

**Einsatz von Mikroorganismen zur Kupferreduktion bei der Bekämpfung
von Kraut- und Knollenfäule und falschen Mehлтаupilzen (Oomyceten)
im ökologischen Landbau**

EMKUREDÖL

Abschlussbericht

Förderkennzeichen: 33466/01 - 34
Laufzeit: 06.12.2016 – 05.12.2019
Berichtszeitraum: 06.12.2016 – 05.12.2019
Ausführende Stelle: Bio-Protect GmbH, Lohnerhofstraße 7, 78467 Konstanz
Projekträger: Deutsche Bundesstiftung Umwelt
An der Bornau 2, 49090 Osnabrück



Autoren: **Stefan Kunz, Maurice Schild, Sonja Weißhaupt, Armin Weiß,
Sarah Hornig-Schwabe, Monika Schwarz**

Konstanz, den 28.02.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Zielsetzung	6
3	Arbeitsschritte und Methoden	7
3.1	Arbeitsplan	7
3.2	Methoden	11
3.2.1	Verwendete Mikroorganismen	11
3.2.2	Tropfplattenverfahren zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE).....	13
3.2.3	Bestimmung der Phys-Chem Parameter	13
3.2.4	Verträglichkeit von 2H13 mit Biopräparaten.....	13
3.2.5	Tomatenblattscheibentest.....	14
3.2.6	Wirksamkeit gegen <i>Pectobacterium carotovorum</i> an Kartoffelscheiben.....	14
3.2.7	Gewächshausversuche <i>P. infestans</i> an Tomate	15
3.2.8	Gewächshausversuche <i>P. infestans</i> an Kartoffel	15
3.2.9	Phytokammerversuche <i>Pseudoperonospora cubensis</i> an Gurke.....	15
3.2.10	Phytokammerversuche <i>Plasmopara viticola</i> an Topfreben.....	16
3.2.11	Freilandversuche zur Bekämpfung von <i>P. infestans</i> an Kartoffel	16
3.2.12	Freilandversuche zur Bekämpfung von <i>P. viticola</i> an Weinreben	16
3.2.13	Apfeltest zur Prüfung synergistischer Wirkungen	17
3.2.14	Datenanalyse.....	17
4	Ergebnisse	18
4.1	AP2- Scale-up Produktionsverfahren	18
4.2	AP3-Qualitätskriterien	21
4.2.1	Etablierung der Methoden für die mikrobiologischen Parameter	21
4.2.2	Mikrobiologische Qualitätskontrolle der Pilotfermentation	23
4.2.3	Physikalisch und chemische Parameter	25
4.3	AP4-Lagerstabilität.....	27
4.4	AP5 – Biotests	32
4.4.1	Tomatenblattscheibentest.....	32
4.4.2	Tomatentopfpflanzen	33
4.4.3	Kartoffeltopfpflanzen.....	36
4.5	AP6 – Wirkmechanismus	39
4.5.1	Wirksamkeit von toten 2H13 Zellen	39

4.5.2	Einfluss von Kupfer bei der Produktion von 2H13	40
4.5.3	Einfluss von 2H13 auf die Regenfestigkeit von Kupferpräparaten	41
4.5.1	Etablierung von 2H13 auf Kartoffelblättern	44
4.6	AP7-Wirksamkeit in Pathosystemen.....	46
4.6.1	Klimakammerversuche gegen <i>P. cubensis</i> an Gurke.....	46
4.6.2	Klimakammerversuche gegen <i>P. viticola</i> an Topfreben.....	50
4.7	AP8-Integration in Spritzpläne	51
4.8	AP9-Stammcharakterisierung	53
4.9	AP10-Weitere Einsatzgebiete	57
4.9.1	Schwarzbeinigkeits an Kartoffeln (<i>Pectobacterium carotovorum</i>).....	58
4.9.2	Apfelschorf (<i>Venturia inaequalis</i>)	60
4.9.3	Lagerfäuleerreger im Kernobst	61
4.10	AP11-Pathogenität.....	62
4.10.1	Literaturstudie zur Pathogenität von <i>M. guilliermondii</i>	62
4.10.2	Clearance Studie in Ratten.....	65
4.11	AP12-Freilandversuche	66
4.11.1	Freilandversuche in Kartoffeln.....	66
4.11.2	Freilandversuche in Weinreben	70
5	Diskussion	74
6	Öffentlichkeitsarbeit	83
7	Fazit.....	84
8	Anhang.....	86
8.1	Abkürzungen	86
8.2	Abbildungsverzeichnis	87
8.3	Tabellenverzeichnis.....	89
8.4	Literatur	90

1 Zusammenfassung

In vorausgegangenen Forschungsprojekten wurde der Hefestamm 2H13 identifiziert, der die Wirksamkeit von geringen Kupfermengen bei Einsatz gegen Oomyceten verbesserte. Das Ziel des Forschungsvorhabens „EMKUREDÖL“ war die Entwicklung eines biotechnologischen Zusatzstoffes zu kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln auf Basis des Hefestammes 2H13, zur Verbesserung der Kupferwirkung bei Einsatz gegen Oomyceten (Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln, Rebenperonospora u.a.). Die Arbeiten wurden für 3 Jahre geplant und in 12 Arbeitspakete aufgeteilt. Das Scale-up des Produktionsverfahrens in den industriellen Maßstab wurde für den Hefestamm 2H13 von der Firma Agrano in Riegel erfolgreich durchgeführt. So konnten 50kg Hefegranulat produziert werden, die den vorläufigen Produktspezifikationen entsprachen und für weitere Versuche im Projekt zur Verfügung standen. Eine Clearance Studie an Ratten wurde bei CiToxLab durchgeführt. Die intraperitoneale Applikation von 2H13 führte zu keinerlei toxischen oder pathologischen Effekten in den Versuchstieren. Nach 3 Wochen war 2H13 weder im Bauchraum der Tiere noch in den Organen nachweisbar, so dass eine komplette Clearance erreicht wurde.

Die Qualitätskriterien für das 2H13 Präparat wurden definiert und die Methoden der Qualitätskontrolle festgelegt. Zur Qualitätskontrolle auf Fremdkeime wurde mit einem zertifizierten Labor kooperiert. Für die Nachweise aerober mesophiler Bakterien und mesophiler Hefen und Pilze wurde die Methodik weiter verbessert, so dass eine Nachweisgrenze von 800 Fremdkeimen/g möglich ist und die geforderten Nachweisgrenzen von $1E+03$ Pilzen/g bzw. $1E+05$ Bakterien/g eingehalten werden können. Zur Prüfung der Lagerstabilität der 2H13 Versuchschargen wurde in erster Linie die Lebendzellzahl an 2H13 nach Lagerung bei $8^{\circ}C$ überwacht. Die im Projekt produzierten Versuchspräparate waren in Abhängigkeit von der Restfeuchte zwischen 180 und 600 Tage lagerfähig. Das im Wirbelschichttrockner hergestellte Granulat V9 war 2 Jahre lagerstabil. Versuche bei $20^{\circ}C$ und $40^{\circ}C$ bestätigte die Abhängigkeit der Lagerstabilität von geringer Restfeuchte, so dass die Restfeuchte in Zukunft auf $<6\%$ reduziert wird. Auch die Verpackung hatte einen Einfluss auf die Lagerstabilität. In Kartonverpackungen war das Präparat weniger lagerstabil als in Plastikdosen. Die beste Lagerfähigkeit hatte 2H13 in verschweißten Aluminiumtüten, so dass diese als Verkaufsverpackung gewählt wird.

Versuche an Tomatenblattscheiben zeigten, dass für die Wirkungssteigerung der Kupferpräparate durch 2H13 lebende Hefezellen verantwortlich waren. Deshalb wurden die Mischbarkeit von 2H13 mit verschiedenen Pflanzenschutzmitteln, Additiven und Düngern anhand der Überlebensrate von 2H13 in Tankmischungen überprüft. Die Mischbarkeit von 2H13 mit den meisten Kupferpräparaten war dosisabhängig. Nicht nur der Reinkupfergehalt sondern auch die Formulierung des Präparats hatte Einfluss auf die Mischbarkeit. Auch die Mischbarkeit mit Insektiziden, Fungiziden, Additiven oder Dünger ist produktspezifisch und nicht

wirkstoffspezifisch. Für eine Anwendung im Feld müssen also detaillierte Anwendungsempfehlungen erarbeitet werden.

Testsysteme an Tomaten – und Kartoffeltopfpflanzen im Gewächshaus wurden zur Prüfung der Wirksamkeit von Mischungen aus 2H13 und Kupfer gegen *P. infestans* etabliert. An Tomaten wurde in 9 Versuchen der Wirkungsgrad gegen *P. infestans* von 0,1% Cuprozin progress durch Zugabe von 2H13 um durchschnittlich 7% signifikant erhöht und die Wirksamkeit von Bordoflow new wurde in 8 Versuchen durch Zugabe von 2H13 signifikant um 5% erhöht. An Kartoffeln wurde in 12 Versuchen der Wirkungsgrad von 0,1% Cuprozin progress durch Zugabe von 2H13 um durchschnittlich 17% signifikant erhöht. In Klimakammerversuchen an Gurkenpflanzen wurde in 15 Versuchen der Wirkungsgrad gegen *P. cubensis* von 0,01% Cuprozin progress durch Zugabe von 2H13 signifikant um durchschnittlich 21% und von 0,03% Cuprozin progress in 10 Versuchen signifikant um durchschnittlich 13% erhöht. Prüfungen zur Verbesserung der Regenfestigkeit von Kupferpräparaten durch 2H13 ergaben widersprüchliche Ergebnisse. An Tomaten- und Kartoffeltopfpflanzen ging der positive Effekt von 2H13 auf die Wirksamkeit niedriger Cuprozin progress Konzentrationen nach Beregnung verloren. Die Wirksamkeit einer niedrigen Bordoflow new Konzentration wurde durch 2H13 auch nach Beregnung tendenziell verbessert. An Gurken wurde die Wirksamkeit von 0,01% Cuprozin progress gegen *P. cubensis* durch Zugabe von 2H13 auch nach Beregnung mit 15 mm verbessert.

In 6 Freilandversuchen zur Bekämpfung von *P. infestans* in Kartoffeln, wurden insgesamt 17 Versuchsglieder mit Kombinationen aus 2H13 und Kupferpräparat im Vergleich zur entsprechenden Kupferdosierung getestet. Im Durchschnitt wurde die Wirkung des Kupferpräparates durch Zugabe von 2H13 tendenziell um 1,4% verbessert. Obwohl die Wirkungsverbesserung von Kupfer durch 2H13 sich nicht signifikant auf die Befallsentwicklung durch *P. infestans* auswirkte, wurden durch den Einsatz von 2H13 im Durchschnitt signifikant höhere Erntemengen erzielt. Im Mittel aus 17 Fällen wurde die Erntemenge signifikant um 7% im Vergleich zur jeweiligen Kupferbehandlung alleine erhöht. Bei einer Halbierung der Kupfermenge von 3 kg/ha auf 1,5 kg/ha könnte die Zugabe von 2H13 kostenneutral erfolgen. Die durch die Zugabe erreichte höhere Erntemenge führt also zu einem entsprechenden Mehrerlös.

In den Freilandversuchen im Weinbau zeigte sich ein Einfluss der Anwendungskonzentration von 2H13. In den 4 Versuchen, in denen ab 2018 0,06% 2H13 eingesetzt wurde, wurde die Wirksamkeit der Kupferbehandlung mit reduziertem Aufwand auf den Befall durch *P. viticola* durch die Zugabe von 2H13 bei Bonitur der Blätter tendenziell um 7% und bei Bonitur der Trauben signifikant um 23% verbessert. Sowohl der Blattbefall als auch der Traubenbefall wurde mit der Mischung aus reduziertem Kupfer und 2H13 genauso gut bekämpft wie mit der vollen Aufwandmenge an Kupfer. Der Zusatz von 2H13 zur Kupferbehandlung hat also Kupfereinsparungen von 33% bei gleicher Wirksamkeit ermöglicht.

2 Zielsetzung

Das Ziel des Forschungsvorhabens „EMKUREDÖL“ war die Entwicklung eines biotechnologischen Zusatzstoffes zu kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln, der eine Reduktion der Kupfermenge beim Einsatz gegen Oomyceten (Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln, Rebenperonospora u.a.) erlaubt.

Im vorausgegangenen Forschungsprojekt BIOTECHOOMY, das vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz bis Februar 2016 gefördert wurde, wurde der Hefestamm 2H13 identifiziert, der die Wirksamkeit von geringen Kupfermengen bei Einsatz gegen *Phytophthora infestans* an Tomatenblattscheiben, *Plasmopara viticola* an Topfreben und *Pseudoperonospora cubensis* an Gurkentopfpflanzen verbesserte (Kunz *et al.*, 2016a). Kupferpräparate haben gegen Oomyceten eine dosisabhängige Wirkung. Mit einer umweltpolitisch gewünschten Reduktion der Kupfermenge bei der Behandlung von Oomyceten nimmt die Wirksamkeit der Bekämpfungsmaßnahmen ab. Diese Abnahme der Wirksamkeit konnte teilweise durch die Zugabe des Hefestammes 2H13 zu niedrig dosierten Kupferbehandlungen ausgeglichen werden. Damit der Hefestamm 2H13 in der landwirtschaftlichen Praxis zur Kupferreduktion eingesetzt werden kann, musste er zu einem praxistauglichen Produkt weiterentwickelt werden. Das Produkt soll als Zusatzstoff zu Pflanzenschutzmitteln beim BVL gelistet werden und es mussten verlässliche Anwendungsempfehlungen für den ökologischen Anbau erarbeitet werden.

Der hier zu entwickelnde Zusatzstoff zu kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln soll an ökologisch produzierende Landwirte vermarktet werden, die Kartoffeln, Wein und Gemüse anbauen und Kupferpräparate zur Bekämpfung von Oomyceten einsetzen. Durch die Begrenzung der Kupfermenge pro Hektar ist die Bekämpfung der Krautfäule bei Kartoffeln oder der Rebenperonospora in niederschlagsreichen Gebieten schwierig. Durch den angestrebten Zusatzstoff, kann die zulässige Kupfermenge auf mehr Behandlungen verteilt werden und dadurch die Bekämpfung über einen längeren Zeitraum gewährleistet werden. Unter günstigen Witterungsbedingungen kann der Kupfereintrag durch die Zugabe des Zusatzstoffes ohne Risiko von Ernteverlusten unter die gesetzliche Höchstmenge reduziert werden.

Am Ende des Projektes sollte ein praxistauglicher, biologischer Zusatzstoff zu kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln zur Listung beim BVL und zur Vermarktung in Deutschland vorliegen.

3 Arbeitsschritte und Methoden

3.1 Arbeitsplan

Die geplanten Arbeiten wurden in 12 Arbeitspakete (AP) aufgeteilt und waren für 3 Jahre (12 Quartale) geplant (Tabelle 1).

Tabelle 1: Arbeits- und Zeitplan für EMKUREDÖL.

Nr.	Arbeitspaket	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12
1	Projektmanagement												
2	Scale-up Produktionsverfahren (Unterauftrag)												
3	Festlegung Qualitätskriterien und Entwicklung Qualitätskontrolle												
4	Lagerstabilität												
5	Biotests: P. infestans an Tomate und Kartoffel												
6	Wirkmechanismus												
7	Wirksamkeit in Pathosystemen- Klimakammer (Unteraufträge)												
8	Integration in Spritzstrategien im Ökoanbau												
9	Stammcharakterisierung												
10	Weitere Einsatzgebiete												
11	Pathogenität (Unterauftrag)												
12	Freilandversuche Kartoffel und Weinbau (teilw. Unteraufträge)												

Im **AP1-Projektmanagement** wurden die Arbeiten in den verschiedenen Arbeitspaketen koordiniert, die Ressourcenplanung, Berichterstellung, Abrechnung mit dem Projektträger durchgeführt, sowie Veröffentlichungen (siehe Glp. 6) und Informationsmaterial geplant und erstellt. Die Abrechnung mit dem Projektträger erfolgte vierteljährlich. Im Laufe des Projektes gab es leichte Verschiebungen zwischen den Teilbudgets. So wurden die geplanten Reisekosten nicht vollständig ausgeschöpft und bei den Freilandversuchen konnten im Vergleich zur Projektplanung günstigere Anbieter beauftragt werden, so dass auch hier Mittel frei wurden. Im Gegenzug erhöhte sich der Materialbedarf im Vergleich zur Planung, so dass hier mit Genehmigung des Projektträgers Mittel umgeschichtet wurden. Zum Projektende waren die genehmigten Mittel ausgeschöpft.

Der Zeitplan konnte nicht in allen Arbeitspaketen eingehalten werden. AP3 musste über das Q4 hinaus bis Q10 verlängert werden, da lange Zeit kein geeignetes Nährmedium zur Überprüfung auf bakterielle oder pilzliche Kontaminationen zur Verfügung stand. In AP7 wurden Versuche ins 3. Versuchsjahr verschoben, um die Möglichkeit der Prüfung von neuen Formulierungen von 2H13 offen zu halten. AP11 musste verlängert werden, da sich die in Auftrag gegebene Clearancestudie an Ratten bei Citoxlab deutlich verzögert hat. Insgesamt konnten die geplanten Arbeiten im Projektzeitraum durchgeführt werden. Pro Quartal wurde mindestens eine Besprechung mit den Arbeitspaketleitern zur Diskussion der Ergebnisse und Planung der weiteren Arbeiten durchgeführt. Dazwischen gab es bei Bedarf AP interne Meetings oder

Abspraken zwischen den einzelnen AP-Leitern. Die AP Leiter erstellten halbjährliche Zwischenberichte aus denen die Jahresberichte an den Projektträger und dieser Abschlussbericht zusammengefasst wurde.

AP2-Scale-up: In Arbeitspaket zwei sollte ein industrielles Produktionsverfahren für den Hefestamm 2H13 entwickelt werden. Die im Laborfermenter optimierten Bedingungen wurden in den industriellen Maßstab übertragen. Das Scale-up wurde von einem erfahrenen Biobackhefehersteller (Agrano GmbH & Co. KG, Riegel) im Unterauftrag durchgeführt. Anpassungen der Medienzusammensetzung mussten vorgenommen werden, um das Downstream Processing zu ermöglichen und die Trocknung wurde auf Wirbelschichttrockner umgestellt. Geplant waren vier Fermenterläufe mit anschließendem Downstream Processing in einer Pilotanlage (Abbildung 1). Mit dem Scale-up sollte ein standardisiertes Herstellungsverfahren entwickelt werden, um die Produktionskosten abschätzen und Wirtschaftlichkeitsberechnungen durchführen zu können. Die im Scale-up hergestellten Testpräparate standen für die Bearbeitung in den anderen Arbeitspaketen zur Verfügung.

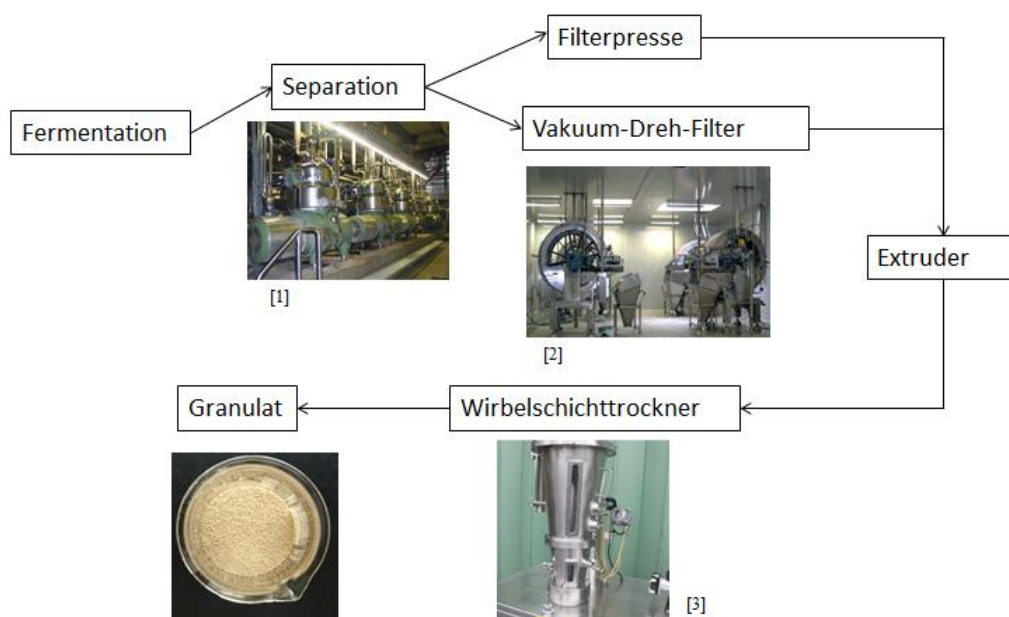


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Verfahrensschritte in der industriellen Produktion von Hefegranulat.

AP3-Festlegung Qualitätskriterien und Entwicklung Qualitätskontrolle: Die Notwendigkeit einer Spezifikation für technische Wirkstoffe leitet sich aus §15 Pflanzenschutzgesetz ab. Auf internationaler Ebene werden von der FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) Spezifikationen für Pflanzenschutzmittel vorgegeben (FAO/WHO, 2016). Diese Standards zur Untersuchung von Pflanzenschutzmitteln finden ihren

Niederschlag in den CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council) Methoden zur physikalisch-chemischen Untersuchung von Pflanzenschutzmitteln.

Bedingt durch den Herstellungsprozess bei Agrano wurden die gewonnenen Granulate von 2H13 zunächst auf die Eigenschaften als Wasserdispergierbares Granulat (WG-Formulierung) entsprechend der CIPAC-Richtlinien untersucht.

Die Qualitätskriterien für mikrobielle Kontaminationen wurden der OECD Richtlinie ENV/JM/MONO (2011) 43 entnommen. Danach darf die Gesamtmenge aerober Kontaminanten nicht höher als $1E+05$ KBE/g liegen. Weitere Einschränkungen gibt es für pilzliche Kontaminanten aufgrund möglicher Mykotoxine. Diese dürfen einen Wert von $1E+03$ KBE/g nicht überschreiten. Die Anwesenheit von pathogenen Keimen muss gänzlich ausgeschlossen sein. Das BVL gibt nur allgemeine Informationen über Kontaminationen in Pflanzenschutzmitteln. Diese dürfen nicht mehr als 1 g/kg betragen.

Mikrobiologische und physikalisch-chemische Produktparameter die für Wirksamkeit und Lagerstabilität verantwortlich sind, sollten im ersten Projektjahr definiert werden. Die Festlegung der Methoden zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle konnten im ersten Projektjahr nicht planmäßig abgeschlossen werden, da 2H13 auf vielen Standardmedien Kolonien bildet und so die Nachweisgrenze für bakterielle oder pilzliche Kontaminationen zu hoch war. Nach Verlängerung des Arbeitspakets bis Q10, konnten die Methoden zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle etabliert und auf die in den Pilotproduktionen produzierten Chargen (siehe AP1) angewendet werden.

AP4-Lagerstabilität: Zur Beurteilung der Haltbarkeit des Hefestammes 2H13 wurden Lagerversuche mit den aus dem Scale-up (AP2) gewonnenen Testpräparaten durchgeführt. Eine Produktcharge V9 wurde bei 8°C, 20°C und 40°C eingelagert, um Einflussfaktoren auf die Lagerung wie Trockenmasse oder Verpackung schneller zu erkennen. Auch der Einfluss von Vakuumverpackungen auf die Produktstabilität wurde untersucht. Die Lagerstabilität wurde im Wesentlichen über die Lebendzellzahl im Produkt definiert.

AP5-Biotests: Über den gesamten Projektzeitraum wurden Biotestsysteme unterhalten. Der Tomatenblattscheibentest war bereits etabliert (Kunz *et al.*, 2016a) und wurde bei speziellen Fragestellungen weiter verwendet. Zusätzlich wurden im Gewächshaus Testsysteme mit künstlicher Inokulation von Tomaten- oder Kartoffeltopfpflanzen mit *P. infestans* etabliert. Von diesen Systemen versprochen wir uns eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse aufs Freiland. Es konnten aber deutlich mehr Varianten geprüft werden als in Freilandversuchen. Verschiedene Kupferformulierungen und Dosierungen wurden in Mischungen mit den Testpräparaten geprüft, um die optimalen Kombinationen festzulegen. An Kartoffeltopfpflanzen

wurde die Regenfestigkeit der Testpräparate geprüft. Die Testsysteme wurden auch für die Erforschung des Wirkmechanismus (AP6) eingesetzt.

