

# **Monitoring soil fungal community structures and specific fungal biocontrol strains for ecological effect and fate studies used for risk assessment**

A dissertation submitted to  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

Kaspar Andreas Schwarzenbach

Dipl.-Biol., University of Zürich

born 29<sup>th</sup> June 1968

citizen of Rüslikon (ZH)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Emmanuel Frossard, examiner

Dr. Franco Widmer, co-examiner

Prof. Dr. Martin Loessner, co-examiner

2008

# Summary

---

Safe use of naturally occurring insect pathogens as biological control agents (BCA) of pest insects requires a risk assessment, which analyzes potential harm a BCA may cause to the environment. Risk assessment of a substance intentionally released to the environment is based on two key elements. i) Exposure of the environment to the substance. ii) Occurrence of undesirable effects caused by the substance.

Bacteria and fungi are dominant groups of soil organisms and are involved in soil functions such as nutrient recycling, degradation of xenobiotics or maintenance of soil structure. Microorganisms may therefore represent key determinants of soil functions. If presence of a BCA has an effect on the composition of microbial communities, this could also cause effects on natural soil functions. Furthermore, if these effects were negative and caused harm to an ecosystem, exposure to the BCA would pose a risk.

Monitoring of a BCA in soil or analyses of effects on non-target soil fungi are either time consuming or even impossible by use of established cultivation-dependent microbiological methods. One possible way to overcome these limitations can be the use of molecular genetic methods. The goal of this thesis was to evaluate and adapt molecular genetic methods for their use in risk assessments of BCAs in soil. The approach was based on analyses of a BCA in soil and co-occurring fungal communities, including i) development of a cultivation-independent monitoring tool for BCAs and ii) detection of possible effects of a BCA.

A BCA based on the fungus *Beauveria brongniartii* was chosen as an experimental system for this thesis, because this well established system allows to carry out field experiments. *B. brongniartii* is the most important pathogen of the European cockchafer, *Melolontha melolontha*, infecting both adults and larvae. The BCA consists of fungus colonized barley kernels (FCBK) and is applied to soils infested by *M. melolontha* larvae. *B. brongniartii* has a narrow host range and since the commercial introduction of FCBK in 1991, no negative effect on non-target organisms has been reported. However, there are no known analyses on possible effects of this BCA on soil fungal communities.

Spatial heterogeneity of fungal communities in the field could mask possible effects of a BCA. Therefore, a systematic approach was developed to derive a representative fungal community profile for an entire field. First, heterogeneity of fungal communities was assessed from ten different soil samples derived from a single grassland plot. Second, an increasing number of soil samples was mixed until representative profiles were derived.

For accurate and fast exposure analysis, a genotyping method previously developed to identify *B. brongniartii* isolates, was adapted for cultivation-independent use. Such, genotype-specific identification and also quantification of *B. brongniartii* are now possible directly from soil samples.

Possible effects of the *B. brongniartii* BCA on soil fungal communities were tested using soil microcosms amended with FCBK. The respective soil fungal communities were compared to communities in untreated controls and to communities exposed to dead *M. melolontha* larvae. At ten times the recommended dosage of the FCBK and under controlled conditions, small effects were detected in molecular genetic profiles

## Summary

representing changes in the composition of the soil fungal community. However, the high variability among profiles of replicated microcosms were observed and the effects caused by the BCA alone were very small when compared to effects caused by dead larvae.

Molecular genetic analyses were shown suitable tools to assess both exposure to the BCA tested and to assess effects on soil fungal communities. A reliable risk assessment of BCA in soil will further require methods to identify organisms possibly affected by a BCA, i.e. indicator organisms and assessment of their functions in a soil ecosystem.

# Zusammenfassung

---

Die sichere Anwendung natürlich vorkommender Krankheitserreger von Insekten als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel (engl. „biological control agent“ (BCA)) bedingt eine Risikoanalyse zur Abschätzung möglicher Schäden durch ein BCA in der Umwelt. Die Risikoanalysen von absichtlich in die Umwelt freigesetzten Substanzen basiert dabei auf zwei Kernelementen. i) Exposition der Umwelt gegenüber der Substanz. ii) Nicht erwünschte Effekte der Substanz in ihrer Umwelt.

Bakterien und Pilze machen den Grossteil der Biomasse im Boden aus. Sie beeinflussen z.B. Nährstoffkreisläufe im Boden, wandeln xenobiotische Stoffe um oder sind an Aufbau und Erhalt der Bodenstruktur beteiligt. Damit nehmen Mikroorganismen in Bodenökosystemen Schlüsselfunktionen ein. Sollte ein BCA die Häufigkeit von Mikroorganismen beeinflussen, könnten dadurch natürliche Funktionen des Bodens beeinträchtigt werden. In der Folge wären Schäden am betroffenen Ökosystem möglich, d.h. der untersuchte BCA könnte ein Umweltrisiko darstellen.

