734 Mio. ha Getreide inkl. Mais & Reis (2017)

Wichtigste Leguminosen Anbauländer in ha (2017)

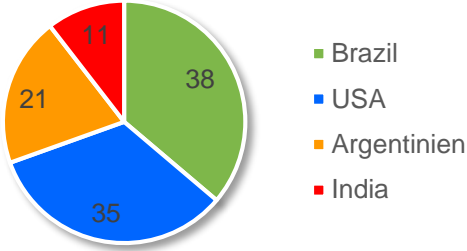


Globale Leguminosen Fläche 2017

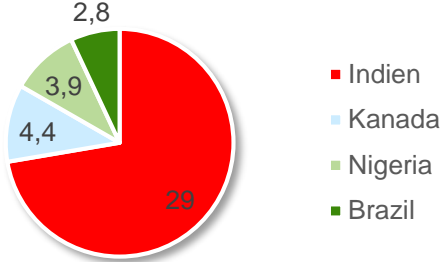


TOP 4 LÄNDER

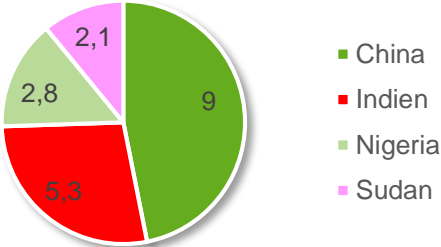
Soja Mio. ha



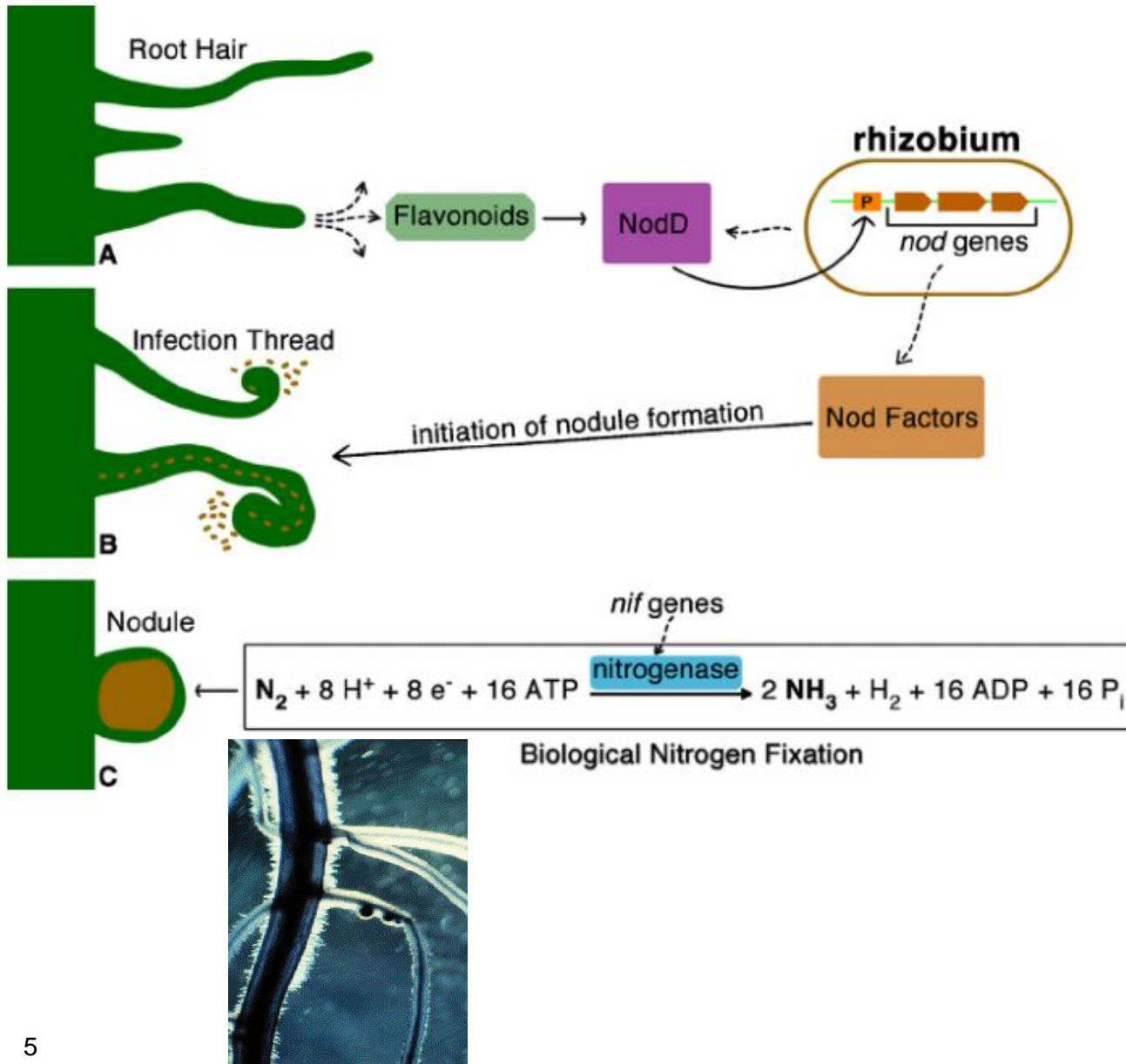
Erbsen/Bohnen/Linsen Mio. ha



Erdnuss Mio. ha



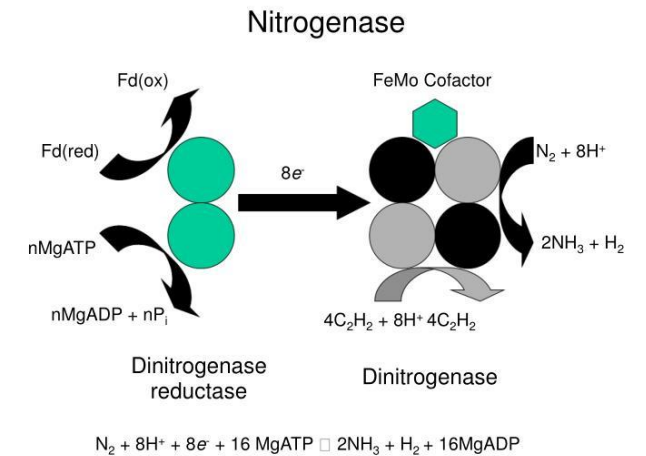
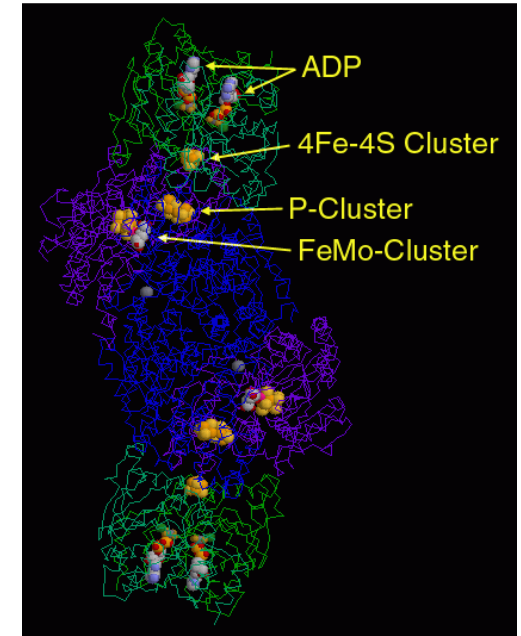
Wie funktioniert die Symbiose ?



- **Kommunikationssystem** zwischen der Wirtspflanze und den Rhizobien, um die Bakterien zu den Wurzeln zu "locken".
- **Flavionide** von Haarwurzeln reizen Nod-D Faktoren (Lipo-chito-oligosaccharides), werden von Rhizobien ausgesandt, welches weitere "Nod Faktoren" herauflöst (Nod A,B & C).
- Diese **Nod-Faktoren** führen die Bakterien zu einer Haarwurzel und initiieren die Krümmung der Haarwurzel.
- Die Bakterie bildet einen **Infektionsfaden**, welcher in die Haarwurzel eindringt und bis zum Cortex der Wurzel vordringt.
- Die Bakterie dringt in den Cortex der Wurzel ein und teilt sich rasant, was zu einer Ausdehnung führt = **Knöllchen**.

N-Fixierung im Knöllchen mittels Nitrogenase - ein einmaliges Enzym in der Natur

- Die Bakterien formen sich zunächst zu **Bakteroiden** um, die eine symbiotische Zellmembran von der Pflanze erhalten.
- Diese Bakteroiden bilden ein Enzymkomplex : **Nitrogenase**, welches N_2 aus der Luft zu NH_3 reduzieren kann.