AP6-Wirkmechanismus: Für die Erarbeitung von Anwendungsempfehlungen und für die Listung als Zusatzstoff müssen Informationen zum Wirkmechanismus von 2H13 vorliegen. Im ersten Schritt wurde geprüft, ob für die Verbesserung der Kupferwirkung lebende Hefezellen notwendig sind oder ob auch tote Hefezellen diese Wirkung haben. Weiter wurde untersucht ob die Hefe durch Kupfer zur Bildung von wirksamen Metaboliten angeregt wird. Oder verbessert die Hefe die Kupferverteilung, die Regenfestigkeit und/oder die Aufnahme beim Pathogen? Wird das Pathogen durch Kupfer so geschwächt, dass 2H13 dann als Antagonist wirksam wird? In AP6 wurden Versuche dazu durchgeführt und die Wirksamkeiten in den Biotests (AP5) geprüft.

AP7-Wirksamkeit in Pathosystemen: Die Testpräparate von 2H13 aus dem Scale-up (AP2) wurden in den Pathosystemen Falscher Mehltau an Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) und Falscher Mehltau an Wein (*Plasmopara viticola*) geprüft. Ebenso verschiedene Kupferformulierungen mit unterschiedlichen Dosierungen in Kombination mit 2H13, um die maximale Kupfereinsparung mit minimalem Wirkungsverlust zu optimieren. Diese Versuche wurden im Unterauftrag am Julius-Kühn-Institut (JKI), Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt (Gurkenversuche) und am Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL) in Frick, Schweiz (Weinversuche) durchgeführt. Im Berichtszeitraum wurden fünf Versuche gegen Falschen Mehltau an Gurke und drei Versuche gegen Falschen Mehltau an Topfreben durchgeführt.

AP8-Integration in Spritzstrategien im Ökoanbau: Integration in praxisübliche Spritzprogramme des ökologischen Anbaus muss für den Zusatzstoff möglich sein. Geplant war die Verträglichkeit von 2H13 mit anderen Präparaten zu testen, die im ökologischen Anbau ebenfalls zum Einsatz kommen. Dazu gehören in den Zielkulturen eingesetzte biologische Pflanzenschutzmittel, biologische Zusatzstoffe, Pflanzenstärkungsmittel und Dünger. Die Verträglichkeit seitens des 2H13-Präparates wurde untersucht, indem die Überlebensrate der Hefe nach Mischung mit dem zu testenden Mittel ermittelt wurde.

AP9-Stammcharakterisierung: Stammspezifische Charakteristika des Hefestammes 2H13 wurden erarbeitet. Z.B. wurden Methoden zur Unterscheidung des Stammes von anderen Stämmen dieser Art etabliert. Das Arbeitspaket sollte planmäßig in Q5 beginnen. Erste Versuche wurden vorgezogen, da Selektivmedien, vor allem ein Nährmedium, in dem 2H13 nicht wächst, Bakterien aber wachsen können, für die Qualitätskontrolle (AP3) benötigt wurde. Zunächst wurden Selektivmedien gesucht, die zwischen den Arten *M. guilliermondii*, *S. cerevisiae* und *A. pullulans* unterscheiden. Im zweiten Schritt, sollten für Antimykotika, welche gegen 2H13 wirksam sind, Dosis-Wirkungskurven für verschiedene Stämme von *M. guilliermondii* erstellt werden, um stammspezifische Eigenschaften zu erhalten.

AP10-Weitere Einsatzgebiete: Die bisher beschriebenen Anwendungsgebiete für die Kombination Kupfer + 2H13 sollten erweitert werden. Dazu wurden Recherchen und Laborversuche in weiteren Pathosystemen durchgeführt. Die Etablierung neuer Labortestsysteme zur Überprüfung der Wirksamkeit von Kupfer +2H13 war geplant.

2H13 Präparate aus der Testproduktion (V9) wurden zur Prüfung der Wirkungsverbesserung von Cuprozin progress gegen den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* an mehrere Versuchsansteller für Gewächshaus und Freilandversuche gegeben. Die Versuche wurden im Rahmen eines im BÖLN geförderten Forschungsprojektes durchgeführt. Der Aufwand für die Versuche wurde nicht im EMKUREDÖL abgerechnet. Trotzdem wurden die Daten im AP10 gezeigt und diskutiert.

AP11-Pathogenität: Untersuchungen zur Pathogenität von 2H13 wurden bei CiToxLab, Veszprem, Ungarn in Auftrag gegeben. Geplant waren eine Clearancestudie an Ratten (intraperitoneal), sowie Studien zu akuter oraler Toxizität, akuter dermaler Toxizität und Hautreizung. Aufgrund der Wichtigkeit von Pathogenitätstests für die weitere Entwicklung von 2H13, wurde der Start der Clearancestudie vor die anderen Tests gestellt und nach Abstimmung des Studienplans mit CiToxLab dort beauftragt. Nach Evaluierung der Methode zur Rückisolierung von 2H13 aus den Rattenorganen, wurde die Studie im November 2018 gestartet. Im März 2019 lagen die Ergebnisse vor. Weitere Studien wurden aufgrund der Verzögerung nicht in Auftrag gegeben, da zu befürchten war, dass diese nicht innerhalb der Projektlaufzeit abgeschlossen sein würden.

AP12-Freilandversuche Kartoffel und Weinbau: Um die in den Klimakammerversuchen festgestellte Wirksamkeitsverbesserung von Kupferpräparaten durch den Zusatz des Hefestammes 2H13 in der Praxis nachweisen zu können, war es notwendig diese Ergebnisse in Freilandversuche an den Zielkulturen zu bestätigen. Geplant waren in den 3 Projektjahren jeweils zwei Freilandversuche zur Bekämpfung von *Phytophthora infestans* in Kartoffeln und *Plasmopara viticola* in Weinreben.

3.2 Methoden

3.2.1 Verwendete Mikroorganismen

Hefestämme verschiedener Arten (Tabelle 2) wurden für Wachstumsversuche im Vergleich zu 2H13 verwendet. Hefe-, Pilz- und Bakterienstämme verschiedener Arten (Tabelle 2) wurden zur Überprüfung von Selektivmedien in der Qualitätskontrolle verwendet.

Phytophthora infestans Stamm M16 wurde für die Inokulation der Tomatenblattscheibentests und der Toppflanzentest verwendet. M16 wurde dafür auf Gemüsesaft Agar kultiviert und wöchentlich umgesetzt. Aus den Kartoffelversuchsanlagen in Kleinmachnow und Donaueschingen wurden 3

weitere *P. infestans* Stämme von Kartoffelblättern isoliert. Bei Isolat K17 wurde die Artzugehörigkeit über ITS-Sequenzierung bestätigt.

Für die Biotests wurde zu Beginn der *P. infestans* Stamm M16, im weiteren Verlauf Stamm K17 und Ö18 verwendet. Zur Erhaltung der Pathogenität von *P. infestans* wurde alle drei Monate eine Passage über Kartoffelknollengewebe durchgeführt.

Tabelle 2: Herkunft und Art der verwendeten Mikroorganismen.

Stamm	Art	Herkunft
2H13	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Bio-Protect GmbH
CH780	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Agrano (Weinhefe)
CH771	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Agrano (Weinhefe)
DSM 6381	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	DSMZ
DSM 70051	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	DSMZ
DSM 70057	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	DSMZ
DSM 12249	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	DSMZ
Blossom Protect / Botector	<i>Aureobassidium pullulans</i>	Bio-ferm GmbH; Mischung aus zwei Stämmen; DSM14940 und DSM14941
BD 170	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC33608; JKI Inst. Biol. Pflanzenschutz, Darmstadt
HG 77	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Universität Konstanz
DSM 3586	<i>Xanthomonas campestris</i>	DSMZ
7.P.viridifl.	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	LTZ, Augustenberg
JKI-BI-6432	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	JKI Inst. Biol. Pflanzenschutz, Darmstadt
DSM498	<i>Escherichia coli</i> (apathogen)	DSMZ
Xilon WP	<i>Trichoderma asperellum</i>	Kwizda Agro GmbH
Prestop	<i>Clonostachys rosea</i>	Kwizda Agro GmbH
HSW-14-1	<i>Acremonium alternatum</i>	Bio-Protect GmbH
HSW-14-6a	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bio-Protect GmbH
HSW-14-6b	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	Bio-Protect GmbH
Bc 73 E	<i>Botrytis cinerea</i>	Bio-Protect GmbH
DSM 62841	<i>Penicillium expansum</i>	DSMZ DSM 62841
P. dig.	<i>Penicillium digitatum</i>	Bio-Protect GmbH
P. ita.	<i>Penicillium italicum</i>	Bio-Protect GmbH
M16	<i>Phytophthora infestans</i>	Universität Hohenheim
K17	<i>Phytophthora infestans</i>	Bio-Protect GmbH
Ö18	<i>Phytophthora infestans</i>	bio-ferm GmbH

3.2.2 Tropfplattenverfahren zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

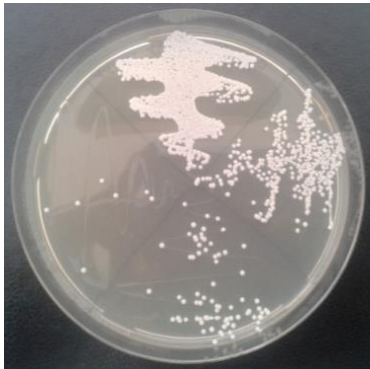


Abbildung 2: Agarplatte mit 2H13 Kolonien in verschiedenen Verdünnungsstufen nach 2 d auf YM-Agar.

Mit dem Tropfplattenverfahren (Baumgart, 1999) wurde die Anzahl an lebenden Hefezellen, bzw. Bakterienzellen in Zellsuspensionen, Kulturmedien, gefriergetrockneten Proben oder Granulaten bestimmt. Eine dezimale Verdünnungsreihe der Probe in einer sterilen Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,6 %) wurde hergestellt. Geeignete Nährböden wurden zuvor unter der Sterilbank getrocknet und die Agarplatten in vier gleich große Sektoren unterteilt. Pro Sektor wurden 50 µL einer Verdünnungsstufe ausplattiert und mit der Pipettenspitze verteilt. 2H13 Kolonien wurden nach zwei Tagen bei 25°C auf YM-Agar gezählt (Abbildung 2). Die Kolonien der Verdünnungsstufen, die zwischen 1 und 150 Kolonien aufwiesen, wurden gezählt. Die Berechnung der KBE pro Milliliter erfolgte nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (Baumgart, 1999).

3.2.3 Bestimmung der Phys-Chem Parameter

Bedingt durch den Herstellungsprozess bei Agrano wurden die gewonnenen Granulate von 2H13 zunächst auf die Eigenschaften als Wasserdispersierbares Granulat (WG-Formulierung) entsprechend der CIPAC-Richtlinien untersucht. Um ein Produkt als WG-Formulierung zulassen zu können sind die folgenden Untersuchungen notwendig: Persistent foaming MT 47.2; Wettability MT 53.3; Dry sieve MT 170; Dustiness MT 171; Dispersibility MT 174 (Dobrat & A., 2007); Attrition resistance MT 178.2; Suspensibility MT 184; Wet sieve MT 185 (Dobrat & Martijn, 2003); Acidity or Alkalinity MT 191 (Dobrat & Martijn, 2005).

3.2.4 Verträglichkeit von 2H13 mit Biopräparaten

1,2 g 2H13-Granulat (V9) wurden in 1 Liter Leitungswasser für eine halbe Stunde eingerührt. Dies entsprach nach Mischung mit dem Testpräparat einer Endkonzentration von 0,6 g/l bzw. der Anwendungskonzentration (AWK) von 0,06%. Die Testpräparate wurden in Leitungswasser doppelt konzentriert angesetzt und 1:1 mit der Hefesuspension gemischt. Als Kontrolle diente die 1:1 in Leitungswasser verdünnte Hefesuspension.

Die Ansätze wurden für 2 h bei Raumtemperatur und 300 rpm gerührt und anschließend wurde die KBE/ml im Tropfplattenverfahren bestimmt (siehe Glp. 3.2.2). Zur Erstellung der Verdünnungsreihen, wurden die Ansätze im jeweiligen Präparat verdünnt, so dass 2H13 verdünnt wurde, die Konzentration des Präparates in allen Verdünnungsstufen konstant blieb.

Aus dem Vergleich von 2H13 in Präparat mit 2H13 in Leitungswasser wurde der Wirkungsgrad des Präparats auf 2H13 berechnet und Präparate mit WG <40% wurden als mischbar eingestuft.

3.2.5 Tomatenblattscheibentest

Von Tomatenpflanzen der Sorte Hellfrucht Hilmar (Anzucht im Gewächshaus) wurden Blattfiedern abgeschnitten und mit dem Korkbohrer Blattscheiben im Durchmesser von ca. 1,8 cm ausgestochen. Jeweils 5 Blattscheiben wurden mit der Unterseite nach oben in eine Petrischale mit gut angefeuchtetem Papier gelegt. Für jedes Testpräparat wurden 4x fünf Blattscheiben vorbereitet.

Von mit *P. infestans* bewachsenen Agarplatten wurde eine Sporangiensuspension mit 1E+04 Sporangien/ml gewonnen. 2,5 ml Testpräparat (2x konzentriert) wurden mit 2,5 ml der Sporangiensuspension gemischt. Die Mischung wurde auf 4x je fünf Blattscheiben gleichmäßig aufgesprüht. Nach dem Sprühen verblieben die Blattscheiben noch für etwa 30 min in den feuchten Petrischalen und wurden anschließend auf Wasseragar gelegt und für 6-8 Tage bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Zur Auswertung des Tests wurden jeweils fünf Blattscheiben in Sarstedt Röhrchen mit 2,1 ml Leitungswasser gegeben und 3 s bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Aus der Suspension wurden 500 µl in die Kolkwitz-Zählkammer gegeben, die Sporangien in 10 Quadraten gezählt und die Sporangienzahl pro cm² Blattfläche berechnet.

3.2.6 Wirksamkeit gegen *Pectobacterium carotovorum* an Kartoffelscheiben

Kartoffeln der Sorte Prinzess wurden in 5 mm Scheiben gehobelt und mit einem Korkbohrer auf 18 mm Durchmesser gebracht. Die Kartoffelscheiben wurden 2 h in 0,6% NaCl Lösung vorinkubiert. Die Salzkonzentration der Lösung entspricht der physiologischen Salzkonzentration des Kartoffelgewebes, so dass es nach der Vorinkubation in 0,6 % NaCl Lösung bei Inkubation der Scheiben nicht zu einer Veränderung des Gewichts kommt, außer es liegt Befall durch das Pathogen vor. Die Scheiben wurden anschließend kurz antrocknen lassen, gewogen und in eine feuchte Kammer auf 0,6% NaCl getränkte Tücher gelegt. Je Versuchsvariante wurden 10 Kartoffelscheiben verwendet.

P. carotovorum wurde 48 h auf NB- Platten bei 20 °C angezogen, für die Inokulationssuspension in sterilem Wasser suspendiert und auf eine Konzentration von 2E+07 Zellen/ml eingestellt. Die zu untersuchenden Präparate wurden in doppelter Konzentration angesetzt.

Für die Inokulation wurden 200 µl *P. carotovorum* Suspension mit 200 µl Testpräparat bzw. Wasser gemischt, 15 min bei 20°C und 1400 rpm inkubiert und anschließend je 10 µl der Mischungen pro Kartoffelscheibe aufpipettiert. Als Kontrollen wurden Wasser sowie Streptomycinsulfat (Endkonzentration im Test 0,02%) und/oder Cuprozin progress (Endkonzentration im Test 0,28 %) verwendet.

Der Test wurde für 2 d bei 25°C in feuchter Kammer inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Wiegen der Kartoffelscheiben sowie durch Abschätzen der befallenen Flächen.

3.2.7 Gewächshausversuche *P. infestans* an Tomate

Tomatenpflanzen der Sorte Hellfrucht Hilmar wurden aus Samen gezogen und einzeln getopft. Bzw. veredelte Pflanzen der Sorte Sportivo wurden von der Peter Stader Jungpflanzen GmbH bezogen und einzeln getopft. Wenn mindestens 3 Blätter pro Pflanze ausgebildet waren, wurden die Tomatenpflanzen mit Testpräparaten behandelt (6 Pflanzen/Testpräparat), am nächsten Tag mit *P. infestans* (5E+03 Sporangien/ml) inokuliert und ca. 24 h in die Nebelkammer gestellt. Nach sieben Tagen wurde die erste Bonitur der Pflanzen durchgeführt. 14 Tage nach der Inokulation wurde die zweite Bonitur durchgeführt. Bei der Datenauswertung wurden Befallsstärke und Befallshäufigkeit berechnet, sowie die Fläche unter der Befallsentwicklungskurve (FUBK) ausgewertet.

3.2.8 Gewächshausversuche *P. infestans* an Kartoffel

An Kartoffeltopfpflanzen wurden mehrere Versuche zur Etablierung des Testsystems durchgeführt. Pflanzkartoffeln verschiedener Sorten (Sevim, Fasan und Marabel) wurden im Gewächshaus in Töpfen ausgelegt und bis zur Ausbildung von mindestens 3 Blättern kultiviert. Die Anzahl wurde auf sechs Pflanzen pro Variante festgelegt. Vor der Behandlung wurden die Topfpflanzen auf drei Blätter/Pflanze gestutzt. Die Behandlungen erfolgten in der Regel protektiv (24 h vor Inokulation). Inokuliert wurden die Pflanzen mit 2E+04 Sporangien/ml, anschließend wurden sie 24 h in der Nebelkammer feucht gehalten. Die erste Bonitur erfolgte ca. sieben Tagen nach der Inokulation, die zweite nach vierzehn Tagen. Bei der Datenauswertung wurden Befallsstärke und Befallshäufigkeit betrachtet, sowie die Fläche unter der Befallsentwicklungskurve (FUBK) ausgewertet.

3.2.9 Phytokammerversuche *Pseudoperonospora cubensis* an Gurke

Die Phytokammerversuche zur Wirksamkeit der Präparate gegen *P. cubensis* an Gurke wurden im Unterauftrag am JKI Institut für biol. Pflanzenschutz in Darmstadt durchgeführt. Die Gurkenpflanzen wurden einmal protektiv behandelt und einen Tag später inokuliert mit 7E+03 Sporangien/ml von *P. cubensis*. Die Befallsbonitur erfolgte 11 Tage nach der Inokulation, indem der prozentuale Befall mit *P. cubensis* an den behandelten Blättern je Pflanze ermittelt wurde. Die Mittelwerte des Befalls und Wirkungsgrade wurden mittels Excel für Windows berechnet.

Die Wirkungsgrade wurden nach Abbott (Abbott, 1925) bestimmt. Homogene Untermengen wurden mittels ANOVA nach Tukey-Test ($p < 0,05$) mit Winstat für Excel ermittelt.

3.2.10 Phytokammerversuche *Plasmopara viticola* an Topfreben

Die Phytokammerversuche zur Wirksamkeit der Präparate gegen *P. viticola* an Topfreben wurden im Unterauftrag am FiBL in Frick, Schweiz durchgeführt. Sämlinge der Sorte Chasselas mit je 3-4 Blättern wurden in einem automatischen Spritzkabinett mit den Präparaten behandelt und nach Abtrocknen der Spritzbrühe mit $4E+04$ Sporangien/ml von *P. viticola* inokuliert. Nach 24 h bei 100% rel. Luftfeuchte standen die Pflanzen 6 Tage bei 20°C und einem 16h/8h Tag/Nacht Rhythmus in der Phytokammer. Nach weiteren 24 h bei 100% rel. Luftfeuchte erfolgte die Auswertung der Symptome und Erfassung der Befallshäufigkeit und Befallsstärke.

3.2.11 Freilandversuche zur Bekämpfung von *P. infestans* an Kartoffel

Freilandversuche zur Regulierung der Kraut- und Knollenfäule (*P. infestans*) an Kartoffel wurden in Anlehnung an die EPPO Richtlinie PP 1/2 (4) durchgeführt. Randomisiertes Blockdesign mit vier Wiederholungen je Versuchsglied. 6 bis 10 Behandlungen je nach Witterung und Standort. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur vollen Kupferaufwandmenge (bis 3 kg Reinkupfer pro ha und Jahr) wurden reduzierte Kupferaufwandmengen mit und ohne Zugabe von 2H13 eingesetzt. Die Befallsstärke wurde ab Ende Juni wöchentlich am Blatt bonitiert. Der prozentuale Befall wurde für jede Parzelle erhoben und daraus die Fläche unter der Befallsentwicklungskurve (FUBK) für jeder Parzelle berechnet. Während der Kartoffelernte wurden die Erntemengen in den Parzellen erfasst.

3.2.12 Freilandversuche zur Bekämpfung von *P. viticola* an Weinreben

Freilandversuche zur Bekämpfung von *Plasmopara viticola* im Weinbau wurden in Anlehnung an die EPPO-Richtlinie PP1/031 (3) durchgeführt. Randomisiertes Blockdesign mit vier Wiederholungen je Versuchsglied. Zwischen Mai (BBCH 16) und August (BBCH 81) erfolgten 8 bis 10 Behandlungen mit den Versuchspräparaten. Neben einer unbehandelten Kontrolle, einem chemischen Standard, der Standardkupferbehandlung von ca. 3,0 kg/ha Reinkupfer wurden wo möglich auch eine reduzierte Kupfervariante von ca. 2,0 kg/ha Reinkupfer gemäß den Richtlinien der ECOVIN durchgeführt. Begleitmaßnahmen zur Bekämpfung von Oidium erfolgten über alle Parzellen. Als projektrelevante Prüfglieder wurden Kombinationen aus 2H13 und verschiedenen Kupferdosierungen beauftragt.

Zu jeweils zwei bis drei Terminen Ende des Traubenschlusses (BBCH 79) und Reifebeginn (BBCH 81) erfolgte die Bonitur des Blattbefalles und des Fruchtbefalles, bei denen sowohl Befallshäufigkeit und Befallsstärke erhoben wurden. Der prozentuale Befall wurde für jede Parzelle erhoben und daraus die Fläche unter der Befallsentwicklungskurve (FUBK) für jede Parzelle berechnet.

3.2.13 Apfeltest zur Prüfung synergistischer Wirkungen

In Versuchsansätzen in Apfelwunden wurde der additive bzw. synergistische Effekt von 2H13 mit Fungiziden bzw. Düngern gegen verschiedene Lagerfäuleerreger geprüft.

Die Äpfel (Sorte Topaz oder Jonagold) oder Birnen (Sorte Conference) wurden für ca. 3 min in 70%-igen Ethanol desinfiziert bevor sie in vier gleich große Segmente eingeteilt wurden. Auf der äquatorialen Ebene jeden Apfels wurde in jedem der vier Segmente mit einer Pipettenspitze eine Wunde mit einem Durchmesser von 0,3 cm gestochen, in welche von vier verschiedenen Ansätzen je 10 µl pipettiert wurden (Abbildung 3).

Für den Versuch wurden pro Präparat 2x6 Äpfel verwendet. Zur Auswertung wurden die Faulstellendurchmesser für jede Wunde bestimmt. Die Auswertung erfolgte, wenn die Faulstellen in den Kontrollen deutlich sichtbar waren. Für die verschiedenen Pathogene ergaben sich so unterschiedlich lange Inkubationszeiten. Die Faulstellendurchmesser jeder Behandlung wurden gemittelt und anhand der Mittelwerte wurden die Wirkungsgrade der Behandlungen berechnet. Der Synergismusfaktor wurde nach Colby (Colby, 1967) berechnet und nach Lima et al. (Lima *et al.*, 2005) interpretiert.



Abbildung 3: Zwei Apfelhälften eines durchgeschnittenen Apfels mit vier Wunden auf der äquatorialen Ebene 6 Tage nach der Inokulation bei 20°C gelagert.

Von links nach rechts: *Botrytis cinerea*; *B. cinerea* + 2H13; *B. cinerea* + Fungizid; *B. cinerea* + Fungizid + 2H13.

3.2.14 Datenanalyse

Wirkungsgrade wurden aus den gemittelte Befallswerten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Abbott (Abbott, 1925) berechnet.

