

Schlussbericht zu Nr. 8.2

ZE: ABiTEP GmbH
Glienicke Weg 185, D-12489 Berlin

Förderkennzeichen: **0313805S**

Vorhabensbezeichnung: Development of Novel *Bacillus* Polyketide Antibiotics for Agriculture and Medicine

Subprojekt 3:

Entwicklung und Optimierung der großtechnischen Produktion neuer *Bacillus*-Produkte

Laufzeit: 01.10.2006 – 31.07.2009

0. Inhalt

1. Aufgabenstellung
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
3. Planung und Ablauf des Vorhabens
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen
6. Darstellung der erzielten Ergebnisse
7. Zukünftige Anwendung und Verwertbarkeit
8. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen
9. Erfolgte / geplante Veröffentlichungen
10. Literatur

1. Aufgabenstellung

Das Projekt beinhaltete die Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen für die Anwendung in der Landwirtschaft. Insbesondere die Bekämpfung von *Erwinia amylovora* stand dabei im Fokus.

Erwinia amylovora, Verursacher des Feuerbrandes, ist ein phytopathogenes Bakterium, welches großen Schaden in Obstplantagen (z. B. Kernobst) anrichtet.

Die Bekämpfung durch Rückschnitt und Verbrennen von befallenen Pflanzen ist nicht ausreichend. Der Einsatz von Streptomycin ist nach EU-Rechtlinie verboten und nur bei Gefahr im Verzug unter speziellen Voraussetzungen möglich, da die Verwendung von Streptomycin in der Landwirtschaft Kontaminationen des Erntegutes verursacht

und die Übertragung von Antibiotikaresistenzen auf Krankheitserreger des Menschen hervorrufen kann. Daher ist die Suche nach Alternativen zwingend geboten.

Durch die vollständige Entschlüsselung des Genoms von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 im Rahmen von GenomikPlus-Vorläuferprojekten stehen Erkenntnisse zur Identifizierung von Sekundärmetaboliten wie der antibakteriellen Substanzen Difficidin, Oxydifficidin, Macrolactin und Bacillaen zur Verfügung.

Die effektive Produktion und Charakterisierung der von *Bacillus amyloliquefaciens* gebildeten Sekundärmetaboliten stehen im Mittelpunkt dieses Projektes. Für Entwicklung und Vermarktung eines wirksamen Pflanzenschutzmittels ist eine Identifizierung und Quantifizierung der aktiven Stoffe grundlegende Voraussetzung.

Die Produktion dieser Metaboliten bei optimierter Kultivierung der natürlich vorkommenden Stämme, sowie die Möglichkeiten zur weiteren Steigerung der Produktion durch Verwendung gentechnisch veränderter Stämme sollten in diesem Projekt bearbeitet werden.

Im Teilprojekt der ABiTEP GmbH sollten verschiedene *Bacillus*-Stämme auf ihre Fähigkeit zur Bildung antibakteriell wirksamer Polyketide überprüft werden. Für die ausgewählten natürlichen Stämme sowie für leistungsstärkere Mutanten (vom Partner 1 Humboldt Universität Berlin bereitgestellt) sollten Medien entwickelt und Fermentationsverfahren im Schüttelkolben bis hin zum kleintechnischen Maßstab (70 L-Fermenter) erprobt und optimiert werden. Es sollten lagerstabile Metabolitprodukte hergestellt werden. Als Grundlage für die Verfahrensoptimierung und zur Bewertung der Muster waren Methoden zur zeitnahen Prüfung der Wirksamkeit der Metaboliten zu entwickeln. Außerdem sollten den verschiedenen Projektpartnern in ausreichender Menge Muster für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Firma ABiTEP GmbH beschäftigt sich seit 2005 mit der Entwicklung und Herstellung von biotechnischen Produkten für die Landwirtschaft, insbesondere für den biologischen Pflanzenschutz. Als Nachfolgeeinrichtung der FZB Biotechnik GmbH basiert die Arbeit der Firma auf jahrelangen Erfahrungen in der Kultivierung von *Bacillus*-Stämmen sowie in der Produktion von Sekundärmetaboliten. In einem vorherigen EU-Projekt (CT-2004-512622, Bactofruct) konnten erste Erfahrungen zur Kultivierung und Produktion von antibakteriellen Substanzen gesammelt werden, an die in diesem Projekt angeknüpft wurde.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Nach dem im Antrag vorgelegten Plan wurde die Optimierung der Metabolitenproduktion, das Scale up und die Aufarbeitung in mehreren Stufen durchgeführt. Entsprechend der Blütezeit der Obstbäume und der Versuchsplanung des Projektpartners 4 Bio-Protect GmbH wurden jährlich im Frühjahr größere Metabolit-Produktionen durchgeführt, um den Projektpartnern genügend Material bereit zu stellen.

Ablaufplan:

Workpackage 1: Im Zeitraum 10/06 – 03/07 sollten *Bacillus*-Stämme insbesondere FZB42 im Schüttelkolben kultiviert werden. Medien zur Produktion von Polyketiden sollten entwickelt und optimiert werden.