- Dieser Prozess erfolgt in mehreren Stufen über das **Di-Nitrogenase-Enzym** (Fe-Mo-S Komplex) und die **Di-Nitrogenase-Reduktase** (Fe-S Komplex).
- Die Di-Nitrogenase-Reduktase liefert Energie mittels freigesetzter Elektronen, durch den Abbau von ATP zu ADP.
- Die Di-Nitrogenase kann mithilfe der freigesetzten Energie N_2 zu NH_3 in mehreren Durchläufen reduzieren.
- Diese Metallo-Enzyme sind sehr sauerstoffempfindlich! Die Pflanze liefert **Leghaemoglobin** an die Zellmembrane, um die Bakterien vor O_2 -Überschuss zu bewahren.



Die wirtsspezifische Assoziation der Rhizobien – Bakterien

- Zu jeder Leguminosen-Kulturart kann nur eine Rhizobienart eine Symbiose zur N-Fixierung eingehen:

- Leguminosenart

- Sojabohne
- Erdnuss
- Kichererbse
- Lupine
- Luzerne
- Trifolium-Klee
- Phaseolis Bohnen
- Ackerbohne, Erbse, Linsen, Wicken

- Bakterienart

- ↔ *Bradyrhizobium japonicum/elkanii*
- ↔ *Bradyrhizobium ssp. arachis*
- ↔ *Bradyrhizobium ssp. cicer*
- ↔ *Bradyrhizobium lupini*
- ↔ *Sinorhizobium meliloti*
- ↔ *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii*
- ↔ *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*
- ↔ *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae*



Impfung mit *Bradyrhizobium japonicum* in Soja

- Feldversuch



Used with permission from Iowa State University Extension publication Soybean Growth and Development (PM 1045).