Statistische Analysen: In Blattscheibentests, Gewächshaus-, Phytokammer- und Freilandversuchen wurden die prozentualen Befallswerte (Befallsstärke, Befallshäufigkeit) oder FUBK aus den Wiederholungen einer Variante gemittelt und der jeweilige Datensatz mit

Bartlett's Test auf Homogenität der Varianzen geprüft. Bei homogenen Varianzen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Mittelwertsvergleich mit Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$) durchgeführt. Bei inhomogenen Varianzen wurden die Daten einer Wurzeltransformation unterzogen und die transformierten Werte erneut mit Bartlett's Test auf Homogenität der Varianzen geprüft. Waren diese weiterhin inhomogen, erfolgte eine nicht parametrische Varianzanalyse nach Kruskal Wallis mit anschließendem Mittelwertsvergleich mit Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

Für die Metaanalyse wurden die Wirkungsgrade der FUBK mittels gepaartem T-test verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 AP2- Scale-up Produktionsverfahren

Das in vorherigen Arbeiten angewandte Gefriertrocknungsverfahren (Kunz *et al.*, 2016b) zum Trocknen der Hefe ist für die Großproduktion nicht wirtschaftlich. Um die Hefezellen beim Gefriertrocknungsprozess zu schützen und höhere Überlebensraten zu erzielen, wurde die Hefe bisher mit Magermilchpulver und Saccharose formuliert. Im Scale-up Prozess wurde die Trocknung der Hefe mit dem Wirbelschichttrockner durchgeführt und auf die Formulierung mit Magermilchpulver und Zucker verzichtet. Im Projekt wurden fünf Pilotfermentationen durchgeführt. Eine Übersicht der dabei hergestellten Versuchspräparate findet sich in Tabelle 3.

Die erste Pilotfermentation wurde im Dezember 2016 im 3000 l Fermenter durchgeführt. Als Medium wurde das im Labormaßstab optimierte Melassemedium verwendet. Die Produktion im Fermenter verlief reibungslos. Probleme traten beim Downstream processing vor allem beim Extrudieren auf. Mit der Filterpresse konnte die Hefesuspension nicht genügend aufkonzentriert werden, um sie ohne Vortrocknen in den Extruder zu geben. 2H13 hatte eine Trockensubstanz (TS) von ca. 12%, die Ziel TS liegt bei ca. 23%. Daraufhin wurde der Vakuumdrehfilter ausprobiert, die filtrierte Hefe hatte eine TS von 48%, was im Vergleich zur Backhefe sehr hoch war (Backhefe ca. 32-35%). Trotzdem fühlte sich die Hefe noch sehr feucht und matschig an und musste vor dem Extrudieren erneut im Wirbelschichttrockner vorgetrocknet werden. Im Extruder wurde die Hefe bereits nach kurzer Zeit sehr hart und verklumpte so stark, dass weiteres Extrudieren nur mit Reinigung des Extruders und hohem zeitlichen Aufwand verbunden war. Als erstes Muster für das Hefegranulat konnten dadurch ca. 400 g produziert werden. Im industriellen Maßstab ist das Vortrocknen nicht möglich und das Verstopfen der Lochscheibe des Extruders ein großes Problem. Agrano schlug deshalb einen Medienwechsel vor, weil dieser ungewöhnliche Effekt evtl. durch die Bildung von Metaboliten erklärbar sein könnte. Ein weiterer Vorteil, der laut Agrano für einen Medienwechsel sprach, war die höhere Nährstoffkonzentration im neuen Medium.

Ein Teil der Ernte wurde zum Vergleich bei der Bio-Protect nach standardisierten Methoden (Labormaßstab) aufgearbeitet, d.h. zentrifugiert, mit Magermilchpulver und Saccharose (MPS) formuliert, eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

In Pilotfermentation 2 wurde 2H13 im Hefeextrakt-Glukose-Medium im 50 l Fermenter angezogen. Es ging dabei v. a. um das Wachstum der Hefe und um die Auswirkungen des Medienwechsels auf die Wirksamkeit der Hefe in Kombination mit Kupfer gegen Oomyceten. Für Versuche, ob sich die Hefe problemlos extrudieren lässt, war die Menge zu gering. Die Ernte wurde bei Agrano zentrifugiert und bei der Bio-Protect mit MPS formuliert und gefriergetrocknet.

Nach Bestätigung der Wirksamkeit des Hefepräparates aus Pilotfermentation 2 wurde die dritte Pilotfermentation in Auftrag gegeben. Hierbei ging es um die Maßstabsvergrößerung in den 3000 l Fermenter mit dem neuen Medium und das anschließende Downstream processing zur Herstellung von Hefegranulat. Die Fermentation verlief erfolgreich und die erwünschte Keimzahl im Granulat von durchschnittlich $5E+10$ KBE/g konnte erreicht werden.

Die Separation erfolgte im Vakuumdrehfilter. Vor dem Extrudieren musste die Hefe erneut vorgetrocknet werden. Im Extruder selbst klumpte die Hefe erneut sehr stark. Daraufhin wurde eine neue Lochscheibe eingesetzt, die den Extrudiervorgang ohne Verklumpen der Hefe möglich machte. Präparate 1-3 stammen aus verschiedenen Trocknungsdurchgängen. Im letzten Trocknungsdurchgang (Präparat 3) gelang es nicht die Restfeuchte weiter zu verringern, so dass die höchste TS bei 90,9% lag (Tabelle 3). Ein Teil der Ernte wurde zum Vergleich wieder nach standardisierten Methoden aufgearbeitet (Präparat 170327 MPS, V8).

Die vierte Pilotfermentation wurde in der Produktionsanlage im August 2017 durchgeführt. Die Filtration gestaltete sich erneut schwierig, konnte aber durchgeführt werden, so dass am Ende der Produktion ca. 50 kg Trockenhefe mit einer Restfeuchte von 7,9% zur Verfügung stand (V9). Ein Teil der Hefe wurde in Aluminiumbeuteln zu je 250 g bzw. 100 g mit und ohne Vakuum verpackt. 100 ml der Ernte wurden zum Vergleich wieder nach standardisierten Methoden aufgearbeitet (Präparat 170823 MPS).

Da sich eine geringe Restfeuchte positiv auf die Lagerstabilität (siehe AP4) auswirkte, wurde weiteres Produkt dieser Charge durch die Firma Agrano nachgetrocknet. Als Vergleich diente Produkt, das bis zum Nachrocknungsprozess bei Agrano gelagert wurde (8 °C).

Die fünfte Pilotfermentation wurde bei Agrano im April 2019 im 3000 l Fermenter durchgeführt. In dieser Produktion wurde das Medium gewechselt um zu prüfen, ob sich dadurch eine Verbesserung der Wirksamkeit erzielen lässt. Die Hefe wurde in 10 % Melasse und 5% Hefeextrakt ca. 20 h bei 30-32 °C produziert. Die Melasse wurde im Batch Verfahren zudosiert. Die Hefe musste gewaschen werden, um filtriert werden zu können. Am Ende standen 100 g

Hefepräparat mit einer Trockensubstanz von ca. 90% (V10) und 600 g Präparat mit einer Trockensubstanz von ca. 94% (nachgetrocknetes Produkt V11) zur Verfügung. Die Start Keimzahl lag bei ca. 5E+10 KBE/g. Die interne Qualitätskontrolle zeigte eine Kontamination mit Fremdkeimen von ca. 7,8 E+05 KBE/g. V11 wurde daraufhin von Novum Analytik auf Fremdkeime untersucht. Es wurden ca. 4E+05 KBE/g Fremdkolonien gefunden, darunter auch Enterobakterien.

Laut Agrano kann die Kontaminationswahrscheinlichkeit in der Produktionsanlage minimiert werden. Trotzdem wurde die Verwendung des Melassemediums für die industrielle Produktion nicht empfohlen, da der Aufwand durch die notwendigen Waschschrte größer wird. Da sich in den Wirksamkeitsversuchen kein Vorteil von V11 im Vergleich zu V9 ergab (AP7), und auch die Dispersibility und Wettability in V11 schlechter war, wird das Produktionsverfahren in Zukunft nach den Vorgaben der 4. Pilotfermentation durchgeführt.

Tabelle 3: Übersicht der Präparate aus den Pilotfermentationen. MPS: Magermilchpulver + Saccharose. n.b.: nicht bestimmt.

Pilotfermentation (Lot:)	Bez.		Aufarbeitung und Formulierung	Medium	Start cfu/g	TS in %
1 (161208)	V2	MPS	Gefriergetrocknet mit 10% Magermilchpulver + 10% Saccharose	Melasse	3,0E+10	98,2
	V3	Präparat	Wirbelschichttrockner		8,0E+09	89,5
2 (170125)	V4	MPS	Gefriergetrocknet mit 10% Magermilchpulver + 10% Saccharose	Hefeextrakt	5,0E+10	97,5
3 (170327)	V5	Präparat 1	Wirbelschichttrockner	Hefeextrakt	6,0E+10	89,7
	V6	Präparat 2	Wirbelschichttrockner		4,0E+10	90,4
	V7	Präparat 3	Wirbelschichttrockner		3,0E+10	90,9
	V8	MPS	Gefriergetrocknet mit 10% Magermilchpulver + 10% Saccharose		3,0E+10	91,4
4 (170823)		MPS	Gefriergetrocknet mit 10% Magermilchpulver + 10% Saccharose		4,0E+10	n. b.
	V9	Präparat	Produktionstrockner	Hefeextrakt	8,0E+10	92,1
		nachgetrocknet 16.01.2018	Produktionstrockner, Wirbelschichttrockner		9,2E+10	93,9
		nachgetrocknet 02.02.2018	Produktionstrockner, Wirbelschichttrockner		8,9E+10	94,4
		nachgetrocknet KW28/2018	Produktionstrockner, Wirbelschichttrockner		8,6E+10	95,1
		Lagerung bei Agrano bis KW28/2018	Produktionstrockner		8,6E+10	92,5
5 (190430)	V10	Präparat	Wirbelschichttrockner		Melasse,	4,2E+10
	V11	Präparat nachgetrocknet		Hefeextrakt	5,7E+10	93,6

In AP2 konnte ein industrielles Produktionsverfahren für die Hefe 2H13 entwickelt werden, so dass es nun möglich ist ein Hefegranulat mit der verlangten Keimzahl von mind. 5×10^{10} KBE/g und einer Restfeuchte unter 6% zu produzieren. Eine Preiskalkulation zur Produktion von 2H13 im industriellen Maßstab wurde von Agrano vorgelegt. Unter Berücksichtigung der Margen für Bio-Protect GmbH als Hersteller und für Zwischenhändler wird ein Endverbraucherpreis von ca. 100 EUR/kg angestrebt.

4.2 AP3-Qualitätskriterien

4.2.1 Etablierung der Methoden für die mikrobiologischen Parameter

Die Lebendzellzahl von 2H13 im Produkt wurde mit dem Tropfplattenverfahren bestimmt (siehe 3.2.2). Einige bakteriellen Kontaminationen konnten mit Standardmethoden im zertifizierten Labor Novum Analytik in Neckarsulm untersucht werden.

Probleme gab es aber beim Nachweis der aeroben mesophilen Bakterien. Hier wird routinemäßig Cycloheximid im Agar verwendet, um Hefen und Pilze am Wachstum zu hindern. 2H13 ließ sich aber mit den verwendeten Konzentrationen nicht vollständig hemmen, so dass auf den Platten ab bestimmten Konzentrationen ein Hintergrund aus 2H13 blieb, in dem man Bakterien nicht erkennen konnte. Die Nachweisgrenze für Bakterien lag mit 1×10^5 KBE/g noch vergleichsweise hoch. In AP9 wurde Fluconazol als geeigneter Wirkstoff beschrieben um das Wachstum von 2H13 stark zu inhibieren ohne das Wachstum von Weinhefen und Bakterien einzuschränken. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde die folgende Methode zur Qualitätskontrolle von 2H13 Präparaten entwickelt (Schild, 2019):

50 µl einer 2H13 Suspension (1 g in 40 mL 0,6% NaCl gerührt für 30 min bei 400 rpm) werden mit einem Drigalskispatel auf einer ganzen YM + 0,35% Fluconazol Agarplatte verteilt. Dies wird in einer Doppelbestimmung durchgeführt und die Platten für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Der Mittelwert an sichtbaren Kolonien von beiden Platten multipliziert mit dem Faktor 800 ergibt die Anzahl der KBE/g. Falls keine Kolonie sichtbar ist, liegt die Zahl der Kontaminationen unter der Nachweisgrenze von 800 Bakterien pro Gramm Produkt und unterhalb der Grenzen für Bakterien und Pilze. Ist mehr als eine Kolonie sichtbar, muss zwischen der Art der Kontamination unterschieden werden. Bei mehr als 125 Kolonien ist die Grenze sowohl für pilzliche als auch bakterielle Kontaminationen überschritten.

Eine Unterscheidung pilzlicher und bakterieller Kontaminationen ist auf einem Agar mit Antibiotikum und 0,35% Fluconazol (zum Beispiel YGC-Agar) möglich. Entweder einzelne Kolonien vom YM-Agar können auf diesen überimpft werden oder erneut 50 µl der 2H13 Suspension ausplattiert werden. Auf diesem Agar können nur noch pilzliche Kontaminationen wachsen.

Eine Unterscheidung bakterieller Kontaminationen ist auf MacConkey-Agar mit 0,35% Fluconazol möglich. Auf diesem können keine gram-positive Bakterien wachsen. Gram-negative Bakterien können aufgrund der Koloniefarbe in Laktose-positiv (rot) und Laktose-negativ (weis/creme) eingeteilt werden. Gram-negative Bakterien die leuchtend rote Kolonien die den Agar um sich herum entfärben, können aus der Familie der *Enterobacteriaceae* stammen und auf fäkale Verunreinigungen hindeuten. Es können ebenfalls entweder einzelne Kolonien vom YM-Agar überimpft werden oder erneut 50 µl der 2H13 Suspension plattiert werden.

Tabelle 4: Wachstum von Mikroorganismen auf YM-Agar und MacConkey-Agar mit 0,35% Fluconazol.

++ = Wachstum wie in Kontrolle; + = reduziertes Wachstum; - = kein Wachstum; nb = nicht bestimmt.

Mikroorganismus	Wachstum auf YM + 0,35% Fluconazol	Wachstum auf MacConkey + 0,35% Fluconazol
2H13 (<i>M. guilliermondii</i>)	-	-
Botector (<i>A. pullulans</i>)	-	-
CH780 (<i>S. cerevisiae</i>)	+	+
CH771 (<i>S. cerevisiae</i>)	++	+
<i>Trichoderma asperellum</i>	-	-
<i>Clonostachys rosea</i>	nb	+
HSW-14-1 (<i>Acremonium alternatum</i>)	++	++
HSW-14-6a (<i>Cladosporium cladosporioides</i>)	++	++
HSW-14-6b (<i>Acremonium sclerotigenum</i>)	++	++
Bc 73 E (<i>Botrytis cinerea</i>)	-	-
DSM 62841 (<i>Penicillium expansum</i>)	++	+
<i>Penicillium digitatum</i>	+	-
<i>Penicillium italicum</i>	-	-
BD 170 (<i>Bacillus subtilis</i>)	++	- (gram positiv)
HG 77 (<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>)	++	- (gram positiv)
DSM 3586 (<i>Xanthomonas campestris</i>)	++	++
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	++	++
JKI-BI-6432 (<i>Lysobacter enzymogenes</i>)	++	++
DSM498 (<i>E. coli</i>)	nb	++

Zur Evaluierung der Methode wurden im Labor der Bio-Protect vorhandene Hefe-, Pilz- und Bakterienisolate auf YM + 0,35% Fluconazol und auf MacConkey + 0,35% Fluconazol ausgestrichen (Tabelle 4). Alle getestete Bakterienstämme wuchsen auf YM + 0,35% Fluconazol und könnten somit als Kontaminationen in 2H13 Granulaten nachgewiesen werden. Wie erwartet wuchsen die gram positiven Bakterien nicht auf MacConkey + 0,35% Fluconazol. Bei den Hefen und Pilzen gab es einige Stämme, die nicht auf den Medien mit 0,35% Fluconazol wuchsen (z.B. *A. pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma asperellum*) und die somit in der Qualitätskontrolle nicht als Kontaminationen erkannt werden würden bzw. nur bei hoher Konzentration in der Lebendzellzahl-Bestimmung detektiert werden würden.

Zur Untersuchung möglicher Kontaminationen durch *Candida albicans* werden 50 µl der 2H13 Suspension auf „Brilliance Candida“ Agar plattiert und bei 37°C für 2 Tage inkubiert. 2H13 wird nicht wie bei den anderen Platten durch das Fluconazol gehemmt. Die blaue Kolonie des *C. albicans* sind dennoch auch in kleiner Zahl gut sichtbar.

4.2.2 Mikrobiologische Qualitätskontrolle der Pilotfermentation

Die 2H13 Chargen aus den Pilotfermentationen von Agrano und aus der Gefriertrocknung enthielten zwischen 8E+9 KBE/g und 8E+10 KBE/g, wobei die höchste Zellzahl in der 4. Pilotproduktion im großen Industrietrockner erreicht wurde. Das Produkt soll in Zukunft mit einer Zellzahl von nominal 5E+10 KBE/g produziert werden. Die letzten Pilotproduktionen hatten eine Lebendzellzahl von 8E+10 KBE/g (Charge 170823 V9) und 5·E+10 KBE/g (Charge 190430 V10 und V11) (Tabelle 5).

Während in V9 in den Analysen von Bio-Protect keinerlei Kontaminationen zu finden waren, wurden in der Qualitätskontrolle aus der Charge V10 und der nachgetrockneten Variante V11 auf drei Wiederholungen (YM Agarplatten mit 0,35% Fluconazol) jeweils deutlich mehr als 125 Kolonien mit verschiedenartigem Aussehen gezählt (Abbildung 4; links).

Auf YGC Agar-Platten mit 0,35% Fluconazol, welcher zusätzlich das Wachstum von Bakterien aufgrund des enthaltenen Chloramphenicols unterdrückt, konnten keine Kontaminationen entdeckt werden (Abbildung 4; Mitte). Es handelte sich also um bakterielle Kontaminationen. Mit 9,1E+5 KBE/g für V10 und 6,5E+5 KBE/g für V11 lagen die Zahlen der bakteriellen Kontaminationen beider Chargen über dem Grenzwert von 1E+5 KBE/g. Auf MacConkey Agarplatten mit 0,35% Fluconazol ließen sich diese bakteriellen Kontaminationen weiter unterscheiden. Diese wurden bei 37°C inkubiert, sodass nur gram-negative mesophile Bakterien wachsen konnten. Anhand der Koloniefarbe und -form konnte zwischen Lactose-positiv (rote Kolonien) und Lactose-negativ (nicht rote Kolonien) und coliforme (leuchtend rote Kolonien mit Entfärbung des Agars) und nicht-coliforme Kontaminanten unterschieden werden (Abbildung 4).

Proben der Charge V9 und V11 wurden zusätzlich, zum direkten Vergleich, in einem zertifizierten Analyselabor (Novum Analytik) auf Indikatororganismen untersucht (Tabelle 5). Die Anzahl der Indikatororganismen lag in beiden Chargen jeweils unter der Bestimmungsgrenze. Allerdings wurde nur die Anwesenheit von *Escherichia coli* untersucht und nicht die Anwesenheit von coliformen Bakterien.

Tabelle 5: Ergebnisse der mikrobiologischen Qualitätskontrolle in den 2H13 Versuchspräparaten.

nb= nicht bestimmt.

Parameter	(Labor)/Methode	Einheit	2H13 V9	2H13 V10	2H13 V11
Konzentration 2H13	(Bio-Protect) Tropfplattenverfahren	KBE/g	8E+10	5E+10	5E+10
Kontaminationen gesamt	(Bio-Protect) YM-Agar + 0,35% Fluconazol, 2 Tage bei 25°C	KBE/g	< 800	9,1E+5	6,5E+5
Kontaminationen Pilze	(Bio-Protect) YGC-Agar + 0,35% Fluconazol, 2 d bei 25°C	KBE/g	< 800	< 800	< 800
Kontaminationen gram-negative Bakterien	(Bio-Protect) MacConkey-Agar + 0,35% Fluconazol, 2 d bei 37°C	KBE/g	< 800	4,6E+5	3,7E+5
-davon Lactose-positiv	(Bio-Protect) MacConkey-Agar + 0,35% Fluconazol, 2 d bei 37°C	KBE/g	< 800	4,0E+5	3,0E+5
-davon Lactose-positiv und coliform	(Bio-Protect) MacConkey-Agar + 0,35% Fluconazol, 2 d bei 37°C	KBE/g	< 800	1,12E+4	7,2E+3
-davon Lactose-negativ	(Bio-Protect) MacConkey-Agar + 0,35% Fluconazol, 2 d bei 37°C	KBE/g	< 800	5,72E+4	1,48E+4
Aerobic mesophilic plate count	(Novum) PC-Agar with Actidion, 30°C, 72 h	KBE/g	1,7E+4	nb	4,2E+5
<i>Escherichia coli</i>	(Novum) FDA BAM Chapter 4	In 1 g	abwesend	nb	abwesend
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Novum) MFHPB-21	In 1 g	abwesend	nb	abwesend
Yeasts	(Novum) Chromogenic Nutrient-Agar, 25°C, 72 h	KBE/g	< 100	nb	< 100
<i>Candida albicans</i>	(Novum) Chromogenic Nutrient-Agar, 25°C, 72 h	KBE/g	< 100	nb	< 100

Parameter	(Labor)/Methode	Einheit	2H13 V9	2H13 V10	2H13 V11
Moulds	(Novum) FDA BAM Chapter 18 (DRBC, 25°C, 5 Tage)	KBE/g	< 100	nb	< 100
Salmonella	(Novum) FDA BAM Chapter 5	In 25 g	abwesend	nb	abwesend
Listeria monocytogenes	(Novum) FDA BAM Chapter 10	In 25 g	abwesend	nb	abwesend

Die Gesamtzahl der aeroben mesophilen Mikroorganismen lag auch in dieser Analyse mit 4,2E+5 KBE/g für V11 um das 25 fache höher als V9. Dieser Wert entspricht ungefähr der von Bio-Protect entdeckten Gesamtkontamination.

Um die Art der Kontaminationen bestimmen zu können, wurden einzelne Kolonien isoliert, die DNA mit bakterienspezifischen Primern in einer PCR amplifiziert und dann sequenziert. Der Datenbankabgleich der Sequenzen ergab, dass *Enterobacter hoermachei* und *Acinetobacter baumannii* enthalten war. Beide Arten gehören laut TRBA in die Risikogruppe 2. Die Arbeiten mit V10 und V11 wurden daraufhin eingestellt und die beiden Versuchspräparate wurden vernichtet.

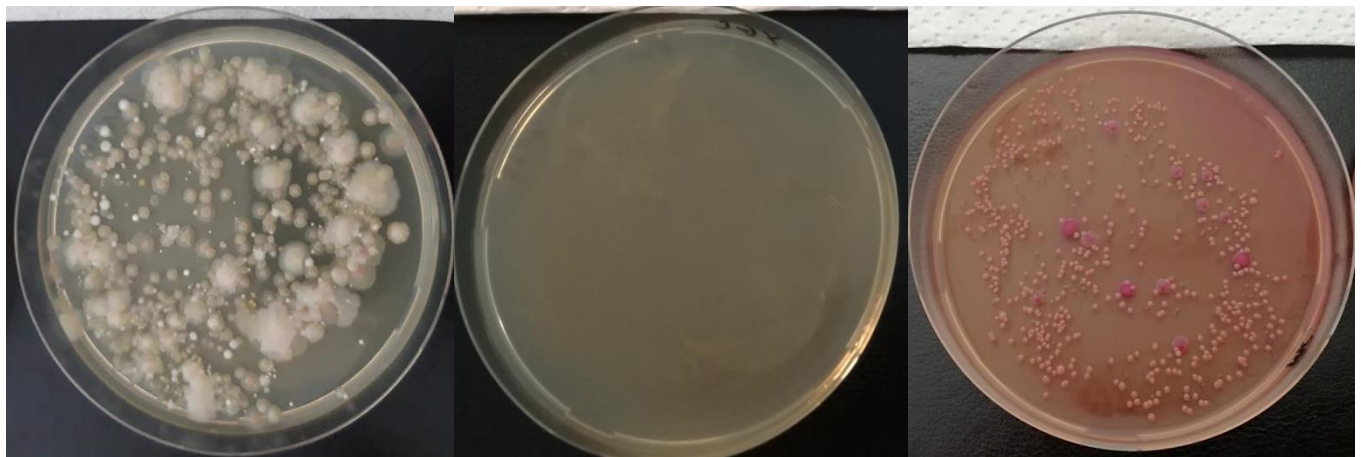


Abbildung 4: Qualitätskontrolle V11:

YM Agar-Platten mit 0,35% Fluconazol (Links), YGC Agar-Platten mit 0,35% Fluconazol (Mitte) und MacConkey Agar-Platten mit 0,35% Fluconazol (Rechts).