Workpackage 2: Ziel der Arbeiten im Zeitraum 04/07 - 09/07 war es, die Kultivierung in den bis dahin entwickelten Medien im 1,5 L-Maßstab durchzuführen. Die Effekte von verschiedenen Fermentationsparametern wie Temperatur und Sauerstoffpartialdruck auf die Bildungsraten der Polyketide sollten überprüft werden.

Außerdem sollten Probenmuster den Projektpartnern Humboldt Universität Berlin (Partner 1), Technische Universität Berlin (Partner 2) und Bio-Protect GmbH Konstanz (Partner 4) zur Analyse der Wirksamkeit (Blütentest, Feldexperimente) und Identifizierung (HPLC, MS) bereit gestellt werden.

Workpackage 3: Aus den optimierten Fermentationsbedingungen sollte im Zeitraum 10/07 – 03/08 eine weitere Maßstabsübertragung auf 10 L erfolgen. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Polyketide sollte in Kooperation mit den Projektpartnern 1, 2 und 4 fortgeführt werden.

Workpackage 4: Im Zeitraum 04/08 – 12/08 sollten die Kultivierungen im 70 L-Fermenter durchgeführt werden. Aufarbeitungsprozesse zur Formulierung und Stabilitätsüberprüfung sollten erarbeitet werden. Proben aus standardisierten Fermentationen und Aufarbeitungen sollten den Projektpartnern 1 und 2 zur Verfügung gestellt werden.

Workpackage 5: Aufgabe des letzten Zeitraums bis 07/09 war es, in ständiger Rücksprache mit den Projektpartnern über alle Parameter zur Bildung von Polyketiden eine solide Wissensbasis zu schaffen. Dieses sollte für die Entwicklung von spezifischen, innovativen Produkten einer neuen Generation von biologischen Pflanzenschutzmitteln eine Grundlage bieten. Von besonderem Interesse war die Identifizierung der leistungsfähigsten Polyketide, die optimierte Produktion und eine Aufarbeitung mit lagerstabilen Formulierungen. Außerdem sollte eine Weiterentwicklung der entsprechenden biologischen Testsysteme und Quantifizierung der Produkte durch analytische HPLC erarbeitet werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Feuerbrand wird verursacht durch das stäbchenförmige, begeißelte Bakterium *Erwinia amylovora* aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Das Bakterium ist sowohl außerhalb als auch im Pflanzengewebe seines Wirtes anzufinden.

Ursprünglich wurde der Erreger in Nordamerika 1780 erstmals festgestellt (1). Unter anderem durch internationalen Warenaustausch konnte er sich in über mehr als vierzig Ländern der Erde ausbreiten. Mittlerweile hat er sich seit 1971 auch in ganz Deutschland vermehrt. Feuerbrand stellt derzeit die gefährlichste Pflanzenkrankheit in der Familie der Rosengewächse dar.

Jährlich tritt Feuerbrand in sehr unterschiedlichen Befallsintensitäten auf. Dies hängt von verschiedenen Faktoren und deren Wechselwirkung untereinander ab:

- Klimaverhältnisse
- Standortverhältnisse
- Pflanzenart / -sorte
- Bakteriendichte auf und / oder in den Wirtspflanzen der Umgebung
- Kulturmaßnahmen
- Pflanzenvitalität

Da der Bakterien Schleim zuckerähnlich ist, lockt er Insekten an. Diese Überträger sowie Regen und Wind verbreiten u. a. die Bakterien weiter.

Durch die Ausbreitung der Bakterien im pflanzlichen Gewebe kommt es zu einer allgemeinen Schwächung bzw. zum Absterben der befallenen Pflanzen / -teile.

Ideale Lebensbedingungen bestehen zwischen 15 °C - 27 °C bei hoher Luftfeuchtigkeit. Bei Temperaturen unter 12 °C und über 28 °C gehen die Bakterien in der Wirtspflanze in einen inaktiven Ruhezustand über. Es bilden sich im Herbst bei sinkenden Temperaturen sogenannte Canker, die Überwinterungsstellen und Aktionszentren für eine weitere Infektion im kommenden Jahr (2).

Feuerbrand ist gemäß § 2 der Feuerbrandverordnung vom 20. Dezember 1985 (BGBl. I S. 2551) meldepflichtig (3).

Außer Antibiotika stehen gegen den Erreger momentan keine hoch wirksamen chemischen Mittel zur Verfügung. Ständige Kontrollen und sofortiger Entfernung von befallenen Pflanzen / -teilen halten den Infektionsdruck niedrig. Dieses ist die wirksamste Maßnahme, um einer weiteren Ausbreitung entgegenzutreten. In Deutschland gibt es einen hohen Bedarf an einer wirksamen Bekämpfung der Krankheit während der Obstblüte. Auch Triebinfektionen, insbesondere nach Hagelereignissen, müssen verhindert werden (4).