Ungeimpft

Mit BASF Impfstoff

 **BASF**
We create chemistry

Limburgerhof, Germany, 2015

Fünf Kriterien für einen effizienten Impfstoff

5 Kriterien für ein « High-Tech » Impfstoff:

- Effizienter **Rhizobium Stamm** → Herkunft: Universitäten als Erhalter (globale Selektion).
- Optimales **Trägersubstrat** für die Bakterien → **Torfauswahl** oder eine **flüssige Nährlösung** (Achtung: O₂-Versorgung!).
- **Steriles Umfeld**, um Kontaminierung zu vermeiden.
 - **hohe Konzentration der Bakterien** wird erhalten.
 - langes “shelf-life”.
- **‘State-of-the-art’ Fabrikation** & ständige Qualitätskontrollen (aufgebaut auf “Trial & Error“ und gute Laborpraktiken).
- Korrekte **Lagerung & Anwendung** – Impfstoff ist ein lebendes Material.



Aktives Sojknöllchen

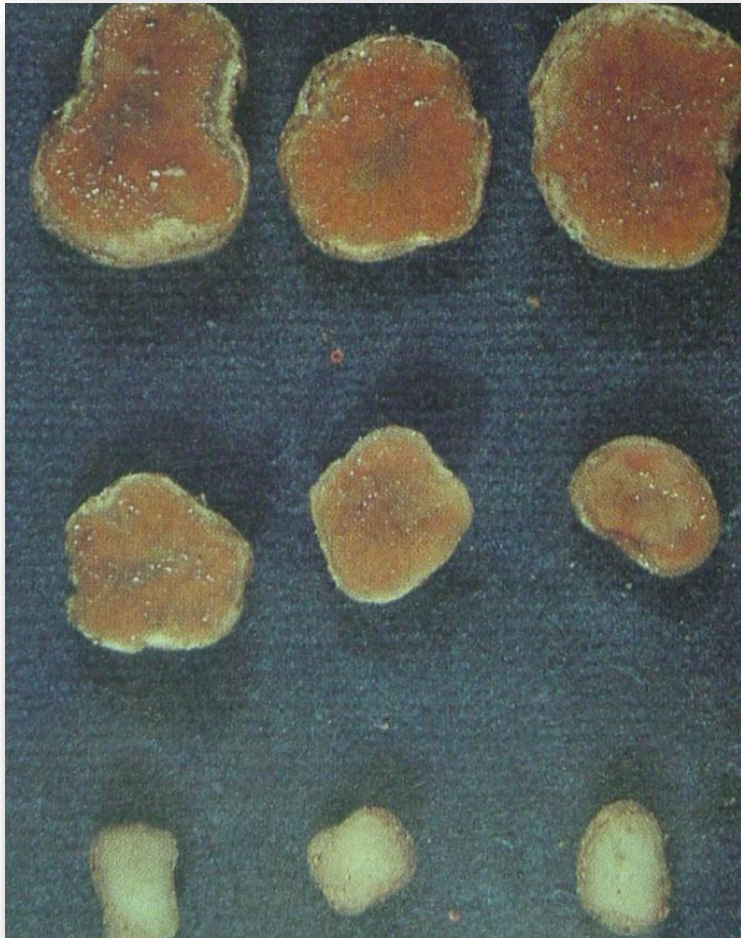
Nicht alle Rhizobien – Bakterien im Boden sind gleich !

Soja Knöllchen sektiert

Effizient

Weniger
effizient

Ineffizient



Lokale Rhizobien im Boden (wenn überhaupt vorhanden) sind häufig wenig produktiv :

- **Geringe Anzahl der Bakterien/g. Boden** aufgrund Wettbewerb mit anderen Mikroorganismen im Boden.
- **Nicht genau am Ort** wo das Saatkorn im Boden abgelegt wird.
- Die Umwelt des “Überleben der Besten“ **selektiert nicht die besten N-Produzenten**, sondern die besten Überlebenden in einem konkurrenzstarken, "feindlichen" Umfeld.
- Effektive Biomasse der lebendigen Knöllchen viel wichtiger als Knöllchenanzahl.

Deshalb impfen !! - Aber Sie haben die Qual der Wahl bei Impfmittel !

❖ Standard Impfstoff auf Torf Basis :

- Impfung durch Landwirt
- Robust (Torf schützt)
- Lange haltbar vor Nutzung
- i.d.R. 1 Packung/Ha
- Konz. bei $1-2 \times 10^9$ cfu/g.
- Sofort zu nutzen nach öffnen
- Handarbeit zur Aufbringung

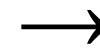


❖ Vor-Impfstoff – flüssig mit “Extender”