4.2.3 Physikalisch und chemische Parameter

Ein Gehalt von über 92% an Trockensubstanz im Granulat ist erfahrungsgemäß für die Lagerstabilität von Hefegranulaten notwendig. Für die Chargen V9 und V11 wurde diese Grenze erreicht. Die Dichten der 2H13 Testpräparate wurden bestimmt, um Verpackungsgrößen festlegen zu können. Hier wurden keine Schwankungen zwischen den Chargen V7 und V9 gefunden. Bei V9 blieben diese auch über 28 Monate stabil.

Für den Parameter „Persistent Foaming“, der zur Prüfung der Entstehung von Schaum bei Zugabe des Produktes in Wasser durchgeführt wurde, wurde keine Schaumbildung gefunden. Die FAO Anforderungen für WG-Formulierungen (< 60 ml nach 1 min) wurden für Charge V7 und V9 erfüllt.

Der Parameter „dry sieve“ der die Sieblinie und damit mögliche Partikelstreuungen des Produktes angibt, zeigte für beide Chargen enge Sieblinien an und damit eine geringe Streuung der Partikelgrößen so dass die Anforderungen an die WG- Formulierung erfüllt sind. Für die Charge V9 blieb die Sieblinie auch nach 28 Monaten unverändert.

Der nicht dispergierbare Produktanteil der über den „Wet sieve“ Test ermittelt wurde, war bei beiden Präparaten äußerst gering (0,014% V7 und 0% V9) so das für diesen Parameter die FAO Anforderungen (< 2%) eingehalten werden.

Das Dispersionsvermögen im Wasser zeigte für beide Chargen mit 36,7% (V7), 86,1% (V9) und 41,1% (V11) deutliche Unterschiede. Die FAO Anforderungen (>60%) konnten nur mit der Charge V9 erfüllt werden.

Tabelle 6: Phys.-Chem. Parameter:

Sollwerte der FAO für die Definition einer WG-Formulierung (WG-F.-) und Messwert (± Standartabweichung) in 2H13 Chargen. nb=nicht bestimmt.

Testmethode (Richtlinie)	FAO Soll für WG-F.	2H13 V7	2H13 V9	2H13 V9 nach 28 Monaten	2H13 V11
Trockensubstanz in %	nb.	90,9	92,1	nb	93,6
Klopfichte (CIPAC MT 33) in g/ml	nb	0,73 (± 0,02)	0,71 (± 0,03)	0,70 (±0,01)	nb
Schüttdichte (CIPAC MT 159) in g/ml	nb	0,69 (± 0,01)	0,68 (± 0,00)	0,69 (± 0,00)	nb
Persistent Foaming (CIPAC MT 47.2) in ml	<60	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	nb.
Wettability (CIPAC MT 53.3) in sec.	<60	300 (± 56)	180 (± 44)	310 (±36)	750 (±30)
Dry Sieve (CIPAC MT 170) in µm	nb	500 - 1000	250 - 1000	250-1000	nb
Dispersibility (CIPAC MT 174) in %	>60	36,7 (± 1,6)	86,1 (± 1,7)	75,7 (±10,6)	41,1 (±4,4)
Wet Sieve (CIPAC MT 185) in %	<2	0,014 (± 0,001)	0,00 (± 0)	0,006 (±0,003)	nb.

Für den Parameter „Wettability“, der die Benetzungszeit mit Wasser prüft, wurden Zeiten von 5 min für Charge V7, 3 min Charge V9 und >12 min für die Charge V11 gemessen. Die FAO Anforderungen (Zeitraum bis zur vollständigen Benetzung <1 min) konnten für alle Chargen nicht erfüllt werden.

Das im Industrietrockner produzierte 2H13 Testpräparat V9 entsprach in den meisten Tests den Anforderungen der FAO für Wasserdispergierbares Granulat (WG-Formulierung). Nur die „Wettability“ war etwas zu hoch. Auch die Lagerung bei 8°C für 28 Monate hatte keinen negativen Einfluss auf die Phys-Chem Parameter.

Die „Wettability“ kann eventuell durch Zugabe von Stärke vor der Trocknung oder durch Zugabe eines geeigneten Formulierungshilfsstoffes noch verbessert werden. Ansonsten könnte ein Hinweis für den Anwender zum ständigen Rühren beim Ansetzen der Spritzbrühe und beim Ausbringen die Verwendbarkeit des Produkts sicherstellen.

Der Wechsel des Produktionsmediums zu Melasse hat sich in V11 negativ auf die getesteten Phys-Chem Parameter ausgewirkt, so dass dieser Medienwechsel nicht weiterverfolgt wird.

4.3 AP4-Lagerstabilität

Die im Scale-up produzierten Testpräparate wurden auf ihre Lagerstabilität während einer Lagerung unter konstanten Bedingungen untersucht. Dabei wurde in erster Linie die Lebendzellzahl von 2H13 in den Präparaten untersucht. Für die Charge V9 wurden auch Phys-Chem Parameter vor und nach der Lagerung gemessen (Tabelle 6).

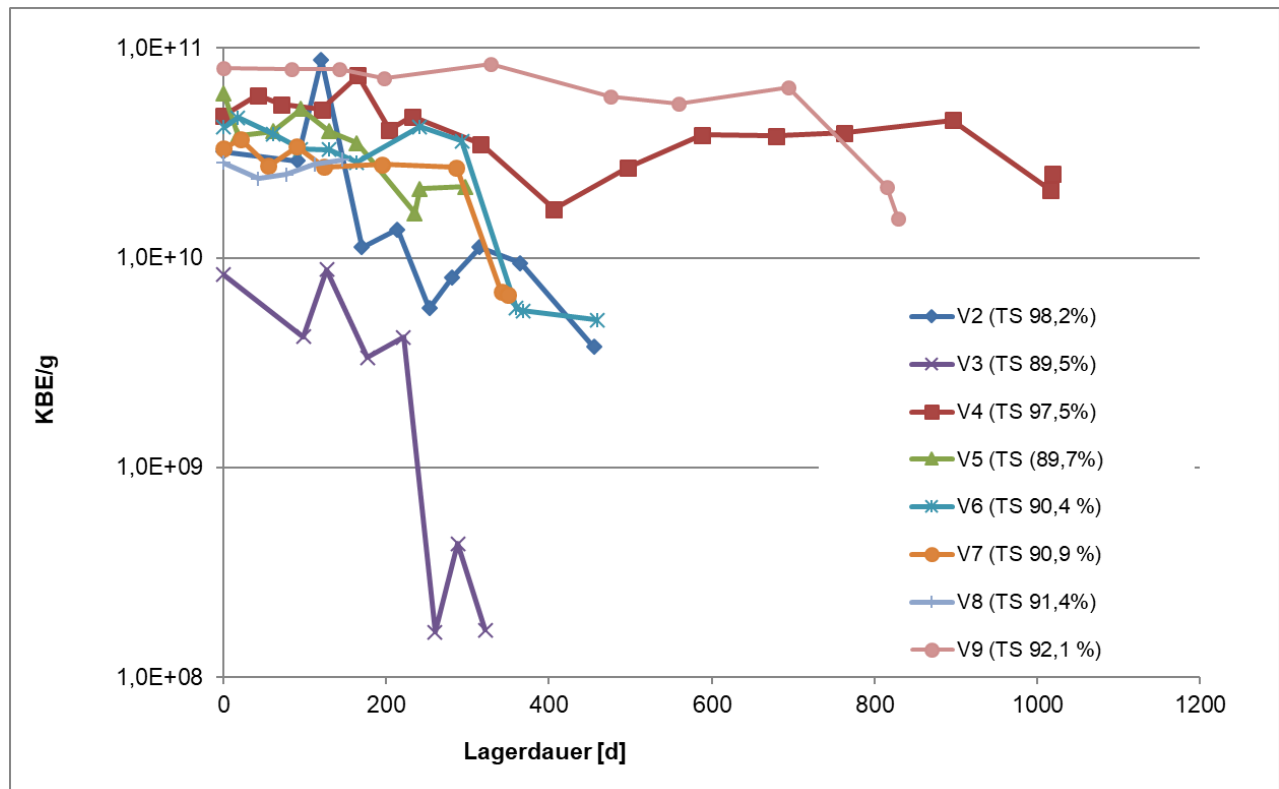


Abbildung 5: Verlauf der Lebendzellzahl (KBE/g) von 2H13 Versuchspräparaten (siehe Tabelle 3) über die Zeit bei Lagerung bei 8°C.

In V3 (bei Agrano produziertes Granulat) und V2 (mit MPS gefriergetrocknet) war nach 250 d die KBE/g um mehr als eine Zehnerpotenz reduziert. In V6 und V7 war die KBE/g nach 350 Tagen um ca. 90% gesunken. Für V5 waren keine Bestimmungen mehr möglich, da es für Versuche verbraucht wurde. Das Präparat V4 mit der geringsten Restfeuchte von 2,5 % war auch zum Projektende nach 2,8 Jahren Tagen noch stabil. Im Vergleich zu V2 war V4 bei ähnlicher Restfeuchte damit deutlich länger haltbar. Im Unterschied zu V2, welches in Melassemedium produziert wurde, wurde V4 im, für die Großproduktion besser geeigneten, Hefeextraktmedium produziert. Das 2H13 Granulat, das dem späteren Endprodukt entspricht (V9), war für 2 Jahre lagerstabil (KBE größer 50% vom Startwert) (Abbildung 5), obwohl die Trockensubstanz (TS) mit 92,1% unter den angestrebten Qualitätskriterien (TS 94%) lag. Nach 27 Monaten sank die Lebendzellzahl dann unter 50% vom Startwert. Für das Produkt wird also eine maximale Lagerdauer von 24 Monaten angegeben. Die Daten von V4 deuten darauf hin, dass längere Lagerzeiten möglich sind, wenn entsprechende TS bei der Trocknung erreicht werden.

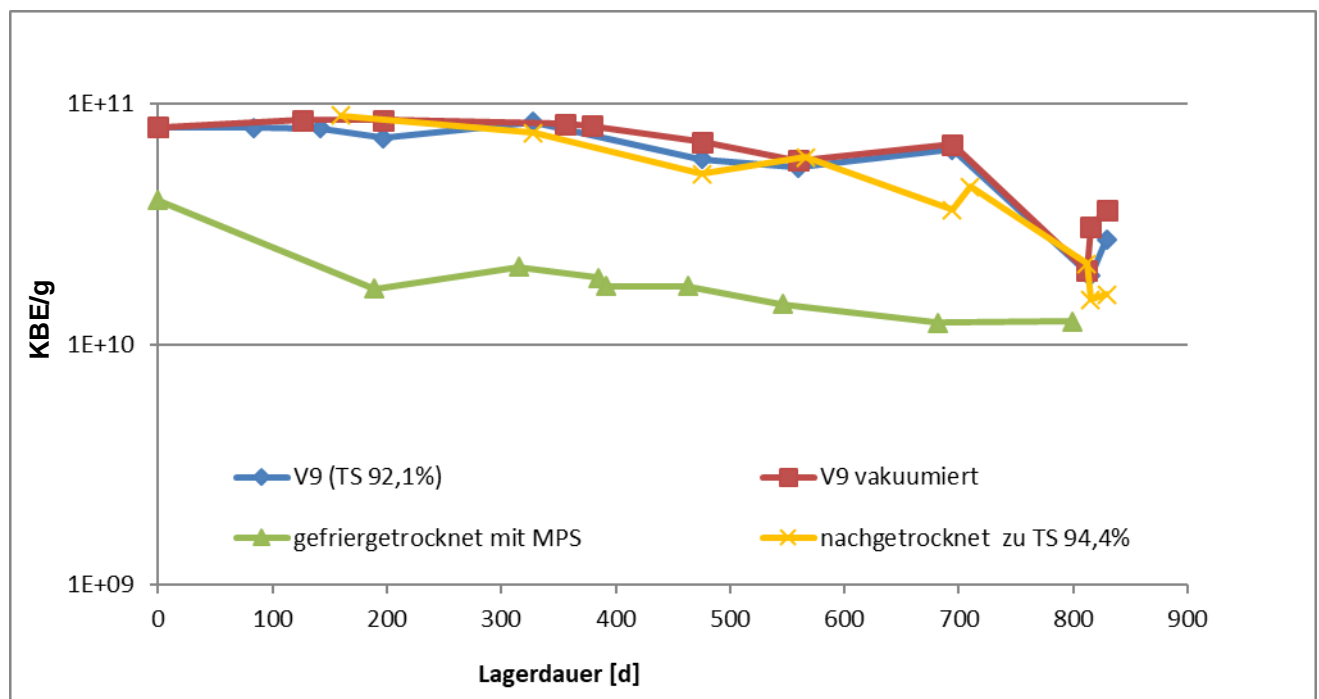


Abbildung 6: Verlauf Lebendzellzahl (KBE/g) in Proben aus der Pilotproduktion 180823 nach unterschiedlicher Aufarbeitung und Lagerung bei 8°C.

Bei der Produktion von V9 wurden Vergleichsproben Vakuum verpackt bzw. Hefecreme mit Magermilchpulver und Zucker als Trägerstoff gefriergetrocknet. Zusätzlich wurde eine Probe nach 6 Monaten Lagerung nachgetrocknet wodurch die TS von 92,1% in V9 auf 94,4% erhöht wurde. Bis zum Projektende nach 27 Monaten hatte die Vakuumverpackung (üblich für Backhefe) und das Nachtrocknen keinen Einfluss auf die Lagerstabilität von 2H13 (Abbildung

6). Alle 3 Proben lagen im Dezember 2019 bei ca. 20% vom Startwert. Die gefriergetrocknete Probe verlor bereits nach 180 Tagen 60% der KBE/g. Blieb danach aber über 2,5 Jahre stabil.

Von der Versuchscharge V9 stand zum ersten Mal eine größere Menge an Produkt zur Verfügung, so dass Lagerversuche auch bei 20°C und 40°C durchgeführt werden konnten. Bei den höheren Temperaturen wurden kürzere Lagerzeiten erwartet. Dadurch sollten Einflüsse von Restfeuchte oder Verpackungsmaterial schneller sichtbar werden als bei der 8°C Lagerung.

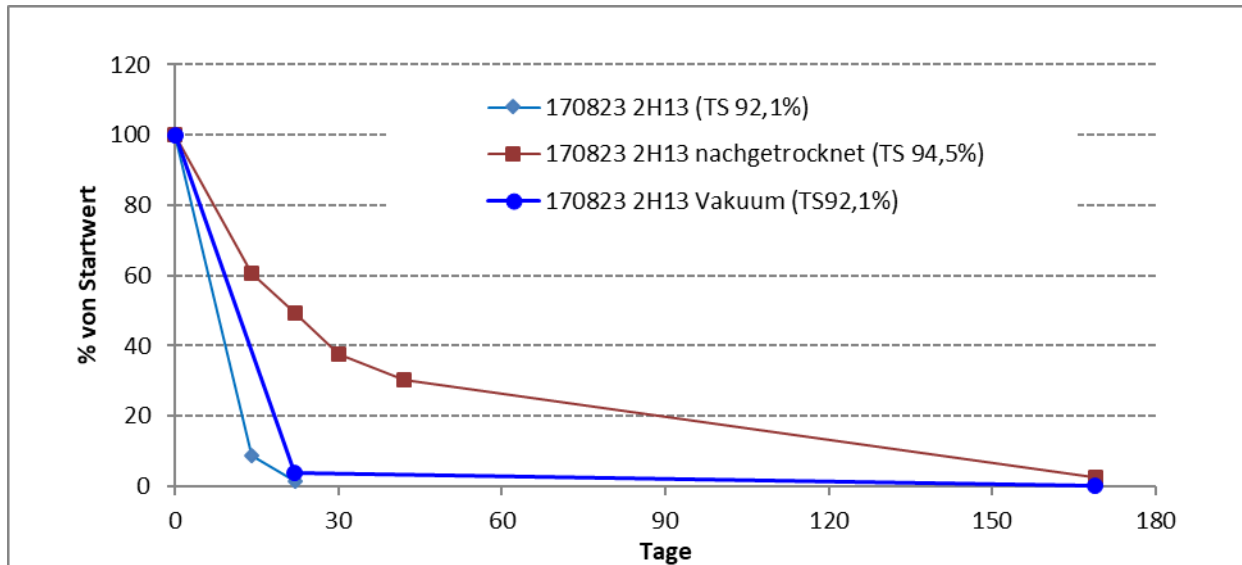


Abbildung 7: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 40°C in Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher Verpackung.

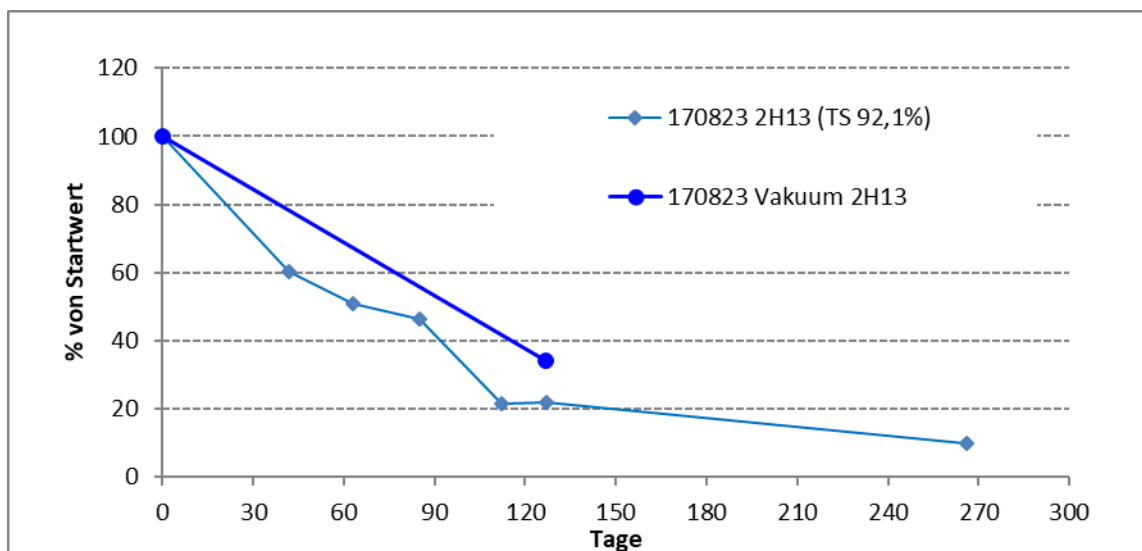


Abbildung 8: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 20°C in Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher Verpackung.

Beim Produzenten wurde 2H13 Granulat in Aluminiumtüten mit und ohne Vakuum verpackt zu Portionen von 100 g. Die Lagerung in den Originalverpackungen zeigte eine schnelle Abnahme der KBE/g bei 40°C innerhalb von 14 Tagen auf unter 10% vom Startwert (Abbildung 7). Bei 20°C Lagerung wurden nach 100 Tagen 20% des Startwerts erreicht. Auch die Vakuumverpackung hatte keinen deutlichen positiven Einfluss (Abbildung 8). Die Probe, die im offenen Becherglas bei 40°C gelagert wurde, und beim lagern auch Wasser abgab, war länger lagerfähig (Abbildung 7). Die TS stieg in dieser Probe während der ersten 3 Tage Lagerung auf 94,5%. Danach wurde die Probe in einer geschlossenen Plastikflasche weiter gelagert.

Aus der Erfahrung des ersten 40°C Lagerversuchs, wurde Teile der Charge 2H13 180823 beim Produzenten im Wirbelschichttrockner nachgetrocknet und zwei Proben mit höherer TS von 93,9% und 94,4% geliefert und auch bei 40°C und 20°C gelagert. Bei 40°C bestätigte sich der positive Einfluss der höheren TS bei 94,4% (Abbildung 9). Die Lagerstabilität nahm bei 20°C mit der TS zu, so dass die Unterschreitung von 50% KBE/g bei der Probe mit 94,4% TS erst nach 150 Tagen erfolgte und bei 92,1% TS bereits nach 60 Tagen (Abbildung 10). Der Qualitätsparameter Trockensubstanz wird für zukünftige Produktionen auf mind. 94% angehoben (bisher 92%), da er direkten Einfluss auf die Lagerstabilität bei 40°C und 20°C hatte. Bei Lagerung bei 8°C hatte sich der Einfluss der TS allerdings nicht bestätigt.

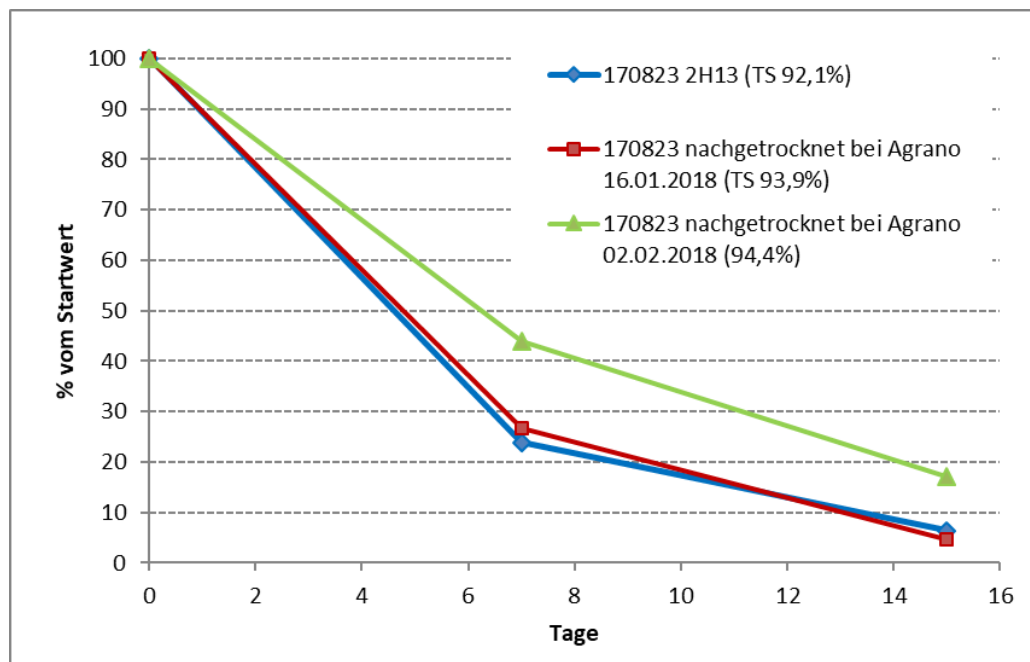


Abbildung 9: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 40°C in nachgetrockneten Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher TS.

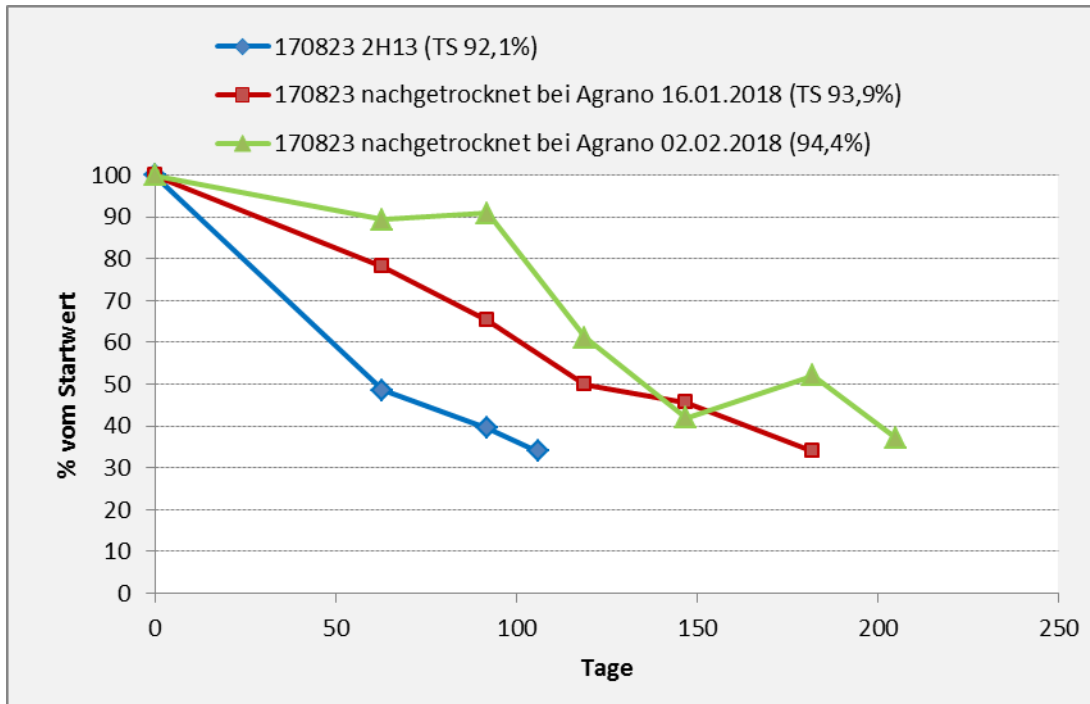


Abbildung 10: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 20°C in nachgetrockneten Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher TS.