Untersuchungen über den Verbleib eines BCA im Boden oder die Analyse von Effekten eines BCA auf Bodenpilze sind mit herkömmlichen mikrobiologischen Methoden sehr zeitaufwändig oder gar nicht möglich. Demgegenüber versprechen molekulargenetische Methoden in diesen Punkten grosse Vorteile. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, bereits etablierte molekulargenetische Methoden auf ihre Verwendbarkeit in der Risikoanalyse von BCAs im Boden zu prüfen und gegebenenfalls anzupassen. Insbesondere sollten der Verbleib des ausgebrachten BCA und dessen möglichen Effekte auf Bodenpilze kultivierungsfrei untersucht werden.

Als experimentelles System wurde ein kommerzielles pilzliches Schädlingsbekämpfungsmittel gewählt. Neben Laborversuchen erlaubt dies auch die einfache Durchführung von Feldversuchen. *Beauveria brongniartii* ist der wichtigste Krankheitserreger des Europäischen Maikäfers, *Melolontha melolontha*, und befällt sowohl Adulte wie auch Larvenstadien (Engerlinge). Als BCA wird er in Form von mycelbewachsenen Gerstenkörnern (Pilzkörnern) in Böden mit Engerlingsbefall eingearbeitet. *B. brongniartii* zeichnet sich durch ein enges Wirtsspektrum aus, und seit der kommerziellen Markteinführung der Pilzkörner im Jahr 1991 wurden keinerlei Schäden an natürlichen Populationen von Nicht-Ziel-Organismen berichtet. Es bestehen jedoch keine Untersuchungen über die Auswirkungen dieses BCA auf die Gesellschaften von Bodenpilzen.

Die räumliche Heterogenität von Pilzgesellschaften in einem Feld könnte mögliche Effekte eines BCA maskieren. Deshalb wurde ein systematischer Ansatz entwickelt, um für ein ganzes Feld ein repräsentatives Profil der Pilzgesellschaften erstellen zu können. Dazu wurde zuerst die Heterogenität von zehn Bodenproben aus einer einzigen Wiesenparzelle verglichen. Anschliessend wurde die minimale Anzahl zu mischender Bodenproben bestimmt, bis die individuellen Anteile ausgeglichen waren.

Für eine sowohl exakte wie auch rasche Expositionsanalyse wurde eine bereits früher etablierte Methode zur Identifizierung von *B. brongniartii* Isolaten angepasst.

## Zusammenfassung

Damit lässt sich *B. brongniartii* nun kultivierungsunabhängig quantifizieren und *B. brongniartii* Genotypen lassen sich kultivierungsunabhängig ansprechen.

Um mögliche Effekte auf die Zusammensetzung von Pilzgesellschaften im Boden zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Kleinökosysteme verwendet. Mit Pilzkörnern behandelte Ansätze wurden einerseits mit BCA-freien Kontrollen, andererseits mit toten Engerlingen verglichen. Die Resultate zeigten bei zehnfach überhöhten Aufwandmengen schwache Effekte in der Zusammensetzung der molekulargenetisch untersuchten Pilzgesellschaften. Dabei zeigten sich in den Wiederholung, trotz kontrollierter Bedingungen, hohe Variabilitäten. Die erfassten Effekte des BCA alleine waren um ein vielfaches geringer als die durch tote Engerlinge verursachten Veränderungen der Pilzgesellschaften.

Molekulargenetische Untersuchungen mikrobieller Gemeinschaften können helfen, mögliche Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung von Mikroorganismen im Zusammenhang mit der Anwendung eines BCA zu erfassen. Genotypspezifische, kultivierungsunabhängige Nachweise erleichtern zudem die Zuordnung von Effekten zu einem bestimmten BCA und ermöglichen damit adäquate Expositionsstudien, welche die Beurteilung von Risiken ermöglichen. Weiter verlangen zuverlässige Risikoanalysen von biologischen Schädlingsbekämpfungsmitteln im Boden nach weiteren Methoden, um jene Pilze zu identifizieren, die durch das BCA möglicherweise beeinflusst wurden. Solche Indikatoren haben im Bodenökosystem bestimmte Funktionen. Allfällige Risiken einer BCA Freisetzung lassen sich allerdings erst abschätzen, wenn diese Funktionen ebenfalls bestimmt werden können.