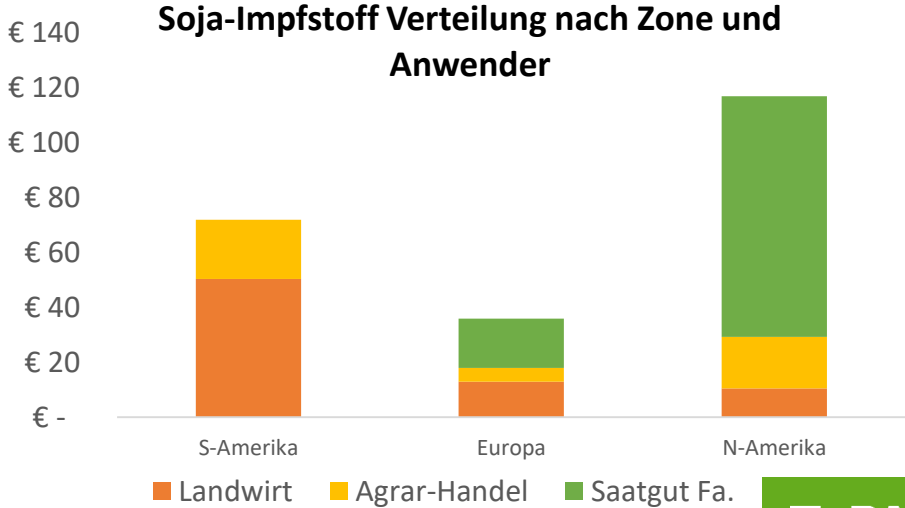
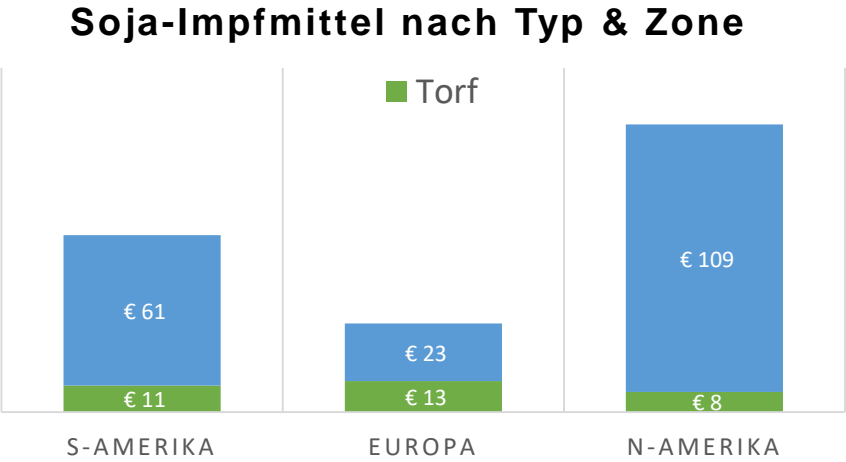
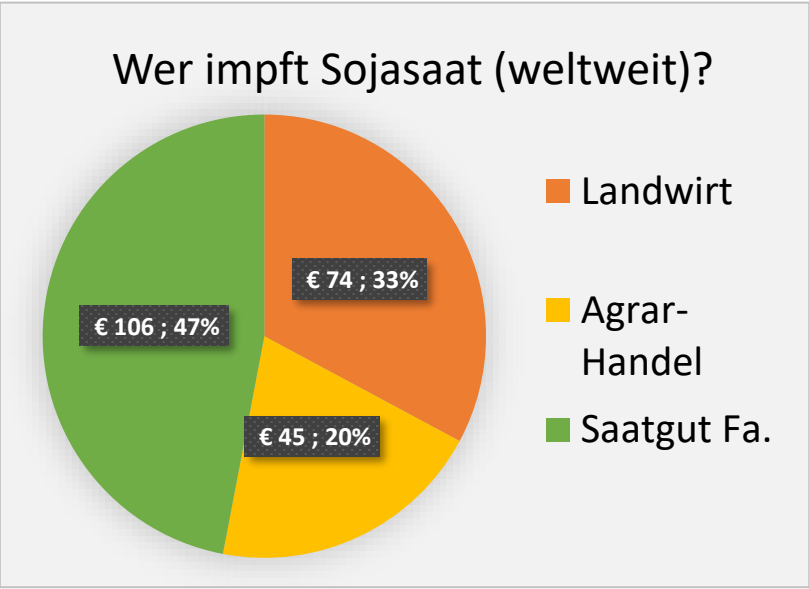
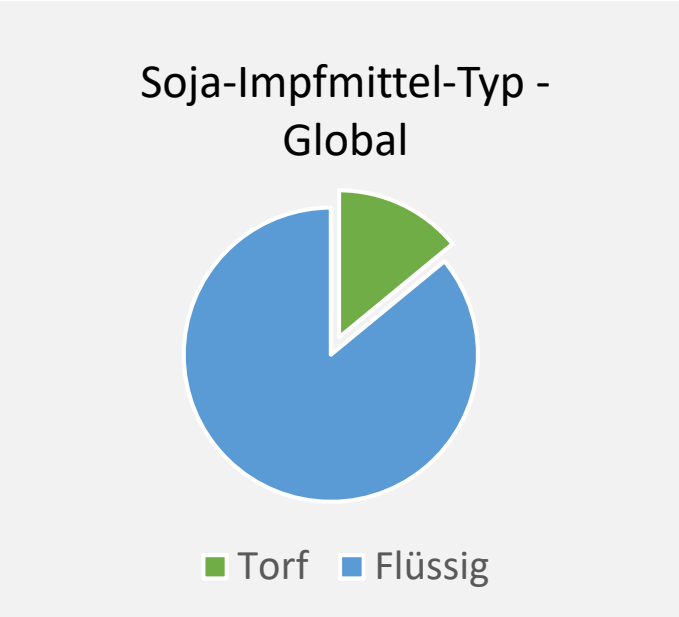
- Profess. Impfung beim Züchter
- Genaue Dosierung/Korn
- Bis zu 90 Tagen shelf-life nach Impfung
→ Flexibilität / große Flächen
- Einfacher für den Landwirt
- Kühle Lagerung vor & nach der Anwendung
- Hohe Konz. erforderlich (1×10^{10} cfu/ml)!