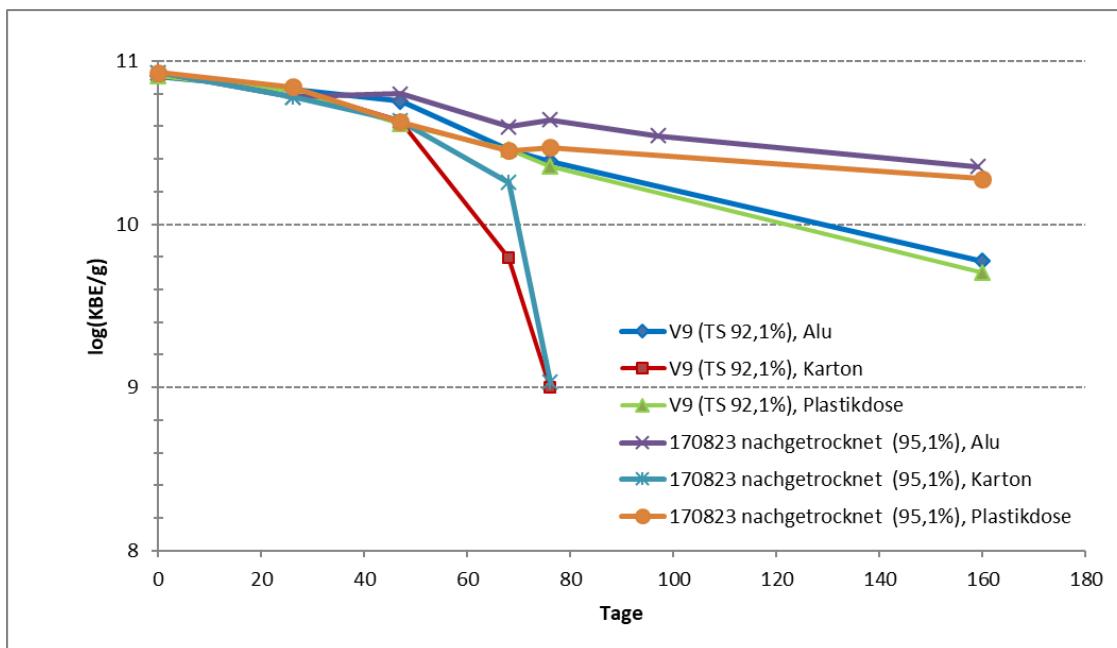


Abbildung 11: Verlauf Lebendzellzahl (log(KBE/g)) bei Lagerung bei 20°C von 2 Produktionschargen in jeweils drei unterschiedlichen Verpackungen.

In weiteren Versuchen wurde die Lagerung von zwei Versuchspräparaten bei Verpackung in rechteckigen Kartonhülsen mit Plastikdeckel, mit verschweißten Aluminiumtüten und Plastikdosen bei 40°C und 20°C verglichen. Bei Lagerung bei 40°C sank die Lebendzellzahl in

allen Verpackungen innerhalb von 9 Tagen unter 50% vom Startwert. Die Unterschiede zwischen den Verpackungen waren gering.

Lagerung bei 20°C führte zu einer Differenzierung zwischen den Verpackungen, wobei die Proben in den Kartonhülsen deutlich schneller kaputt waren, als die Proben in den Plastikdosen. Die Haltbarkeit in verschweißten Aluminiumtüten war am längsten (Abbildung 11).

4.4 AP5 – Biotests

4.4.1 Tomatenblattscheibentest

Der Tomatenblattscheibentest wurde zum Screening von Mikroorganismen auf Wirksamkeit gegen *P. infestans* etabliert und die Wirkungsverbesserung niedriger Kupferdosierungen durch den Hefestamm 2H13 wurde in diesem System zuerst beschrieben (Kunz *et al.*, 2016a). Das Testsystem wurde im Projekt verwendet, um die Wirksamkeit der in AP2 produzierten Versuchspräparate (Tabelle 3) auf Wirksamkeit zu prüfen und den Wirkmechanismus (AP6) aufzuklären.

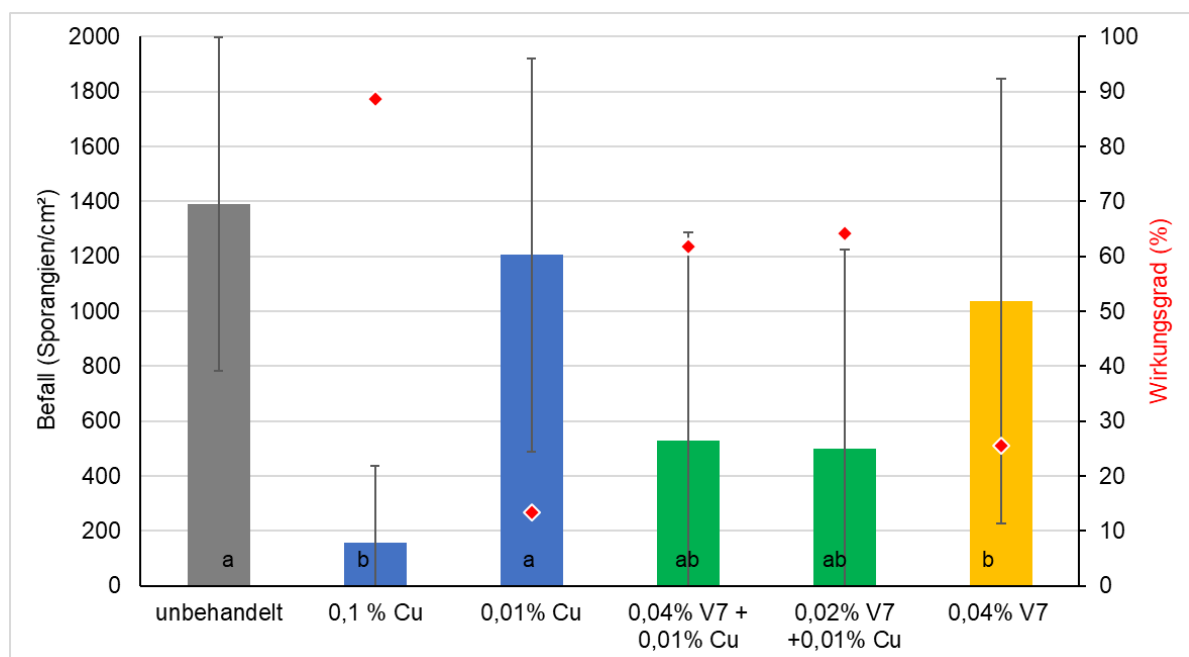


Abbildung 12: Befall (Sporangien/cm²) mit *P. infestans* (Säulen) im Tomatenblattscheibentest 170809 und Wirkungsgrad (rote Raute).

Unterschiedliche Buchstaben in den Säulen zeigen signifikante Unterschiede in Tukey's Multiple Comparison Test (p < 0,05).

Beispielhaft wird in Abbildung 12 ein Versuch gezeigt, in dem die Wirkungssteigerung von 0,01% Cuprozin progress durch das Testpräparat V7 in verschiedenen Dosierungen gezeigt ist. 0,1% Cuprozin progress war mit 89% signifikant wirksamer als 0,01% Cuprozin progress. Die Zugabe von V7 zu 0,01% Cuprozin progress erhöhte die Wirksamkeit vom Kupfer tendenziell

von 13% auf über 60%. Die Mischungen waren damit auch nicht mehr signifikant weniger wirksam als 0,1% Cuprozin progress. V7 ohne Kupfer hatte keine signifikante Wirkung.

In ähnlichen Versuchen wurden die Testpräparate aus dem Scale-up geprüft und zeigten meist die erwarteten Effekte in Kombination mit reduzierten Kupferdosierungen (Tabelle 7). Im Mittel erzielten alle 2H13 Versuchspräparate eine Wirkungssteigerung zum Kupfer alleine, die zwischen 3 und 49% lag. Allerdings schwankte die Wirkung von 0,01% Cuprozin progress in den Versuchen zwischen -35% und 96%. Der Vergleich der Versuchspräparate bzw. deren Dosierungen über unterschiedliche Versuche war aufgrund der stark schwankenden Wirkung von 0,01% Cuprozin progress schwierig. Zusätzlich war in den meisten Versuchen eine große Varianz in den Wiederholungen, so dass selbst Wirkungsgrade von über 60% nicht statistisch signifikant waren (z.B. Abbildung 12). Deshalb wurde vermehrt Arbeitskapazitäten in die Etablierung der Topfpflanzentestsysteme an Kartoffeln und Tomaten investiert. Mit diesen Testsystemen ist man näher an der praktischen Anwendung und es wurden aussagekräftigere Ergebnisse erwartet.

Tabelle 7: Anzahl der Versuche (N) und Mittelwert (MW) der Wirkungsgrade von zwei Cuprozin progress Dosierungen in Tomatenblattscheibentests.

Für die Mischungen aus 2H13 Versuchspräparat und 0,01% Cuprozin progress wurde die Differenz des Wirkungsgrades zum Wirkungsgrad von 0,01% Cuprozin progress im jeweiligen Versuch berechnet und die entsprechenden Mittelwerte (MW).

Variante	N	MW	170208	170214	170222	170302	170323	170330	170519	160601	170726	170809	170913
		Wirkungsgrad (%)											
0,1% Cuprozin progress	11	88	78,4	82,1	84,1	96,5	95,5	98,3	97,5	60,9	95,5	88,7	94,2
0,01% Cuprozin progress	11	52	-7,4	-34,8	67,3	70,5	89,9	65,7	95,8	65,5	81,8	13,3	65,7
		Differenz zur Wirkung von 0,01% Cuprozin progress (WG 2H13+0,01% CU - WG 0,01% CU)											
0,01% Cu	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,02% V2 + 0,01% Cu	4	26	39	102	-23	-14							
0,02% V3 + 0,01% Cu	2	41	47	35									
0,02% V4 + 0,01% Cu	6	25	62	131	-27	11	2	-30					
0,02% V6 + 0,01% Cu	3	3						12	-1	-3			
0,02% V7 + 0,01% Cu	4	11							-10		0	51	4
0,04% V7 + 0,01% Cu	1	49										49	
0,02% V8 + 0,01% Cu	1	9								9			
0,02% V9 + 0,01% Cu	1	17											17

4.4.2 Tomatentopfpflanzen

Nachdem das Testsystem an Tomatentopfpflanzen etabliert war, wurden die im Scale-up produzierten Testpräparate von 2H13 eingesetzt, um deren Wirkungsverbesserung von Kupferpräparaten in verschiedenen Dosierungen zu überprüfen.

Zum Beispiel wurde das Versuchspräparat V9 in zwei Dosierungen jeweils zusammen mit je 2 Konzentrationen von Cuprozin progress getestet (Abbildung 13). 0,1% Cuprozin progress reduzierte die Befallsstärke tendenziell im Vergleich zu unbehandelt. Die Zugabe von 0,06% oder 0,02% V9 verbesserte tendenziell die Wirksamkeit von 0,1% Cuprozin progress, es gab

keine signifikanten Unterschiede zur Kupfervariante, aber die Varianten mit 2H13 waren signifikant wirksam im Vergleich zu unbehandelt. Die Zugabe von 2H13 verbesserte tendenziell die Wirksamkeit von 0,01% Cuprozin progress. Es gab weder signifikante Unterschiede zu 0,01% Cuprozin progress, noch zu unbehandelt. Die Mischungen mit 0,06% V9 zeigten tendenziell bessere Wirksamkeiten als die mit 0,02% V9 (Abbildung 13).

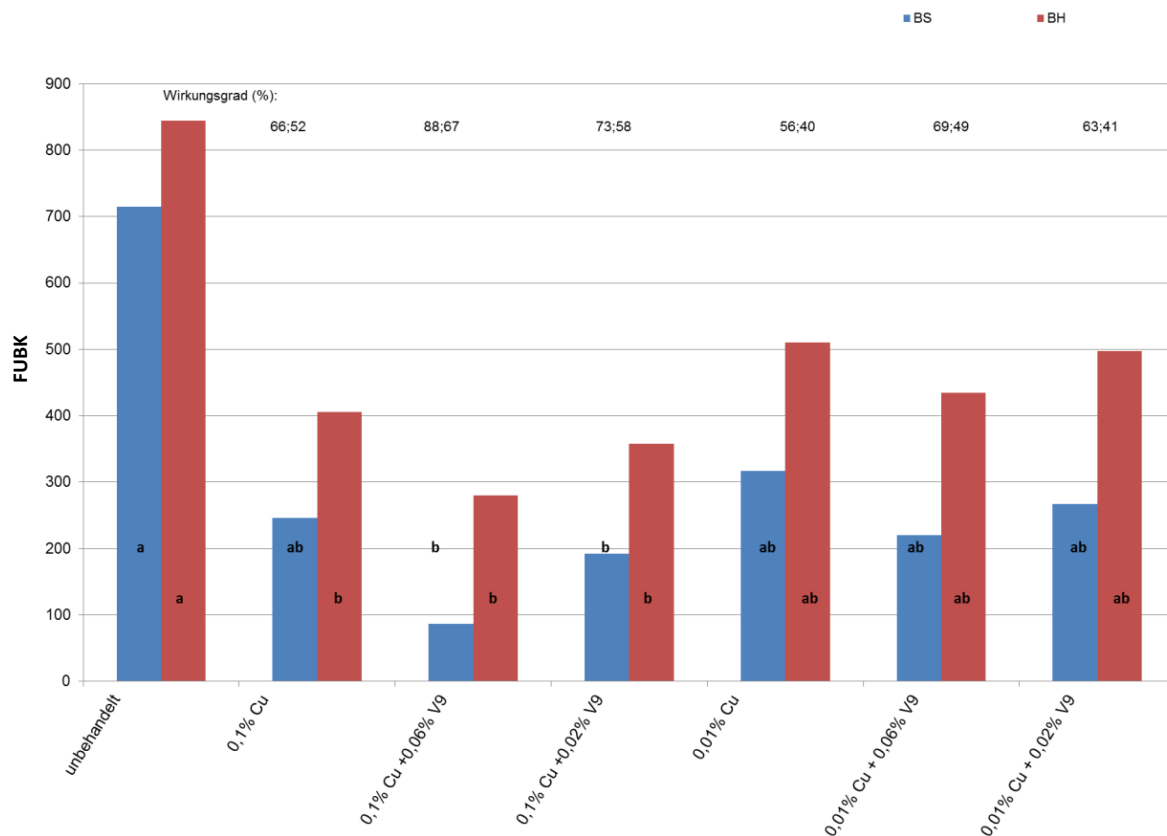


Abbildung 13: FUBK von *P. infestans* (M16 inokuliert mit 5E+03 Sporangien/ml) an Tomatentopfpflanzen (Hellfrucht Hilmar).

V9: 2H13 Versuchspräparat. Cu: Cuprozin progress. BS: Befallsstärke. BH: Befallshäufigkeit. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede in Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

In einem anderen Versuch wurde die Verbesserung der Wirksamkeit von 0,01% Cuprozin progress durch 2H13, Carbonatpuffer, Cocana und Vitan, sowie deren Einfluss auf die Regenfestigkeit untersucht (Abbildung 14). Die chemische Kontrolle (0,5% Cuprozin progress) zeigte signifikant weniger Befall, als unbehandelt. 0,01% Cuprozin progress war tendenziell besser als unbehandelt (nicht signifikant). Durch Zugabe von 2H13 V9 verbesserte sich die Wirksamkeit von 0,01% Cuprozin progress tendenziell, die Mischung war signifikant besser als unbehandelt und auf demselben Niveau wie die hohe Kupferdosierung. Weder Cocana, noch Carbonatpuffer verbesserten die Wirksamkeit der Mischung aus 0,01% Cuprozin progress und 2H13 V9. Die Regenfestigkeit von niedrig Kupfer konnte weder durch Zugabe von V9 noch von V9 + Cocana oder Carbonatpuffer verbessert werden (Abbildung 14).

Die Zugabe von Vitisan zu 0,01% Cuprozin progress brachte weder in der berechneten, noch in der unberechneten Variante eine Verbesserung. Die Mischung aus 0,01% Cuprozin progress + V9 + Vitisan war signifikant besser als unbehandelt und tendenziell besser als die chemische Kontrolle, 0,01% Cuprozin progress, die Mischung aus 2H13 + 0,01% Cuprozin progress und die Mischung aus 0,01% Cuprozin progress + Vitisan (nicht signifikant). Eine Verbesserung der Regenfestigkeit konnte durch Vitisan nicht erreicht werden (Abbildung 14).

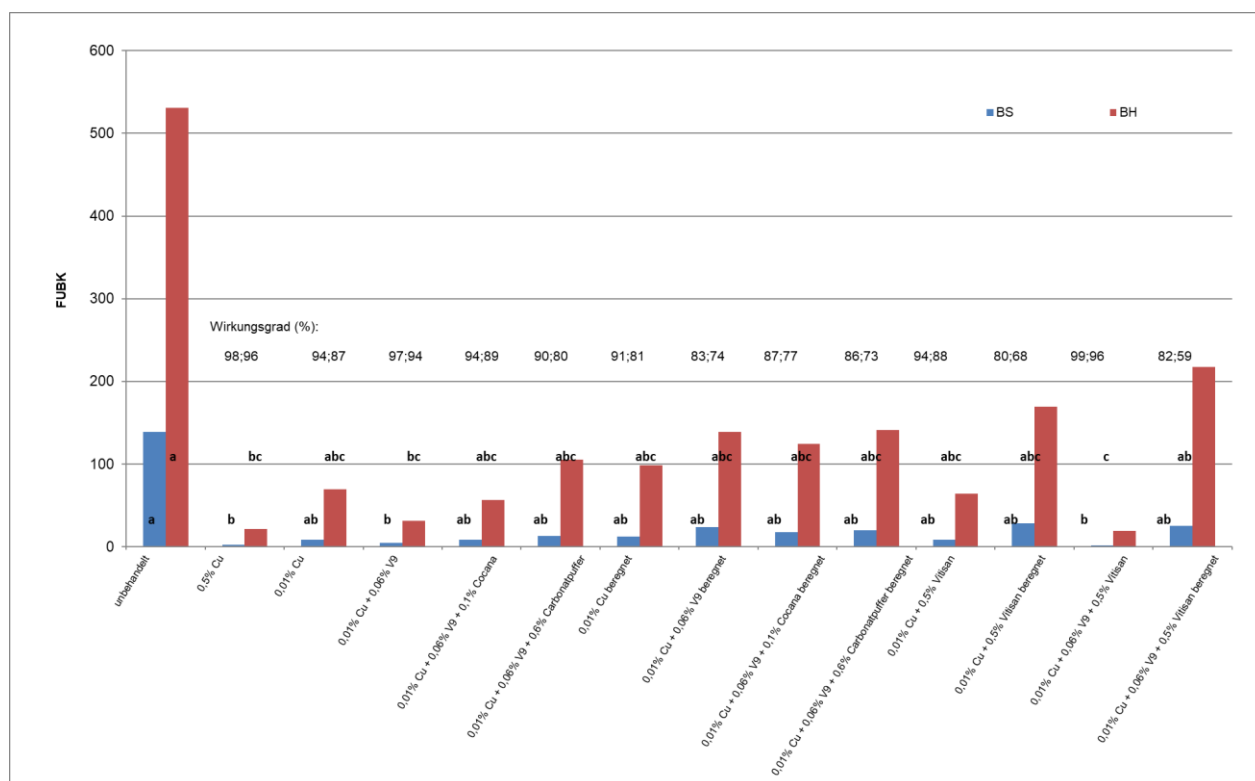


Abbildung 14: FUBK von *P. infestans* (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Tomatentopfpflanzen (Sportivo).

Die gekennzeichneten Varianten wurden vor der Inokulation mit 15 mm beregnet. V9: 2H13. Cu: Cuprozin progress. BS: Befallsstärke. BH: Befallshäufigkeit. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede BS: Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$), BH: Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

Obwohl die Tomatentopfpflanzenversuche jeweils mit 5-6 Wiederholungen durchgeführt wurden, ergaben sich in den einzelnen Versuchen meist nur Tendenzen aber keine signifikanten Unterschiede. Deshalb wurde für Varianten, die in mehreren Versuchen getestet wurden eine Metaanalyse gerechnet. 0,1% Cuprozin progress wurde in 9 Versuchen jeweils solo oder mit verschiedenen Testpräparaten von 2H13 eingesetzt. Vergleicht man die Wirkungsgrade der beiden Varianten miteinander, verbesserte 2H13 die Kupferwirkung signifikant im Durchschnitt um 7% (Tabelle 8). Bei 0,01% Cuprozin progress ergab sich in 10 Versuchen eine tendenzielle Verbesserung um 3%.

Das Fungizid Bordoflow new (Kupferkalkbrühe mit 124g Reinkupfer pro Liter) wurde in verschiedenen Konzentrationen jeweils mit und ohne 2H13 in Tomatentopfpflanzenversuchen gegen *P. infestans* eingesetzt. Zwei der 8 Versuche wurden nach der Behandlung berechnet. Bordoflow new führte in allen Konzentrationen mit und ohne Berechnung zu einer durchschnittlichen Reduzierung der Befallsstärke von 92%. Durch Zugabe von 2H13 (0,06% V9) wurde die Wirkung signifikant auf 97% erhöht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Metaanalyse zur Verbesserung der Wirksamkeit von Cuprozin progress oder Bordoflow new (0,4%, 0,2%, 0,04%) gegen *P. infestans* an Tomatentopfpflanzen durch die Zugabe von 2H13 (0,02 %; 0,06%).

p=Überschreitungswahrscheinlichkeit im gepaarten T-Test.

	Anzahl	Befallsstärke	
		Mittelwert Wirkungsgrad in %	p
0,1% Cuprozin progress	9	78	0,03
0,1% Cuprozin progress +2H13	9	85	
0,01% Cuprozin progress	10	67	0,52
0,01% Cuprozin progress + 2H13	10	70	
Bordoflow new	8	92	0,04
Bordoflow new+2H13	8	97	

Auf Tomatentopfpflanzen wurden auch Kombinationen aus Kupferpräparat + 2H13 und einem weiteren Stoff geprüft. Biofa Cocana wurde als Netzmittel zugegeben und es wurde die durch Zugabe von Carbonatpuffer der pH-Wert in der Spritzbrühe auf ca. 4 abgesenkt. Mit keiner dieser zwei Varianten konnte die Zusatzwirkung von 2H13 auf Cuprozin progress verbessert werden, so dass diese Varianten im Freiland nicht geprüft wurden. Mit Vitisan (Kaliumbicarbonat, pH 8) wurde in einem Tomatentopfpflanzenversuch ein positives Ergebnis gesehen (Abbildung 14), woraufhin diese Variante in einem Kartoffelfreilandversuch geprüft wurde.

4.4.3 Kartoffeltopfpflanzen

Im Berichtszeitraum wurden 14 auswertbare Versuche mit dem im Gewächshaus etablierten Kartoffeltopfpflanzenversuch durchgeführt. Zum Beispiel wurde das 2H13 Testpräparat V9 mit auf Agarplatten frisch produzierten 2H13 – Zellen verglichen, um zu prüfen, ob sich die Eigenschaften der Hefezellen durch das Produktionsverfahren verändert haben (Abbildung 15).

Die Zugabe der Hefe 2H13 verbesserte die Wirksamkeit von 0,1% Cuprozin progress tendenziell. Es machte keinen Unterschied, ob das Präparat V9 oder frische Zellen eingesetzt wurden. 0,1% Cuprozin progress, sowie die Varianten mit 2H13 zeigten keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die Zugabe des Homöopathikums Silicea 0,1%

Cuprozin progress und 2H13 verbesserte tendenziell die Wirksamkeit der Mischung. Diese Variante war auch signifikant besser als die unbehandelte Kontrolle. Zwischen den Behandlungen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15). Die Verbesserung der Wirkung durch Silicea konnte aber in weiteren Versuchen nicht bestätigt werden.