Behandlungen mit Pflanzenschutzmitteln dürfen nicht zu Blütenschäden und Fruchtberostung führen. Diese Kriterien können mit dem Antibiotikum Streptomycin erfüllt werden. In den letzten Jahren wurden im Rahmen der Strategie zur Bekämpfung des Feuerbrands das Inverkehrbringen und Anwenden streptomycinhaltiger Pflanzenschutzmittel nur nach § 11 Absatz 2 Satz 1 Nr. 2 des Pflanzenschutzgesetzes bei „Gefahr im Verzug“ in begrenztem Umfang für die Dauer von jeweils 120 Tagen genehmigt. Eine Genehmigung war neben Plantomycin® WG (Fa. Asepta B. V., Niederlande) auch für die beiden Mittel Strepto® (Fa. Globachem nv, Belgien) und Firewall™ 17 WP (Fa. ConTrade GmbH, Deutschland) erfolgt. Die Genehmigungen waren an sehr strenge Maßnahmen und Auflagen gebunden. 2003 wurde ein Feuerbrand-Strategiepapier vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz entwickelt, in dem die Anwendung auf fünf Jahre beschränkt wurde, welches 2008 um weitere fünf Jahre verlängert wurde.

Es ist Ziel des umweltfreundlichen Pflanzenschutzes, die Anwendung antibiotikahaltiger Pflanzenschutzmittel möglichst bald einzustellen (4, 1).

Kupferhaltige Pflanzenschutzmittel erreichen nicht die Wirkungsgrade von Streptomycin in der Feuerbrandbekämpfung und verursachen Blütenschäden sowie Fruchtberostung an Birne und Apfel (4).

Hefen und andere Pilze (z. B. *Aureobasidium pullulans*, BlossomProtect™) dienen als wirksame Antagonisten, bringen aber eine Mehrberostung mit sich.

Andere Antagonisten wie *Bacillus subtilis* (Serenade®) und *Pseudomonas fluorescens* (Blight Ban™) wurden bereits eingesetzt, konnten aber nicht die gewünschte Wirksamkeit erreichen. Diese können aber im Gegensatz zu Pilzen oder Hefen mit chemischen Fungiziden gemischt werden, um gleichzeitig andere Erreger zu erreichen.

Bacillus subtilis und *Bacillus amyloliquefaciens* produzieren antibakterielle Polyketide, die eine hohe Wirksamkeit gegen *Erwinia amylovora* zeigen. In Mischkulturtests und Agardiffusionstests kann diese Hemmung beziehungsweise Abtötung des Erregers nachgewiesen werden. Die Hemmwirkung kann auch anhand eines Tests mit infizierten Blüten überprüft werden (Bio-Protect GmbH). In Freilandversuchen konnten aufgrund klimatischer Verhältnisse und großen Kosten noch keine reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden. Da diese Polyketide eine große Wirksamkeit gegen Feuerbrand aber auch gegen andere phytopathogene Organismen wie *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* und *Clavibacter michiganensis* zeigen, ist es Ziel dieses Projektes gewesen, ein Produkt zu entwickeln, welches streptomycinhaltige Mittel ablösen könnte.

Bacillus amyloliquefaciens ist in der Lage, auch antifungale Lipopeptide zu produzieren, deren Wirksamkeit aber nicht Gegenstand des Projektes war. Jedoch zeigte sich im Rahmen des Projektes, dass dieser Mikroorganismus in der biologischen Bekämpfung phytopathogener Organismen mit weitreichenden Wirkungen einsetzbar ist.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Projektes „MetabolitGenoMik“ wurden mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Borriss (Projektkoordinator) (Institut für Biologie, Humboldt Universität Berlin, Partner 1), der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Süßmuth (Institut für Chemie, Technische Universität Berlin, Partner 2) und Herrn Dr. S. Kunz von der Firma Bio-Protect GmbH Konstanz (Partner 4) eng zusammengearbeitet. Neben regelmäßigen Probenlieferungen der Firma ABiTEP GmbH an die Projektpartner konnte bei alljährlichen Treffen ein ständiger Informationsaustausch stattfinden.

Die Proben wurden durch Partner 1 und 2 analysiert und bei Partner 4 in sogenannten Blütentests auf ihre Wirksamkeit überprüft. Ein Artikel im Journal of Biotechnology (5) wurde unter Federführung von Partner 1 veröffentlicht.

Externe Versuchspartner (Julius Kühn Institut, Institut für biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt; Landratsamt Karlsruhe und Universität Heidelberg (Kirschgartshausen); Kompetenzzentrum für Obstbau Bodensee, Bavendorf sowie die agro nord Kürzinger GbR, Sanitz) setzten die Proben auch in Freilandversuchen ein.

6. Darstellung der erzielten Ergebnisse

Die ABiTEP GmbH sollte einen Produktionsprozess zur Herstellung von Sekundärmetaboliten von *Bacillus*-Stämmen optimieren, standardisieren und etablieren. Es sollte ausreichend Material den Projektpartnern zur Verfügung gestellt werden. Weiterhin ist ein vermarktbares, stabiles Produkt zu entwickeln gewesen.