+




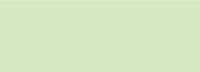
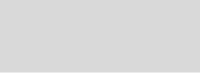
Sojabohne Impfstoff – Typen und Anwender (weltweit)



Leguminosen Impfstoffe in Europa

Länder mit Registrierungspflicht

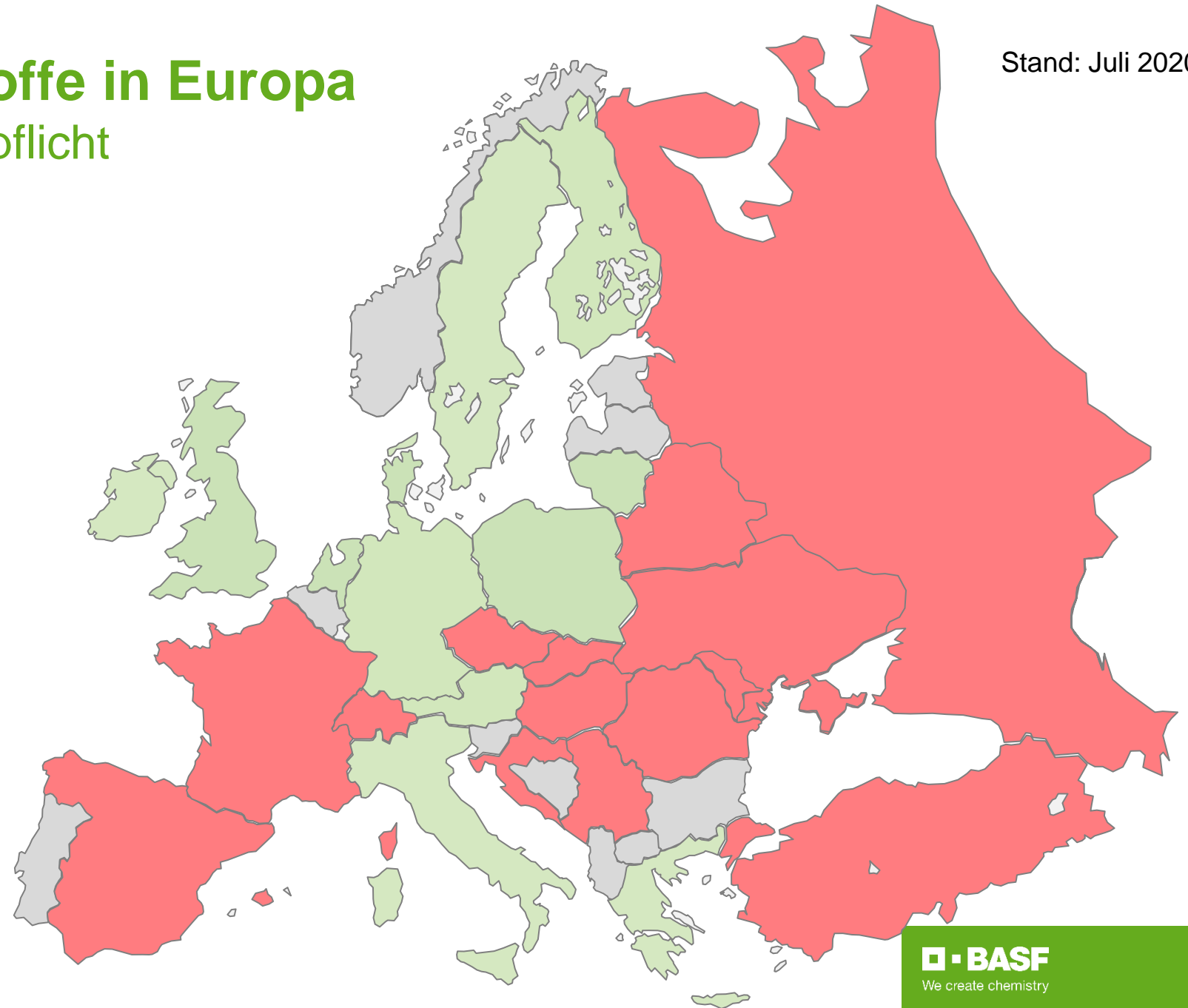
Stand: Juli 2020

	= Registrierungspflicht
	= keine Registrierung
	= nicht angefragt

Sojaflächen in Europa:

- Russland: ca. 3,2 Mio. ha
- Ukraine : ca. 1,8 Mio. ha
- EU + RS : 0,5 – 0,8 Mio. ha

Total: 5,5 – 6 Mio. Hektar



Impfstoff Fabrikation – “State-of-the-art” Anlagen



Bradyrhizobium jap.