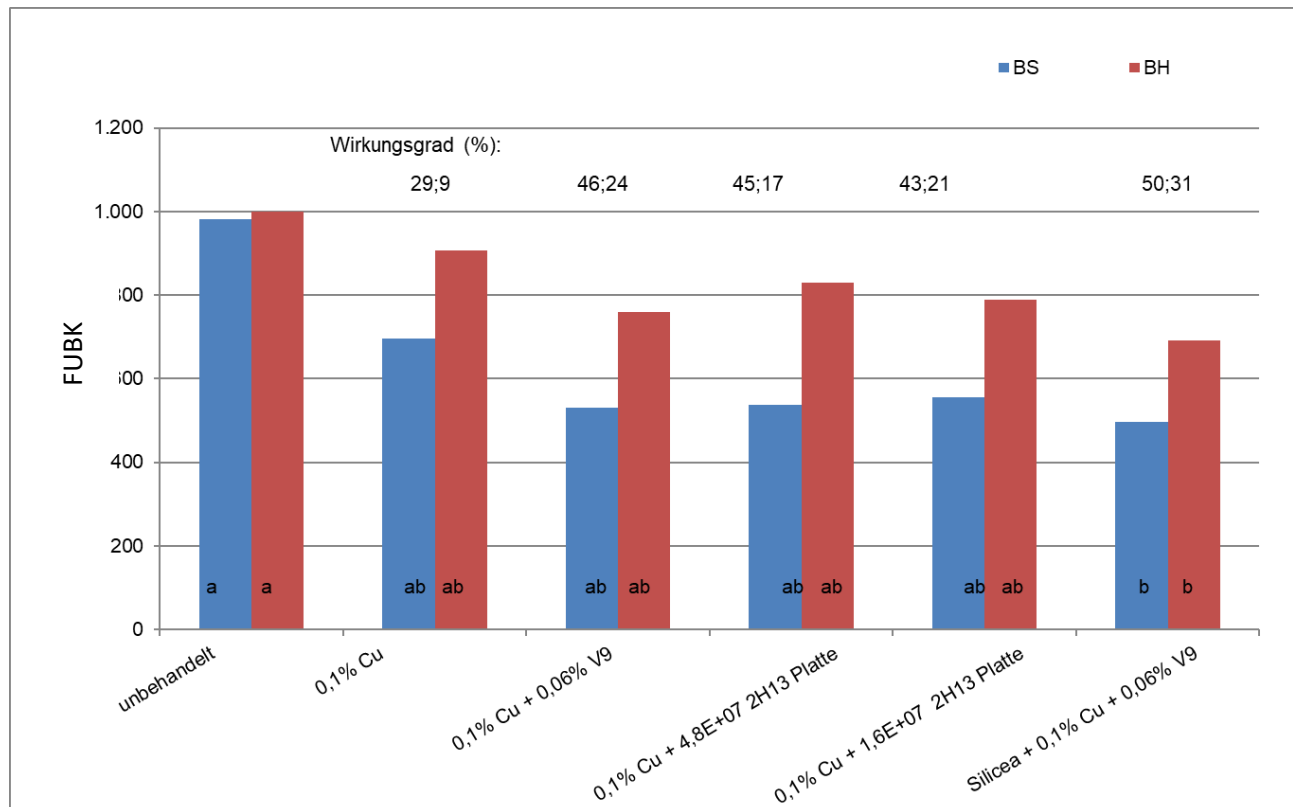


Abbildung 15: FUBK von *P. infestans* (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Kartoffeltopfpflanzen (Fasan).

V9: 2H13 Testpräparat. Cu: Cuprozin progress. BS: Befallsstärke. BH: Befallshäufigkeit. Silicea: 10 Globuli (C200) pro Liter. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede BS: Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$), BH: Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

In einem weiteren Kartoffeltopfpflanzenversuch wurde die Mischung von 2H13 (zwei Konzentrationen) und 0,1% Cuprozin progress getestet. Des Weiteren wurde der Effekt von 2H13 auf die Regenfestigkeit von 0,1% Cuprozin progress betrachtet.

Die Zugabe von 2H13 V9 (0,02% und 0,06%) führte zu einer tendenziellen Verbesserung der Wirksamkeit im Vergleich zu 0,1% Cuprozin progress solo. Die Mischungen mit 2H13 sind signifikant besser als die unbehandelte Kontrolle, 0,1% Cuprozin progress zeigte keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Eine Verbesserung der Regenfestigkeit durch Zugabe der Hefe konnte in diesem Versuch nicht gezeigt werden (Abbildung 16).



Abbildung 16: FUBK von *P. infestans* (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Kartoffeltopfpflanzen (Marabel).

Die gekennzeichneten Varianten wurden vor der Inokulation mit 15 mm beregnet. V9: 2H13 Testpräparat. Cu: Cuprozin progress. BS: Befallsstärke. BH: Befallshäufigkeit. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede BS: Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$), BH: Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

Wie bei der Tomate ergaben sich auch in den Versuchen an Kartoffeltopfpflanzen meist Tendenzen aber keine signifikanten Unterschiede. Deshalb wurde auch hier für mehrfach wiederholte Versuche eine Metaanalyse gerechnet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Metaanalyse zur Verbesserung der Wirksamkeit von Cuprozin progress gegen *P. infestans* an Kartoffeltopfpflanzen durch die Zugabe von 2H13 (0,02%, 0,06%, 0,1%).

P=Überschreitungswahrscheinlichkeit im gepaarten T-Test.

	Anzahl	Befallsstärke	
		Mittelwert Wirkungsgrad in %	<i>p</i>
0,1% Cuprozin progress	12	39	0,03
0,1% Cuprozin progress + 2H13	12	56	
0,01% Cuprozin progress	13	66	0,78
0,01% Cuprozin progress + 2H13	13	69	

0,1% Cuprozin progress wurde in 12 Versuchen jeweils solo oder mit 2H13 eingesetzt. Vergleicht man die Wirkungsgrade der beiden Varianten miteinander, verbesserte 2H13 die

Kupferwirkung signifikant im Durchschnitt um 17% (Tabelle 9). In der Metaanalyse wurden alle getesteten 2H13 Varianten berücksichtigt. Die Konzentrationen der Hefe lagen bei 0,1%, 0,06% und 0,02%. Bei den Präparaten handelte es sich um V6, V9, sowie Hefezellen, die frisch von der Agarplatte (YM) geerntet wurden. Die chemische Kontrolle 0,5% Cuprozin progress reduzierte die Befallsstärke im Durchschnitt um 69%.

Des Weiteren wurde die Zugabe der Hefe zu 0,01% Cuprozin progress betrachtet. Bei der geringeren Kupferkonzentration konnte in 13 Versuchen eine tendenzielle Verbesserung des Wirkungsgrads durch Zugabe von 2H13 um 3% erreicht werden (Tabelle 9).

Weder die Zugabe von Vitisan, noch von Nufilm-P zu der Kupfer-Hefe Mischung brachte eine weitere Verbesserung. Eine Aufteilung nach Konzentration oder Präparat von 2H13 brachte keine signifikanten Unterschiede zu 0,01% Cuprozin progress hervor.

4.5 AP6 – Wirkmechanismus

4.5.1 Wirksamkeit von toten 2H13 Zellen

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von abgetötetem 2H13 zusammen mit Kupfer (Abbildung 17) wurde die suspendierte Hefe V4 eine Stunde bei 80°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend zur Bestimmung der Keimzahl plattiert und es wurden keine lebenden Zellen festgestellt.

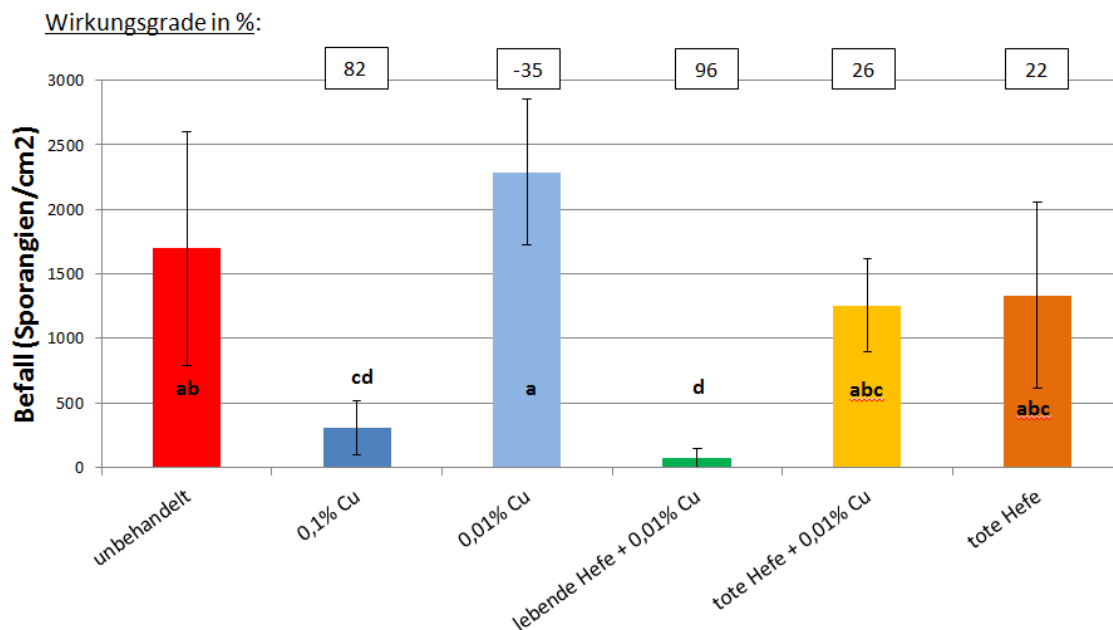


Abbildung 17: Befall von Tomatenblattscheiben mit *P. infestans* (Sporangien/cm²) 6 Tage nach der Behandlung und der Inokulation mit 5E+03 Sporangien/ml.

Lebende Hefe: 2H13 V4. Tote Hefe: 2H13 V4 1 h bei 80 °C. Cu: Cuprozin progress. Unterschiedliche Buchstaben in den Säulen zeigen signifikante Unterschiede in Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

Die Zugabe von lebendem 2H13 zu 0,01% Cuprozin progress verbesserte die Wirkung in diesem Versuch an Tomatenblattscheiben im Vergleich zu 0,01% Cuprozin progress alleine signifikant auf 96%. Weder abgetöteter 2H13 noch die Mischung mit 0,01% Cuprozin progress hatte eine signifikante Wirkung (Abbildung 17). Deshalb wurde die Produktentwicklung auf die Verwendung von lebenden 2H13 Zellen ausgelegt.

4.5.2 Einfluss von Kupfer bei der Produktion von 2H13

Im ersten Schritt wurde geprüft, ob das Wachstum von 2H13 durch Kupfer im Medium beeinflusst wird. Dazu wurde dem Medium 0,01% Cuprozin progress (250g Reinkupfer/l) zugegeben, entsprechend 0,0025% Reinkupfer im Medium. Inokuliert wurden die Ansätze mit 1E+07 Zellen/mL (2H13 von Platte). Inkubiert wurde bei 32°C und 200 rpm für 4 Tage. Nach 1h, 3d und zum Ende wurde jeweils die optische Dichte (OD660) gemessen und Lebendzellzahl bestimmt. Bis 6 Tagen zeigten sich keine Unterschiede im Wachstum von 2H13 zwischen den Ansätzen 2H13 solo und mit 0,01% Cuprozin progress.

Tabelle 10: Fläche unter der Befallsentwicklungskurve (FUBK) in verschiedenen Behandlungen nach Inokulation von Tomatenpflanzen mit *P. infestans* und Auswertung der Befallsstärke.

Cup = Cuprozin progress. Unterschiedliche Buchstaben in der Spalte Statistik zeigen signifikante Unterschiede in Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

Behandlung	FUBK	Wirkung (%)	Statistik
unbehandelt	59	0	ab
0,5% Cup	3	95	b
0,01% Cup	33	43	ab
2H13 frisch in Melasse + Cu	132	0	a
2H13 frisch in Melasse + Cu + 0,01% Cup	19	68	ab
2H13 frisch in Melasse	122	0	a
2H13 frisch in Melasse + 0,01% Cup	19	68	ab
2H13 frisch in Hefeextrakt + Cu	173	0	a
2H13 frisch in Hefeextrakt + Cu + 0,01% Cup	27	55	ab
2H13 frisch in Hefeextrakt	124	0	a
2H13 frisch in Hefeextrakt + 0,01% Cup	29	51	ab
0,06% V9 + 0,01% Cup	16	73	ab

Um zu prüfen, ob Kupfer dazu führt, dass 2H13 gegen Oomyceten wirksame Substanzen bildet, wurde zu zwei verschiedenen Medien (Melassemedium und Hefeextraktmedium) Kupfer zugegeben. 2H13 wurde in diesen Medien mit und ohne Kupferzugabe angezogen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert, die Pellets in 0,6% NaCl resuspendiert und die Zellzahl für die Applikation auf 5E+07 Zellen/ml eingestellt, was der Anwendung von 0,06% 2H13 V9 entsprach. Die so gewonnenen Hefezellen wurden dann in einem Gewächshausversuch an Tomatentopfpflanzen auf ihre Wirkung gegen *P. infestans* geprüft. 2H13 zeigte keine

Eigenwirkung gegen *P. infestans* egal in welchem Medium er angezogen wurde (Tabelle 10). Die Zugabe der jeweiligen Zellsuspension von 2H13 zu 0,01% Cuprozin progress verbesserte jeweils die Wirkung im Vergleich zu 0,01% Cuprozin progress alleine. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Kupfer zum jeweiligen Produktionsmedium nicht verbessert werden. Die größte Wirkungssteigerung wurde in diesem Versuch mit dem formulierten Testpräparat V9 (produziert im Hefeextraktmedium) erreicht (Tabelle 10).

Es konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die Zugabe von Kupfer zum Produktionsmedium die Bildung von Wirkstoffen in 2H13 induziert.

4.5.3 Einfluss von 2H13 auf die Regenfestigkeit von Kupferpräparaten

Es wurde untersucht, ob die Regenfestigkeit eines niedrig dosierten Kupferpräparates (Cuprozin progress) durch die Zugabe von 2H13 im Tomatentopfpflanzentest verbessert werden kann.

Alle Behandlungen waren signifikant besser als die unbehandelte Kontrolle, zwischen den Behandlungen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Zugabe von 2H13 (V9) zeigte in beiden Konzentrationen (0,02% und 0,06%) eine tendenzielle Verbesserung der Wirksamkeit gegenüber 0,1% Cuprozin progress solo. 0,1% Cuprozin progress beregnet zeigte die gleiche Wirksamkeit wie Cuprozin progress nicht beregnet. Durch Zugabe der Hefe konnte die Wirkung in den beregneten Varianten nicht verbessert werden (Abbildung 18).

Ein Versuch an Kartoffeltopfpflanzen ergab ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 19). 2H13 verbesserte die Regenfestigkeit von Cuprozin progress nicht.

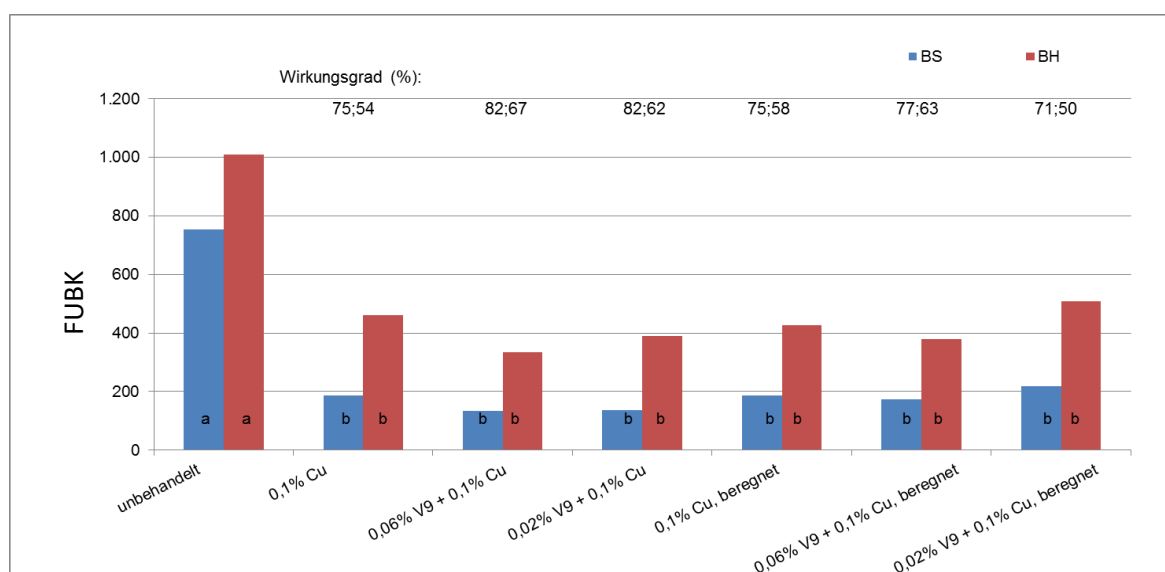


Abbildung 18: FUBK von *P. infestans* (K17 inokuliert mit 5E+03 Sporangien/ml) an Tomatentopfpflanzen (Hellfrucht Hilmar).

V9: 2H13 Testpräparat. Cu: Cuprozin progress. BS: Befallsstärke. BH: Befallshäufigkeit. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede in Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

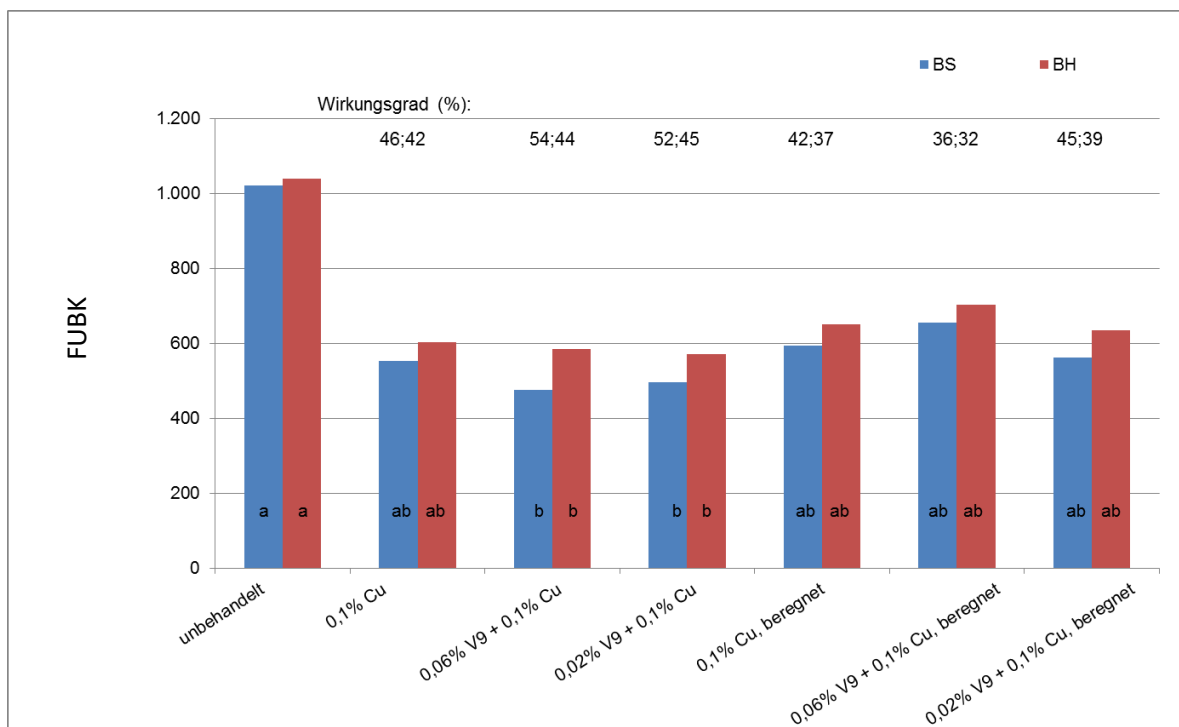


Abbildung 19: Fläche unter der Befallskurve (FUBK) von *P. infestans* (K17 inokuliert mit $2E+04$ Sporangien/ml) an Kartoffeltopfpflanzen (Marabel).

V9: 2H13 170823. Cu: Cuprozin progress. BS: Befallsstärke. BH: Befallshäufigkeit. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede in Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

In einem weiteren Versuch an Tomatentopfpflanzen wurde die Regenfestigkeit von 0,4% Bordoflow new und 0,04% Bordoflow new durch Zugabe von 0,06% V9 tendenziell verbessert.

Versuche zum Wirkmechanismus waren an den Tomaten- bzw. Kartoffeltopfpflanzen insgesamt schwer umzusetzen, da in den meisten Versuchen an ganzen Pflanzen nur tendenzielle Verbesserungen der Wirksamkeit durch Zugabe von 2H13 zu niedrig dosierten Kupferpräparaten gefunden wurde und insgesamt die Wirkungsgrade der niedrigen Kupferdosierungen stark schwankten.

Deshalb wurden in zwei Versuchen neben der Wirksamkeit von Kupfer gegen *P. infestans* auch die zum Zeitpunkt der Inokulation auf dem Blatt befindliche Kupfermenge analysiert. Dabei wurde der Gesamtkupfergehalt der Blätter in mg/kg Trockensubstanz bestimmt. Auch in Blättern der unbehandelten Kontrolle wurden geringe Kupfermengen nachgewiesen. Für die 2H13 solo Varianten liegen nur aus einem Versuch Ergebnisse vor, somit konnte für diese keine Statistik gerechnet werden. Die Werte auf den nur mit 2H13 behandelten Blättern lagen aber im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Mit dem 2H13 Präparat alleine wurde also kein zusätzliches Kupfer ausgebracht. Auf nicht berechneten Pflanzen wurde nach der Applikation mit Cuprozin progress eine signifikant höhere Kupferkonzentration auf den Blättern nachgewiesen als in der Kontrolle (Abbildung 20). Die Zugabe von 2H13 zu Cuprozin progress erhöhte den Kupfergehalt tendenziell. Dies deutet daraufhin, dass 2H13 die physikalischen Eigenschaften der Spritzbrühe

verändert und zu einer besseren Anlagerung von Kupfer auf dem Blatt führt. Auf den mit 15 mm beregneten Blättern wurde tendenziell weniger Kupfer gemessen als auf den nicht beregneten, was die erwartete Abwaschung des Kupfers durch Regen bestätigt. Allerdings führte der Regen in den mit 2H13 + Kupfer behandelten Blättern tendenziell zu einer stärkeren Abwaschung von Kupfer. Dieser Befund würde die in den Topfpflanzenversuchen teilweise gefundene schlechtere Wirkung von 2H13 + Kupfer nach Beregnung erklären.

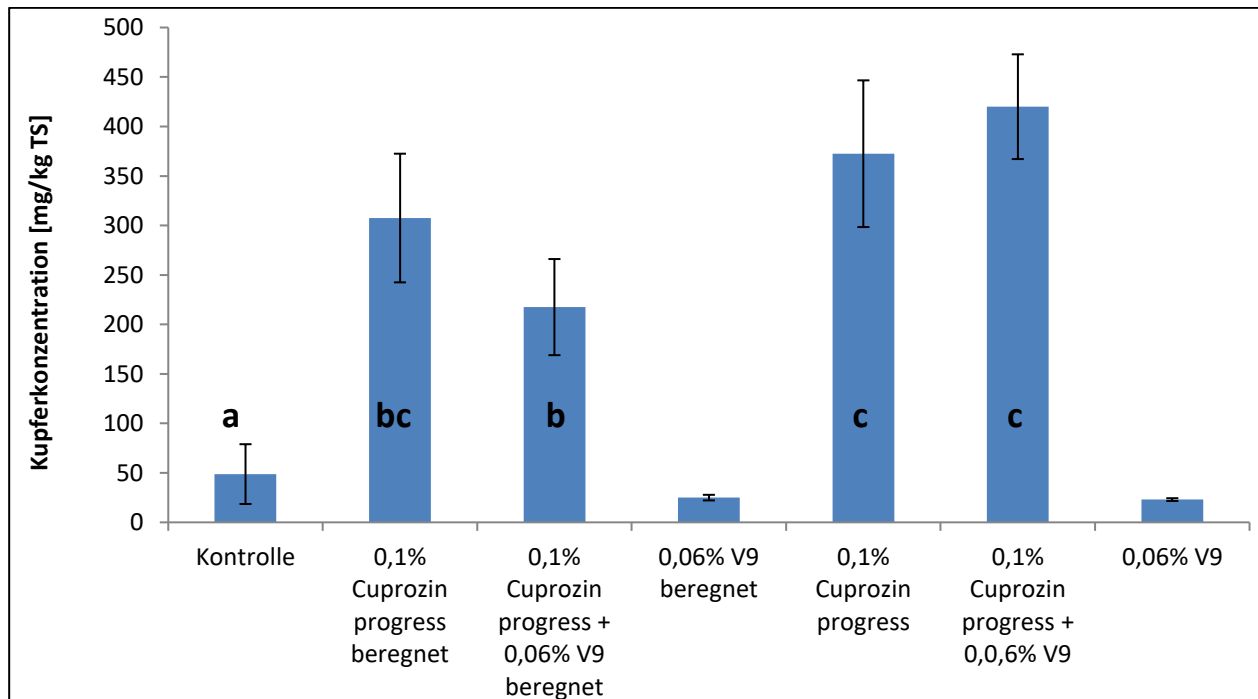


Abbildung 20: Gemessene Kupferkonzentration auf Kartoffelblättern nach Behandlung und teilweiser Beregnung mit 15 mm.

Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulenfarbe zeigen signifikante Unterschiede in Tukey's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$).

In einem Klimakammerversuch an Gurken wurde die Regenfestigkeit der niedrigen Kupferdosierung durch 2H13 nach Beregnung mit 15 mm Regen signifikant verbessert (Abbildung 25 unter Glp. 4.6.1).

Der Effekt von 2H13 auf die Wirksamkeit von Cuprozin progress gegen Apfelschorf war von der Regenmenge abhängig. Während der Wirkungsgrad von Cuprozin progress durch 2H13 ohne Beregnung und nach 10 mm Beregnung signifikant verbessert wurde, erhöhte sich bei 30 mm Regen die Schwankungsbreite der Ergebnisse stark und führte zu einer tendenziellen Verschlechterung der Wirkung (siehe Glp. 4.9.2).

4.5.1 Etablierung von 2H13 auf Kartoffelblättern

Geplant waren hier Studien zum Verhalten von 2H13 auf der Blattoberfläche. Dafür mussten aber erst geeignete Methoden zum Erfassen des Wachstums auf der Pflanzenoberfläche etabliert werden. Dazu wurde untersucht, inwiefern das quantitative Abwaschen von 2H13 von Kartoffelblättern möglich ist. Fraglich war, ob 2H13 sich aktiv an die Oberfläche anhaftet und dann mit Wasser oder Netzmitteln nicht wieder abzuwaschen ist.

Kartoffelblätter wurden mit einer definierten Menge 2H13 Suspension betropft und für 1 Stunde getrocknet. Der Suspension war 0,03% NuFilm P oder 0,9% Netzschwefel Stulln zugegeben. Die Blätter wurden in 0,6% NaCl Lösung oder in dem Netzmittel Tween 80 für eine Stunde abgewaschen. Die Waschlösungen wurden zur Keimzahl-Bestimmung plattiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle (ohne Auftragung und Abwaschung von Blättern) und eine unbehandelte Kontrolle (ohne Auftragung und mit Abwaschung von Blättern) plattiert. Anhand der Keimzahlen wurde die Menge an abgewaschenem 2H13 prozentual berechnet.

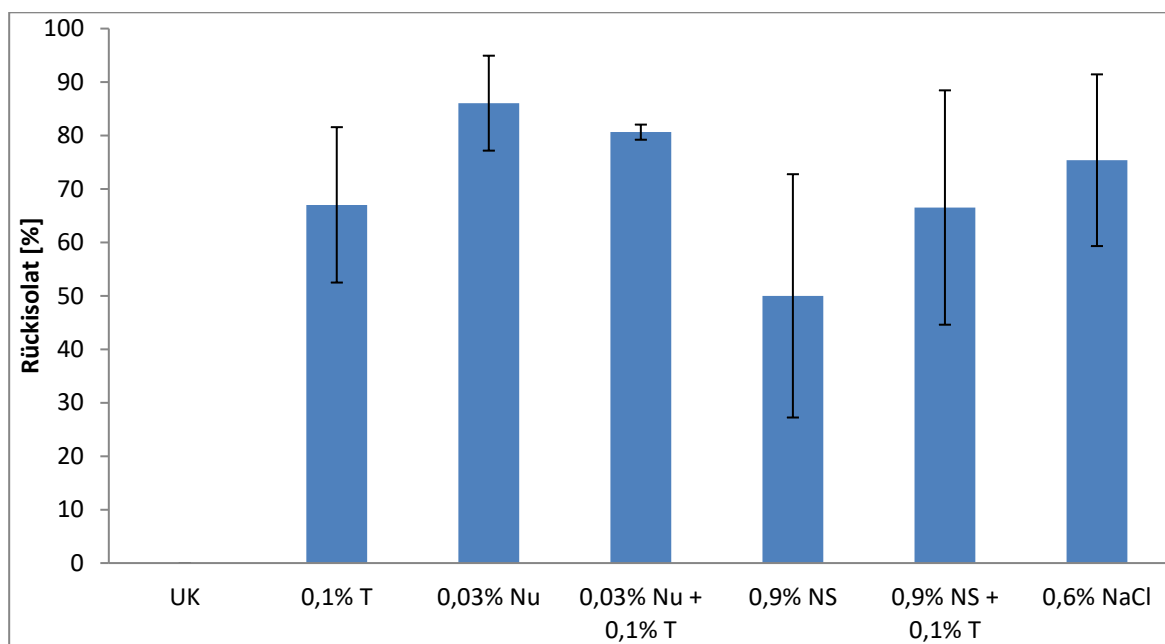


Abbildung 21: Von Kartoffelblättern durch Abwaschen in 0,06% NaCl oder 0,1% Tween 80 (T) rückisolierte Menge von 2H13 nach Auftropfen in Nu-Film P (Nu) oder in 0,9% Netzschwefel Stulln (NS).

UK: unbehandelte Kontrolle.

In der Waschlösung der unbehandelten Kontrolle konnten keine Hefen nachgewiesen werden. Eine Abwaschung nur mit 0,6% NaCl ermöglichte 75% der aufgetragenen 2H13 Zellen zu isolieren. Eine Zugabe von 0,1% Tween 80 reduziert diese Menge auf 67%. Die Auftragung mit Netzschwefel reduziert die Menge an Rückisolat auf 50%, lässt sich jedoch mit 0,1% Tween 80 auf 67% erhöhen. Eine Auftragung mit Nu-Film P ermöglicht ein Rückisolat von 86%. Die

Zugabe von Tween 80 reduziert diese auf 80%. Das Abwaschen der Blätter mit 0,6% NaCl-Lösung war ausreichend. Insgesamt bleibt unklar, ob die 20% - 50% fehlenden 2H13 Zellen durch die Prozedur abgestorben sind, oder sich an der Blattoberfläche anhafteten und nicht mehr abgewaschen werden konnten.

Das Wachstum von 2H13 auf der Oberfläche von Kartoffelblättern wurde mithilfe der entwickelten Abwaschmethode untersucht. Kartoffeltopfpflanzen wurden mit 2H13 Suspension gleichmäßig besprüht. Als Kupferpräparat wurde 0,1% Bordoflow new eingesetzt. Zum Abwaschen wurden aus den Blätter für jede Variante und jedem Zeitpunkt Blattscheiben mit einem Durchmesser von 1,8 cm herausgestanzt. Die Kartoffelpflanzen standen im Gewächshaus.

Bei allen Varianten zeigte sich in den ersten 24 h ein Rückgang der abgewaschenen Zellen. Danach blieben die Zellzahlen auf den nur mit 2H13 behandelten bzw. mit 2H13 + NuFilm P behandelten Blättern über 7 Tage stabil. In den mit 2H13 + Kupfer behandelten Pflanzen gab es bis 48 h nach der Behandlung einen weiteren Rückgang. Die Zellzahlen pendelten sich hier auf niedrigerem Niveau ein als in den Varianten ohne Kupfer (Abbildung 22). Die unbehandelte Kontrolle lag zu jedem Versuchszeitpunkt unter der Nachweisgrenze.

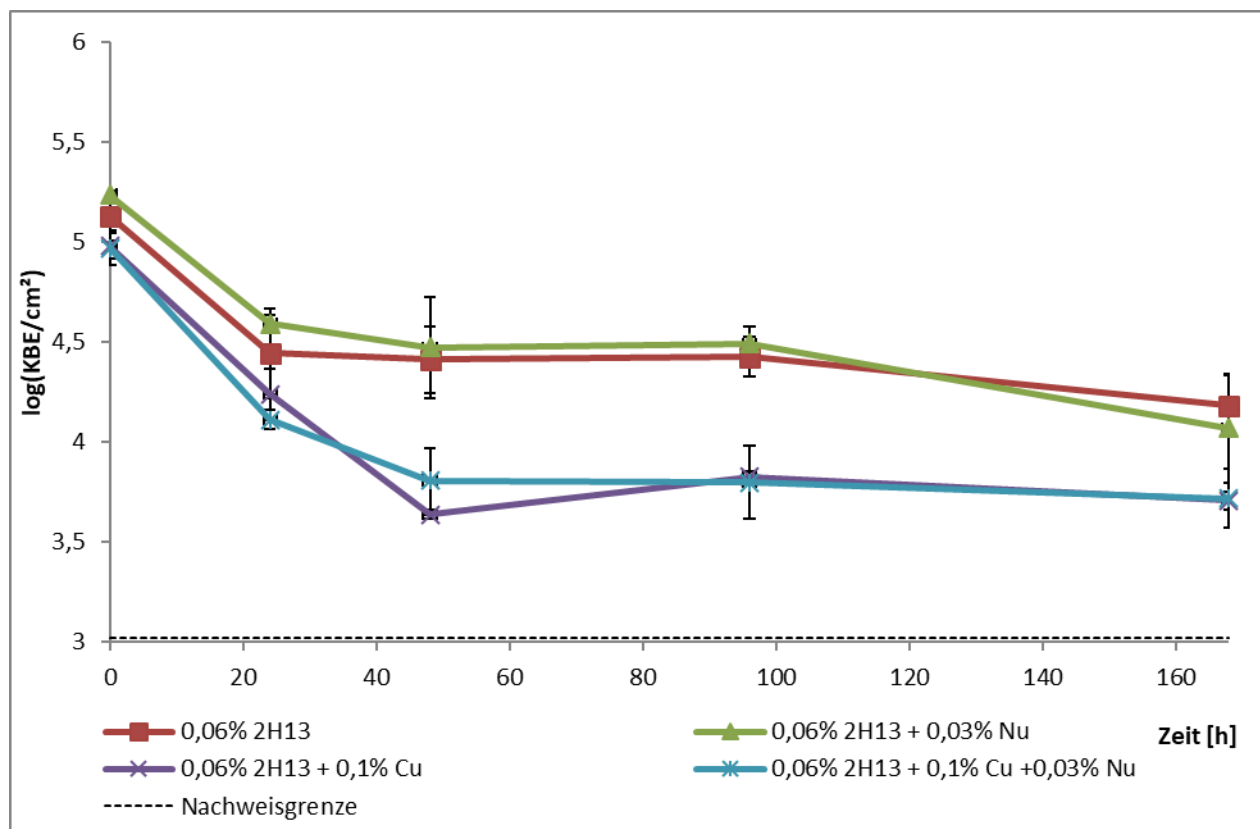


Abbildung 22: Abundanz von 2H13 [$\log(\text{KBE}/\text{cm}^2)$] auf Kartoffeltopfpflanzen über einen Zeitraum von sieben Tagen.

Cu: Bordoflow new; Nu: Nu-film P. Die unbehandelte Kontrolle lag zu jedem Versuchszeitpunkt unter der Nachweisgrenze.

Auch in diesem Versuch blieb unklar, ob der Rückgang der abgewaschenen Zellzahlen auf das Absterben von 2H13 auf der Pflanzenoberfläche beruht oder auf bessere Anhaftung, so dass diese Daten wenig zur Aufklärung des Wirkmechanismus beitragen. Es konnte nicht geklärt werden, ob die Etablierung von 2H13 auf der Pflanzenoberfläche für die Wirksamkeitsverbesserung der Kupferpräparate notwendig ist.

4.6 AP7-Wirksamkeit in Pathosystemen

4.6.1 Klimakammerversuche gegen *P. cubensis* an Gurke

In einem Unterauftrag führte das JKI Institut für biologischen Pflanzenschutz 5 Versuche mit jeweils 12 Varianten zur Prüfung der Wirksamkeit von 2H13 mit niedrigen Kupferkonzentrationen gegen *P. cubensis* an Gurkentopfpflanzen durch.

Im Juni 2018 wurde 2H13 (V9) in verschiedenen Konzentrationen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen von Cuprozin progress geprüft (Abbildung 23).

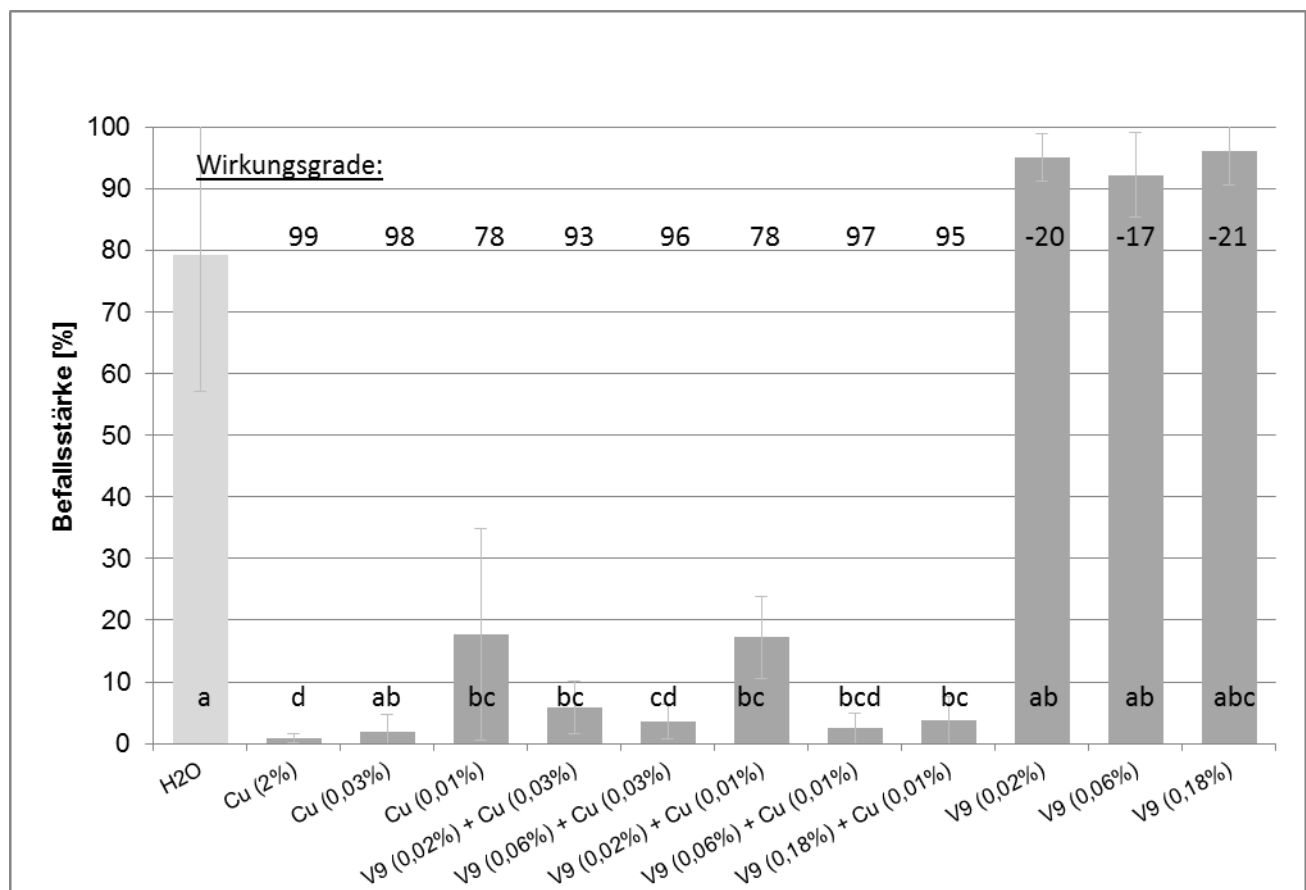


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichung der Befallsstärke mit *P. cubensis* auf Blättern von Gurkentopfpflanzen im Klimakammerversuch.

Cu: Cuprozin progress. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$). Wirkungsgrade (%) für die einzelnen Behandlungen sind angegeben.

Bei hoher Befallsstärke reduzierte nur 2% Cuprozin progress den Befall signifikant um 99%. 0,03% Cuprozin progress oder 0,01% Cuprozin progress waren trotz hoher Wirkungsgrade von 98% und 78% nur tendenziell wirksam. Der hohe Wirkungsgrad von 98% von 0,03% Cuprozin progress konnte durch Zugabe von 2H13 nicht verbessert werden. Die Wirksamkeit von 0,01% Cuprozin progress wurde durch 0,06% V9 oder 0,18% V2 tendenziell verbessert auf das Niveau von der höheren Kupferkonzentration. V9 hatte in keiner der getesteten Konzentrationen eine Eigenwirkung (Abbildung 23), wodurch sich eine Listung als Zusatzstoff anbieten würde.

Im Versuch im Oktober 2019, wurde V9 (0,06%) mit einer höheren Konzentration von Cuprozin progress (0,1%) bzw. Bordeauxbrühe (Bordoflow, 0,2%) kombiniert angewendet. Hier wurde zusätzlich geprüft, ob das Verhindern des Abtrocknens des Belags nach der Applikation bis zur Inokulation einen Einfluss auf die Wirksamkeit hat. Die anhaltende Feuchtigkeit auf den Blättern, sollte die Etablierung von 2H13 und dessen Wachstum ermöglichen (siehe Glp. 4.5.1).

Im Vergleich zur Wasserkontrolle reduzierten die vier Kupfervarianten (Cuprozin progress 4%, 0,1% und Bordoflow 4%, 0,2%) den Befall signifikant, wobei die geringere Konzentration von Cuprozin progress (0,1%) den signifikant schlechtesten Wirkungsgrad aufwies (Abbildung 24).

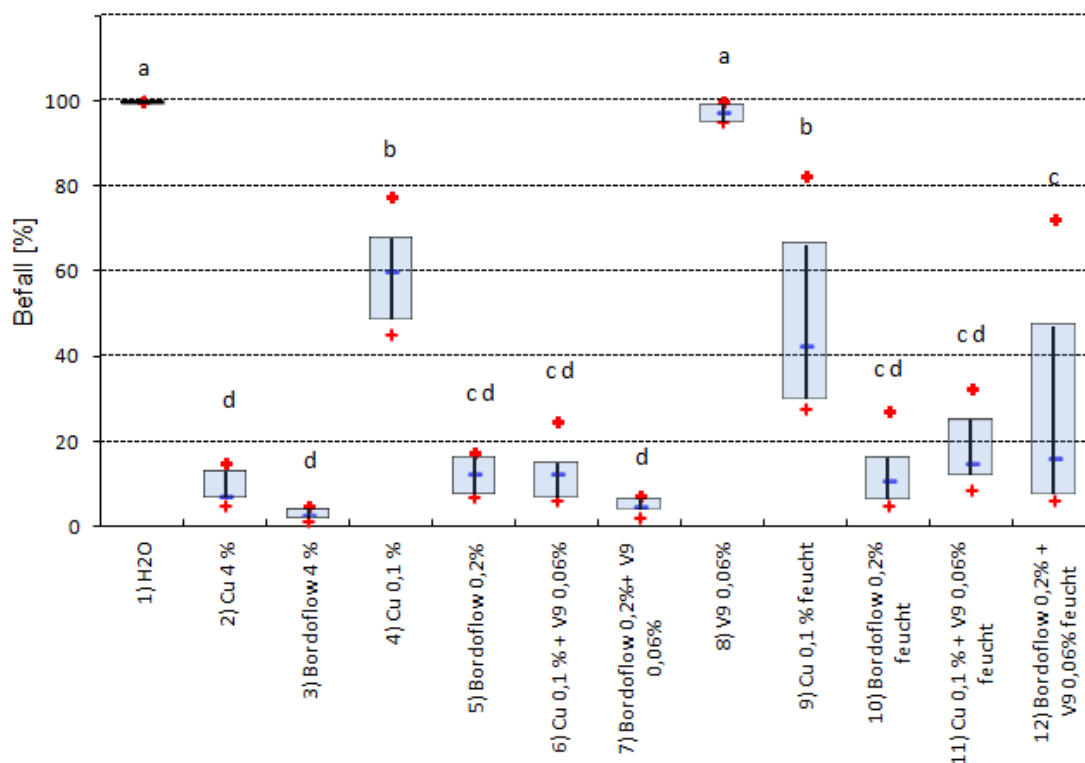


Abbildung 24: Box-Plots der Boniturwerte der befallenen Blattfläche nach protektiven Behandlungen mit Cuprozin progress, Bordoflow und 2H13 (V9) sowie Kombinationen dieser Präparate gegen den *P. cubensis* an getopften Gurken.

H₂O: mit Wasser behandelte Kontrolle, - : Median, Box : 25% bzw. 75% Perzentil, + : Minimum bzw. Maximum.

Alleinige Anwendung von V9 (0,06%) konnte den Befall nicht signifikant reduzieren. Alle Kombinationen von V9 mit Cuprozin progress (normale Versuchsanstellung oder 100% Luftfeuchte nach Applikation) und Bordoflow (normal Versuchsanstellung) wiesen einen hohen Wirkungsgrad auf und reduzierten den Befall um 85-95%. Die Kombination von Bordoflow 0,2% + V9 0,06% feucht war jedoch signifikant schlechter wirksam als diese Variante ohne Aufstellung bei 100% Luftfeuchtigkeit. Die anderen Varianten mit 2H13 und Kupfer, bei denen die Pflanzen nach der Behandlung bei 100% Luftfeuchte bis zur Inokulation aufgestellt wurden, wiesen eine tendenziell - aber nicht signifikant - schlechtere Wirkung auf als ohne feuchte Aufstellung (Abbildung 24). Die feuchten Bedingungen, unter denen sich 2H13 auf den Blättern besser etablieren sollte, haben also nicht zu einer Wirkungssteigerung geführt.

Zur Untersuchung der Regenbeständigkeit wurde mit V11 (produziert in Melassemedium) eine weitere Formulierung von 2H13 im Vergleich zu V9 getestet. Hier wurde die Kombination mit Cuprozin progress mit und ohne Beregnung und in der Beregnungsvariante zusätzlich die Kombination mit einem Netzmittel (Nu-Film) geprüft. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Zugehörigkeiten zu den homogenen Untermengen sind mit den Buchstaben a-f gekennzeichnet. Obwohl sich einige Werte der beiden negativ-Kontrollen H₂O NB (nicht beregnet) H₂O B (beregnet) überschneiden, unterschieden sich diese signifikant voneinander. Bei Anwendung der hohen Kupfermenge (2% Cuprozin progress; (CU 2%)) führte die künstliche Beregnung mit 15 mm zu keinem Wirkungsverlust, während die Beregnung bei der Anwendung von 0,01% Cuprozin progress (CU) zu einem signifikanten Wirkungsabfall führte. Der Zusatz von Nufilm P zu der niedrigen Kupfermenge (Cu + Nuf B) verstärkte den Abwaschungseffekt signifikant. Der Befall war vergleichbar zu dem in der Wasserkontrolle ohne Beregnung (H₂O NB). Die Formulierungen V9 und V11 in Kombination mit Cuprozin progress 0,01% (CU + V9; CU + V11) unterschieden sich in keiner Variante (B oder NB) statistisch voneinander, bei der Kombination mit V11 waren jedoch die Einzelwerte des Befalls jeweils weiter gestreut als bei Kombinationen mit V9. Die Zugabe von Nufilm P zu V9 und V11 in Kombinationen mit 0,01% Cuprozin progress unter Beregnung (CU + V9 + Nuf B; CU + V11 + Nuf B) führte zu keinen signifikanten Befallsunterschieden im Vergleich zu den beregneten Kombinationen ohne Nufilm P Zusatz (CU + V9 B; CU + V11 B). Auch hier war jedoch nach Zugabe von Nufilm P tendenziell eine breitere Streuung der Einzelwerte zu beobachten.

Ohne Beregnung führte die Kombination von V9 und V11 mit der geringen Kupfermenge (0,01% Cuprozin progress) (CU + V9 NB); CU + V11 NB) zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Anwendung von Cuprozin progress 2% (CU 2% NB). Unter Beregnung war die Wirkung der entsprechenden Kombinationen (CU + V9 B; CU + V11 B) jedoch signifikant schlechter als die Wirkung der hohen Kupferkonzentration (CU 2% B).