- Vermehrung in sterilem Fermenter
- “Fermenter Zug” geht von 10 L zu 100 L Gefäßen...
- ... um dann in 5.000 L bis zu 30.000 L Fermenter vor der “Ernte” zu “reifen”

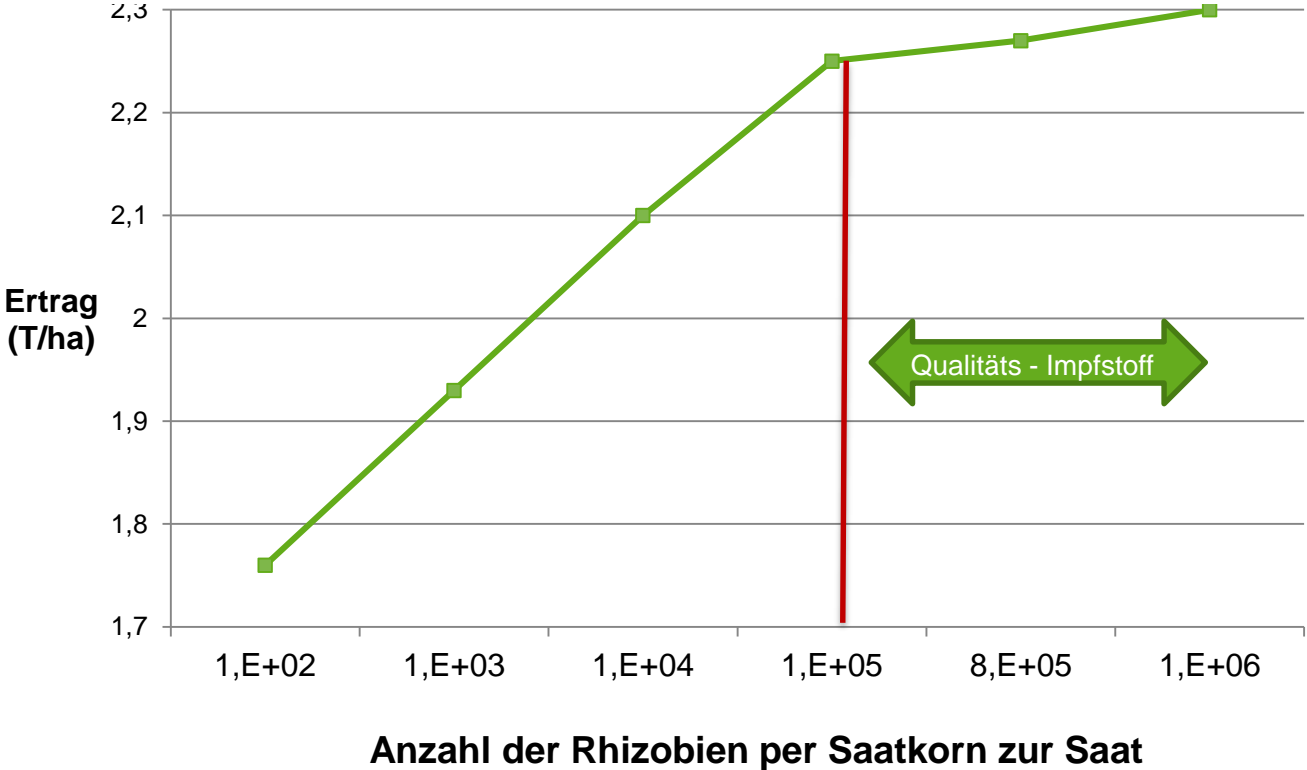


BASF
We create chemistry

Wie viele Rhizobien werden zur optimalen Ertragssteigerung benötigt?

Effekt von Rhizobien Anzahl / Saat auf den Ertrag

(Versuchsergebnisse aus Frankreich, Kanada und Australien – jungfräuliche Böden)



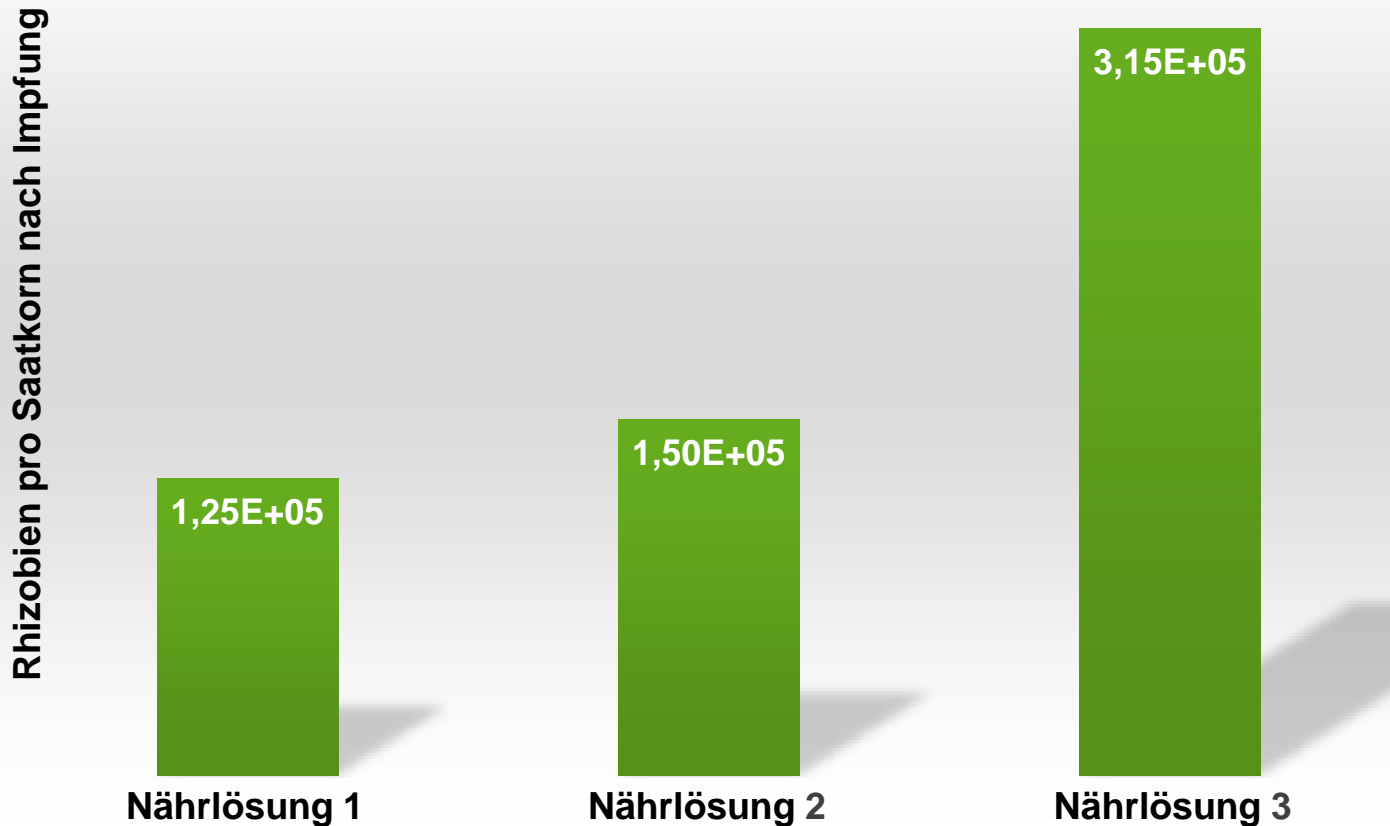
Starke, eindeutige Korrelation zwischen Bakterienkonzentration pro Saat und Ertragsleistung!



Mehr Bakterien pro Saat = bessere Inokulierung = höheren Ertrag

Produktformulierung - ebenso wichtig wie der Bakterienstamm

Einfluss der Nährlösungen auf die Bakterienkonzentration nach Aufbringung auf die Saat



Eine gute Nährlösung :

- Hält die Rhizobien lange Zeit in der Produktpackung am Leben
- Hält die Rhizobien ebenfalls während und nach der Impfung am Leben (→ verlassen der sterilen Umgebung)
- Beeinflusst nicht den optimalen pH-Wert des Umfelds

Mehr Bakterien pro Saat = Mehr Ertrag!

Umweltfaktoren, die die Effizienz der Rhizobien beeinflussen

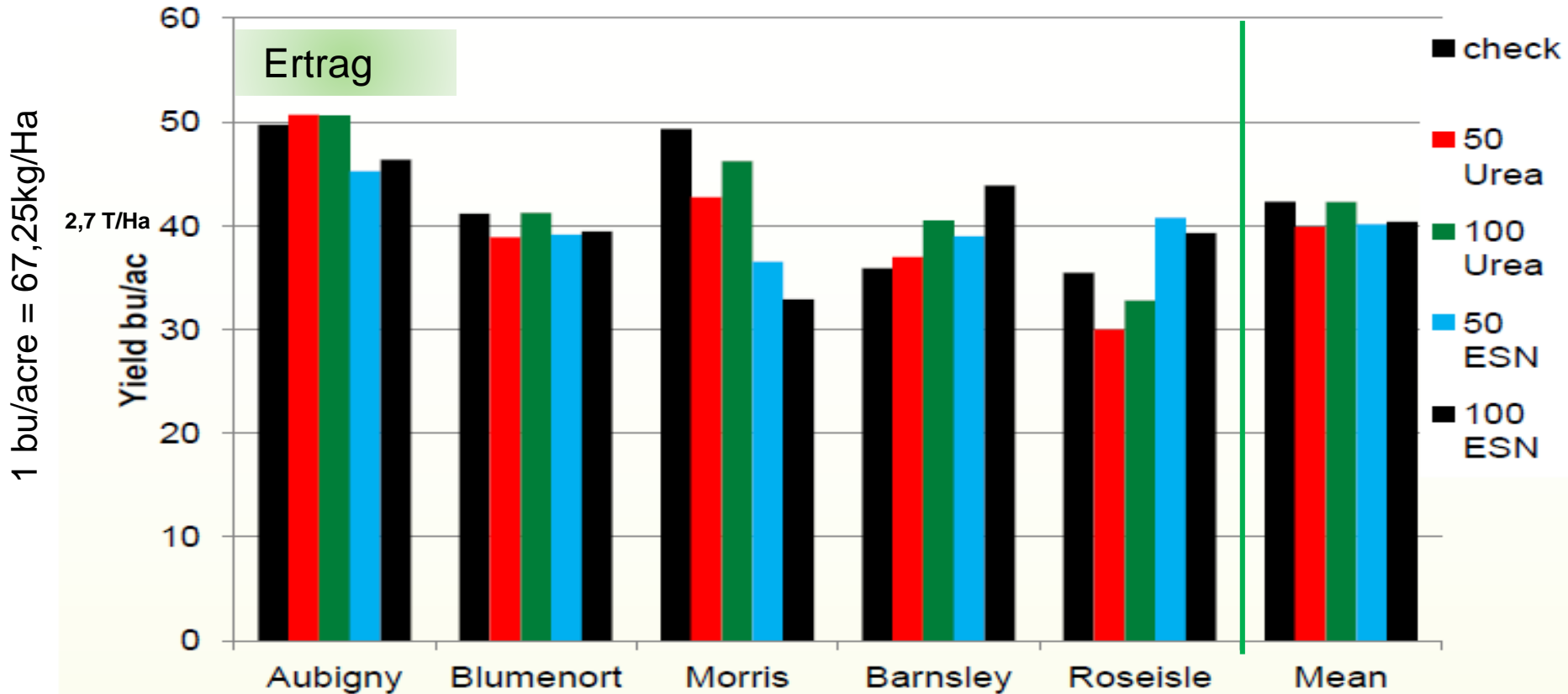
Rhizobien sind lebend und müssen am Leben erhalten werden – Was ist zu beachten ?

- Korrekte Lagerung : kühl & trocken (optimal: + 2°C bis + 12°C)
- Umweltfaktoren:
 - **Neutrales bis leicht saurer pH-Wert:** optimal ist ein pH-Wert zwischen 6,2 – 7,4
(doppelte Impfung empfohlen in pH – Bereichen 5,0 – 5,5 sowie 7,8 – 8,2)
 - **Bodentemperatur > 17°C:** optimal sind 25 – 30°C; bei 10°C und weniger ist der Knöllchenbildungsprozess blockiert → Saattermin darauf abstimmen!
(Verzögerungen in Knöllchenbildung häufiger in pfluglosen Feldern, da i.d.R. ca. 2°C kühler)
 - **Witterungsextreme - zu trocken:** Bakterien vertrocknen und cfu-Zahlen fallen rapide (Sandböden)
 - **zu nass:** Bakterien erleiden O₂ – Mangel und/oder werden in tiefere Schichten ausgewaschen (schwere, verdichtende Böden)
 - **Zu viel N-min (30cm):** Zu viel Rest-N im Oberboden verzögert die Knöllchenbildung. Die Pflanze geht den leichteren Weg bei der N-Annahme. Symbiose erst später, wenn der freie N im Boden aufgezehrt ist.



Impfung vs. N-Dünger in Sojabohnen (N-Dakota (USA) & Manitoba, 2013)

*J.Heard et.al., Manitoba Agriculture, Food & Rural Dept, Canada



Check = nur Impfung

Urea = + kg Harnstoff

ESN = +kg N-Dünger mit verzögerte Wirkung

Soja Ertrag in bu/acre an den Standorten & Mittel

- N-Dünger hat auf 3 von 5 Standorten eher einen negative Effekt erzielt, im Vergleich zur Impfung
- Im Durchschnitt der Versuche hat N-Düngung keinen Vorteil erbracht, aber höhere Kosten !

Wie geht es weiter? – Zukunftserwartungen

Seit den letzten 30 Jahren gibt es keinen wirklich neuen Rhizobien-Stamm auf dem Markt
→ Hier wird zur Zeit kein Durchbruch erwartet.

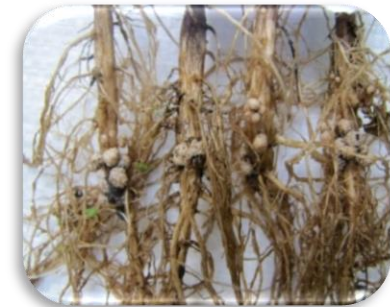
Marktentwicklung:

- Stärkeres Eindringen der Impfstoffe in Entwicklungsmärkte
- Steigende globale Leguminosen-Nachfrage (Welt-Ernährungsproblem)
- Tendenz zur Vor-Inokulierung durch Züchter & Handelsstufe/Vermehrter/Service



Produktentwicklung :

- Tendenz zu **flüssigen Impfstoffen** und mehr **Produktsicherheit** (Shelf-life/Überlebensfähigkeit)
- **Verbesserte Verträglichkeit** mit anderen Beizprodukten (Phyto-pharmaka, inerte oder lebende biologische Produkte, Spurenelement-Dünger)
- Kombination von Rhizobia mit **unterstützenden Technologien** (inert oder lebend), die ertragsstützend wirken können (Pflanzenwuchs, Nährstoffverfügbarkeit, Kältetoleranz etc.)



→es gibt weiterhin viel zu tun!



We create chemistry