In diesem Versuch wurde die Regenfestigkeit der niedrigen Kupferdosierung durch 2H13 signifikant verbessert. Der Einsatz von in Melasse produziertem V11 ergab keinen Vorteil im Vergleich zum in Hefeextrakt produziertem V9. Da die Produktion von V11 vor allem im Downstream processing problematisch war, wird diese Formulationsvariante nicht weiterverfolgt.

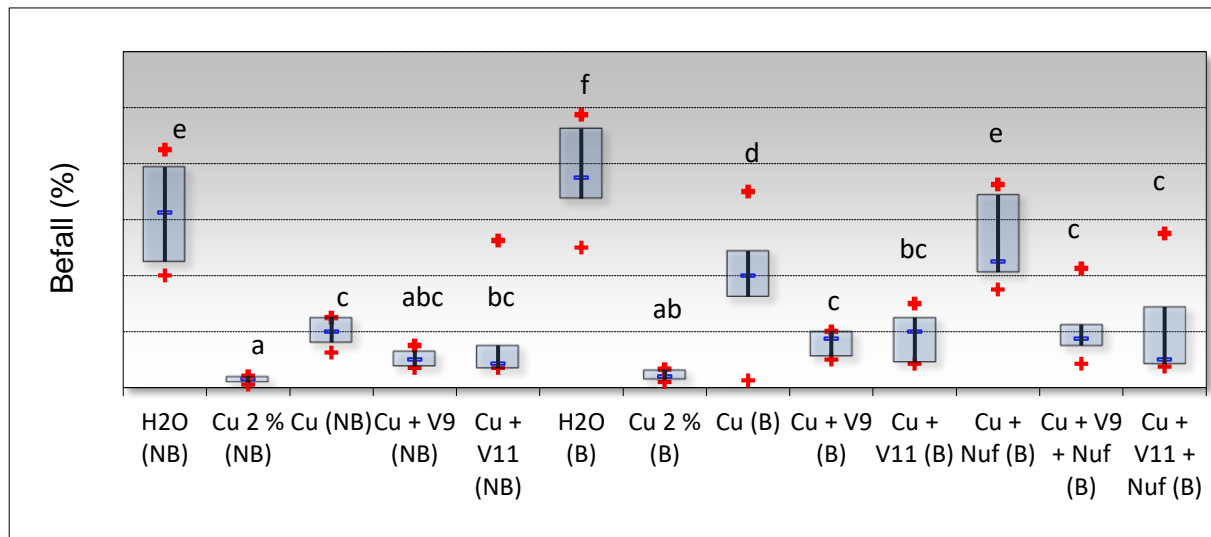


Abbildung 25: Boxplots der Boniturwerte der 13 Varianten von mit falschem Mehltau befallenen Gurkenblättern nach Behandlung mit Wasser, Cuprozin (2 versch. Konzentrationen), ggf. zusätzlich je dem Hefestamm 2H13 (ggf. zusätzlich einem Netzmittel (Nufilm P) mit oder ohne anschließende Beregnung.

(NB): nicht beregnet; (B): beregnet mit 15 mm; Cu 2%: Cuprozin progress 2%; Cu: Cuprozin progress 0,01%; V9: Hefestamm: 2H13 Formulierung V9; V11: Hefestamm: 2H13 Formulierung V11; Nuf: Nufilm, -: Median, Box: 25% bzw. 75% Perzentil, +: Minimum bzw. Maximum.

Wie bereits in den Versuchen an Tomaten- oder Kartoffeltopfpflanzen ergaben sich auch in den Gurkenversuchen nicht immer signifikanten Unterschiede. Deshalb wurde für Varianten, die in mehreren Versuchen getestet wurden eine Metaanalyse gerechnet.

0,03% Cuprozin progress wurde in 10 Versuchen jeweils solo oder mit 2H13 eingesetzt. Vergleicht man die Wirkungsgrade der beiden Varianten miteinander, verbesserte 2H13 die Kupferwirkung signifikant im Durchschnitt um 13%. Bei 0,01% Cuprocin progress ergab sich in 15 Versuchen eine signifikante Verbesserung um 21%.

Insgesamt zeigten die Versuche an Gurken, dass die Formulierung des Hefestamms 2H13 (V9 0,06%) in Kombination mit niedrigen Konzentrationen an Kupfer (Cuprozin progress 0,01% bis 0,1% bzw. Bordoflow 0,2%) zu Wirkungsgraden führte, die mit der alleinigen Anwendung von hohen Kupferkonzentrationen (Cuprozin progress 2% oder 4% bzw. Bordoflow 4%) vergleichbar waren. Für die Kombination von V9 0,06% mit Cuprozin progress 0,01% konnte in einem ersten Versuch mit simuliertem Niederschlag (15 mm) eine gute Regenbeständigkeit gezeigt werden.

Tabelle 11: Metaanalyse zur Verbesserung der Wirksamkeit von Cuprozin progress durch die Zugabe von 2H13 (0,02%, 0,06%, 0,18%) gegen *P. cubensis*.
 p=Überschreitungswahrscheinlichkeit im gepaarten T-Test.

	Anzahl der Versuche	Befallstärke	
		Mittelwert Wirkungsgrad (%)	p
0,03% Cuprozin progress	10	58	0,0086
0,03% Cuprozin progress + 2H13	10	71	
0,01% Cuprozin progress	15	53	0,002
0,01% Cuprozin progress + 2H13	15	74	

In der Bekämpfung von *P. cubensis* an Gurke stellt die in diesem Projekt erarbeitete Formulierung von 2H13 einen vielversprechenden Kombinationspartner zur Reduktion des Einsatzes von Kupferpräparaten im Pflanzenschutz dar.

4.6.2 Klimakammerversuche gegen *P. viticola* an Topfreben

In einem Unterauftrag führte das FiBL in Frick 3 Versuche mit jeweils 18 Varianten zur Prüfung der Wirksamkeit von 2H13 mit niedrigen Kupferkonzentrationen gegen *P. viticola* an Rebensämlingen durch. Im ersten Versuch wurden je zwei Dosierungen von Cuprozin progress mit je 3 Dosierungen von 2H13 V9 mit und ohne Beregnung geprüft.

Über 80% der gesamten Blattflächen waren in der Wasserkontrolle mit Falschem Mehltau befallen. Kocide opti in beiden Konzentrationen und Cuprozin progress 0,1%ig eingesetzt reduzierten den Befall signifikant um über 97%. Die niedrige Cuprozin progress Konzentration (0,03%) hatte bei einem Wirkungsgrad von 84% hingegen keine signifikante Wirkung. Durch die Beregnung verschlechterte sich die Wirkung der beiden Konzentrationen von Cuprozin progress tendenziell. Die Zugabe von 2H13 in verschiedenen Konzentrationen verbesserte die Wirkung von Cuprozin progress in keinem Fall signifikant. Tendenzuell verbesserten 0,18% V9 die Wirkung von 0,03% Cuprozin progress ohne Regen und 0,06% V9 die Wirkung von 0,03% Cuprozin progress nach Beregnung.

Auch in zwei weiteren Versuchen an Rebensämlingen, in denen die Behandlung mit Cuprozin progress und 2H13 4 Stunden oder 4 Tage vor der Beregnung und der Inokulation erfolgte, konnte 2H13 die Regenfestigkeit von Cuprozin progress und somit die Wirksamkeit nach Beregnung nicht verbessern.

Insgesamt konnte an den Rebensämlingen die Zusatzwirkung von 2H13 zu niedrigen Kupferdosierungen gegen *P. viticola* nicht gezeigt werden. Weder mit noch ohne Beregnung.

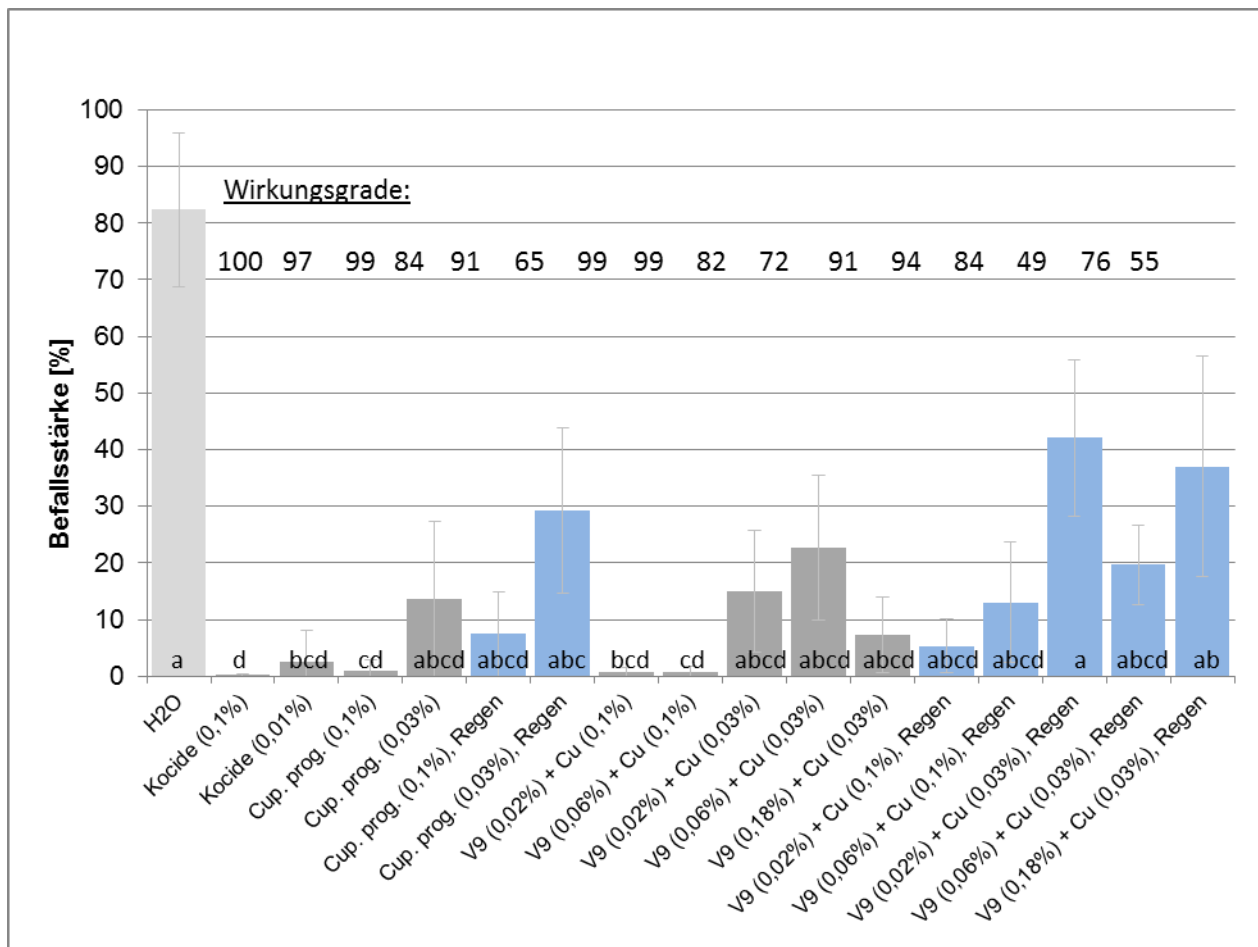


Abbildung 26: Mittelwerte und Standardabweichung der Befallsstärke mit *P. viticola* auf Blättern von Rebensämlingen im Phytokammerversuch.

Cu: Cuprozin progress. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$). Wirkungsgrade (%) für die einzelnen Behandlungen sind angegeben.

4.7 AP8-Integration in Spritzpläne

Da in allen Zielkulturen (Tomaten, Kartoffel, Weinbau, Gemüsebau) neben den Oomyceten auch andere Krankheiten und Schädlinge mit Pflanzenschutzmitteln bekämpft werden, wurde die Verträglichkeit von 2H13 mit anderen Präparaten getestet. Dazu gehören in den Zielkulturen eingesetzte biologische Pflanzenschutzmittel, biologische Zusatzstoffe, Pflanzenstärkungsmittel und Dünger. Die Verträglichkeit seitens des 2H13-Präparates wurde untersucht, indem die Überlebensrate der Hefe nach Mischung mit dem zu testenden Mittel in Anwendungskonzentration und Inkubation für 2 Stunden ermittelt wurde. Ein Präparat galt als mischbar, wenn die Überlebensrate von 2H13 im Vergleich zur Wasserkontrolle $>60\%$ war (Wirkungsgrad $<40\%$).

Tabelle 12: Wirkstoff, Wirkstoffgehalt und im Mischbarkeitstest eingesetzte Konzentration (Konz.) der Präparate sowie deren Wirkung auf 2H13 (WG%).

Mischbare Präparate (WG<40%) sind grün unterlegt, Nicht mischbare Präparate (WG>40%) sind rot unterlegt.

Präparat	Konz. (%)	Wirkstoff	Wirkstoffgehalt [g/kg] ; [g/l]	Kupferkonz. g Cu/l	Mittelwert WG%
Atempo (Cueva)	0,25	Kupferoktanoat	100	0,025	25
Bordoflow (new)	0,4	Kupferkalk (Bordeauxbrühe)	124	0,05	18
Calciumchlorid	4	CaCl	1000		7
Cocana	0,1	Kaliseife			10
CropCover CC-100	0,4	Modifizierte Stärke	100		17
Cuprocin progress	1,5	Kupferhydroxid	383	0,375	32
Delfin	0,3	Bacillus thuringiensis spp. kurstaki			9
Dipel	0,16	Bacillus thuringiensis spp. kurstaki Stamm ABTS-351	33,2		-18
Flowbrix	0,415	Kupferoxychlorid	638,7	0,26	35
Helioterpen Film	0,4	Oligomere von alpha-Pinen	500-1000		31
Karate Zeon	0,025	Lambda-Cyhalothrin	100		6
Kocide opti	1,17	Kupferhydroxid	461	0,351	37
Kocide opti	0,6	Kupferhydroxid	461	0,18	16
MycoSin	1	Aluminiumsulfat + Schachtelhalmextrakt			21
MycoSin Vin	1	Aluminiumsulfat + Schachtelhalmextrakt			32
NeemAzal-T/S	0,2	Azadirachtin	10,6		0
Netzschwefel Stulln	0,9	Schwefel	796		20
Nu-Film P	0,12	Polymerisiertes Pinienöl	960		20
Piretro verde	0,3	Pyrethrine-Öl	18,6		13
SpinTor	0,08	Spinosad	480		13
Spruzit schädlingfrei	1	Pyrethrine + Rapsöl	4,59 + 825,3		9
Squall	1	Polyethylenglykol	50		22
VitiSan	0,5	Kaliumhydrogencarbonat	994,9		-2
XenTari (WG)	0,1	Bacillus thuringiensis aizawai	540		5
Airone WG	0,02	Kupferoxychlorid + Kupferhydroxid	235,3 + 215	0,009	81
Atempo (Cueva)	2	Kupferoktanoat	100	0,036	56
Bordoflow (new)	0,8	Kupferkalk (Bordeauxbrühe)	124	0,1	62

Präparat	Konz. (%)	Wirkstoff	Wirkstoffgehalt [g/kg] ; [g/l]	Kupferkonz. g Cu/l	Mittelwert WG%
Curatio	1,6	Calciumpolysulfid (Schwefelkalk)			100
Flowbrix	0,83	Kupferoxychlorid	638,7	0,32	58
Funguran progress	0,5	Kupferhydroxid	537	0,27	49
Heliosol	0,2	Terpenalkohol	665		60
Kumar (Armicarb)	0,5	Kaliumhydrogencarbonat	850		78
Mycosin	4	Aluminiumsulfat + Schachtelhalmextrakt			93
Neu 1143F	4	Pelargonsäure			100
Prev AM	0,1	Orangenöl	60		99
Scoubi	0,12	Kupferhydroxid	339	0,04	68

36 Präparate wurden getestet, von denen 25 in der getesteten Anwendungskonzentration mit 2H13 mischbar waren und 11 nicht (Tabelle 12). 2H13 kann in Tankmischung mit Netzschwefel Stulln, Vitisan (Kaliumhydrogencarbonat), Cocana (Kaliseife), verschiedenen Insektiziden und Netzmittel ausgebracht werden. Mit Curatio (Schwefelkalk), Kumar (formuliertes Kaliumhydrogencarbonat) oder PrevAM (Orangenöl) war 2H13 jedoch nicht mischbar (Tabelle 12).

Bei den Kupferpräparaten ergaben sich konzentrationsabhängige Mischbarkeiten, so dass für jedes Kupferpräparat eine maximale Dosis beim Einsatz in Kombination mit 2H13 erarbeitet werden musste. Cuprozin progress (Kupferhydroxid) konnte bis zu einer Konzentration von 1,5% mit 2H13 gemischt werden, wogegen Bordoflow new (Kupferkalk) nur bis zu einer Konzentration von 0,4% mischbar war. Die maximale mischbare Dosierung war dabei nicht nur von der Konzentration an metallischem Kupfer im Ansatz abhängig, sondern auch von der Formulierung des Präparates. Im Cuprozin progress verfrucht 2H13 0,375 g Cu/l, während im Bordoflow new nur 0,05 gCu/l verträglich war und im Atempo bereits 0,036% Cu/l zu einer Hemmung von 2H13 führte.

Durch die unterschiedlichen Verträglichkeiten mit Kupferpräparaten wird die Erstellung einer allgemeingültigen Anwendungsempfehlung für den Zusatzstoff 2H13 schwierig. Es müssen detaillierte Mischbarkeitstabellen erstellt und kommuniziert werden.

4.8 AP9-Stammcharakterisierung

In diesem Arbeitspaket wurden stammspezifische Merkmale für 2H13 erfasst und Methoden entwickelt um 2H13 selektiv von anderen Hefearten und von anderen Stämmen der Art *M. guilliermondii* zu unterscheiden. Verglichen wurde 2H13 dabei mit einer Stammmischung von *Aureobasidium pullulans*, da diese im Labor der Bio-Protect häufig verwendet wird, und mit zwei

Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae*, die bei der Firma Agrano in der gleichen Produktionsanlage produziert wurden. Die Unterscheidung von 2H13 von diesen Arten ist notwendig für die Qualitätskontrolle (siehe Glp. 4.2) und auch für die Laborarbeit. Zusätzlich wurden bei der DSMZ 4 Stämme von *Meyerozyma guilliermondii* bestellt, um stammspezifische Eigenschaften innerhalb der Art zu definieren.

Der Stamm DSM6381 bildete birnenförmige, kettenbildende Zellen, die sich von den leicht ovalen Blastosporen der anderen *M. guilliermondii* Stämme unterschieden. Trotzdem wurde durch ITS-Sequenzierung die Art *M. guilliermondii* für DSM6381 bestätigt. DSM12249 bildete im Gegensatz zu den anderen Stämmen charakteristische, hügelige Kolonien auf YM-Agar. Für DSM12249 ergab die ITS-Sequenzierung die Art *Pichia manshurica*, so dass dieser Stamm in den weiteren Untersuchungen unter diesem Artnamen geführt wurde.

Für 2H13 und Vergleichshefen wurde verschiedene Charakteristika erfasst, das Temperaturspektrum für Wachstum auf Agarplatten ermittelt sowie ein Antimykotigram, anhand des Wachstums der Stämme auf Agar mit verschiedenen Antimykotika, erstellt (Tabelle 13). Insgesamt wurden die Hefestämme auf 15 Antimykotika/Fungiziden getestet und auf drei Selektivnährböden. Das Antimykotikum Fluconazol hat sich, aufgrund seiner inhibitorischen Eigenschaften auf 2H13, als geeignet für die Qualitätskontrolle herausgestellt (siehe Glp. 4.2.1).

Tabelle 13: Vergleich von Hefestämmen der Arten *Meyerozyma guilliermondii* (Mg), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Pichia manshurica* (Pm) und *Aureobasidium pullulans* (Ap) in Bezug auf Ihre Wachstumsbedingungen und Sensitivität gegenüber Antimycotica und Fungiziden.

MIK: Minimale inhibitorische Konzentration in ppm. ++: Wachstum wie in der Kontrolle; +: reduziertes Wachstum, -: kein Wachstum; nb = nicht bestimmt.

Eigenschaften	2H13	DSM 6381	DSM 70051	DSM 70057	CH 780	CH 771	DSM 12249	Blossom Protect
Spezies	Mg	Mg	Mg	Mg	Sc	Sc	Pm	Ap
Zellgröße [µm]	3,8	5,1	3,6	3,6	nb	nb	nb	nb
Kolonieform auf YM	oval, weis	birnenf., kettenbildend	oval, weis	oval, weis	oval, weis	oval, weis	hügelig, langsam	Creme, oval, mit Hyphen
8°C auf YM (7d)	++	-	+	+	++	nb	-	+
25°C auf YM (2 d)	++	++	++	++	++	++	++	++
37°C auf YM (3 d)	++	+(7d)	++	++	++	++	++	-
40°C auf YM (7 d)	+	-	++	++	-	-	++	-
Cycloheximid in YM Agar, MIK	100	10	100	100	0,3	0,3	10	2
Nipagin M in YM Agar, MIK	1.000	>1000	>1000	>1000	1.000	nb	nb	300

Eigenschaften	2H13	DSM 6381	DSM 70051	DSM 70057	CH 780	CH 771	DSM 12249	Blossom Protect
Amphotericin B in YM Agar, MIK	>30	<30	>30	>30	>10	>10	>30	>10
0,2% Electis (Zoxamide-+Mancoceb) in YM	-	-	-	-	nb	nb	nb	nb
Difenoconazol (als Score in YM); MIK	>3.000	>1000	>1000	>1000	<100	nb	nb	<100
Penconazol (als Topas in YM); MIK	300	>300	>300	>300	<100	nb	nb	<100
Fluconazol in YM; MIK	3000	<1.000	<1.000	<1.000	>3.000	>3.000	<1.000	<1.000
Flucytosin in YM; MIK	<100	<100	<100	<100	<100	nb	nb	<100
0,1% Prolectus (Fenpyrazamine) in YM	++	++	+	+	++	++	nb	++
10 ppm Trifloxystrobin in YBA+SHAM	++	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
16 ppm Cyprodinil in SA	++	++	++	++	+	nb	nb	nb
10 ppm Fenhexamid in SA	++	++	++	+	++	nb	nb	nb
1 ppm Fludioxinil in SA	++	++	++	++	++	nb	nb	nb
50 ppm Boscalid in YBA	++	nb	nb	nb	+	nb	nb	nb
10 ppm Fluopyram in YBA	++	nb	nb	nb	++	nb	nb	nb
McConkey Agar (Kolonieform/farbe)	++ groß, rosa	++ dunkel-rosa	++ klein rosa	+ raue Oberfläche, gelb	+ klein, dunkel rot	+ klein, rot	-	++ sternförmig, rosa
DRBC-Agar (Kolonieform/farbe)	++ klein, rosa	nb	nb	nb	++ rosa	+ klein, rosa	nb	+ klein, rosa, kaum Hyphen
Candida Chromogen Agar (Kolonieform/farbe)	+ normal	nb	nb	nb	++ weis, schwarzer Punkt	++ weis	nb	+ weis, keine Hyphen
Anaerob in Traubensaft	-	nb	nb	nb	++	++	nb	-

Um 2H13 selektiv von Hefen der Art *S. cerevisiae* und *A. pullulans* zu unterscheiden eignet sich Agar mit 30 ppm Cycloheximid oder mit bis zu 3.000 ppm Difenoconazol. Auf beiden Medien wuchs nur *M. guilliermondii*. So dass diese Medien für die selektive Rückisolierung von 2H13 von Pflanzen verwendet wurden (siehe Glp. 4.5.1). Um 2H13 selektiv zu hemmen eignete sich Agar mit Zugabe von 3.500 ppm Fluconazol, da 2H13 hier nicht mehr wuchs, aber *S. cerevisiae* noch wuchsen. Die Arten konnten auch auf McConkey Agar anhand der Kolonieförmigkeiten unterschieden werden (Abbildung 27; Tabelle 13).



Abbildung 27: Kolonien von 2H13 (groß, rosa) und CH771 (klein, dunkelrot) auf McConkey Agar nach 14 Tagen Inkubation bei 25°C.

Die Abgrenzung zwischen 2H13 und den anderen Stämmen von *M. guilliermondii* war schwieriger. Die Stämme bildeten allerdings auf McConkey Agar unterschiedliche Kolonieförmigkeiten aus. 2H13 bildete große, rosafarbene Kolonien, während die anderen Stämme kleinere rosa bis rote Kolonien bildeten. Die Empfindlichkeit von 2H13 gegen Fluconazol und die charakteristische Kolonieförmigkeit auf McConkey kann für die Qualitätskontrolle (siehe Glp. 4.2.1) verwendet werden.

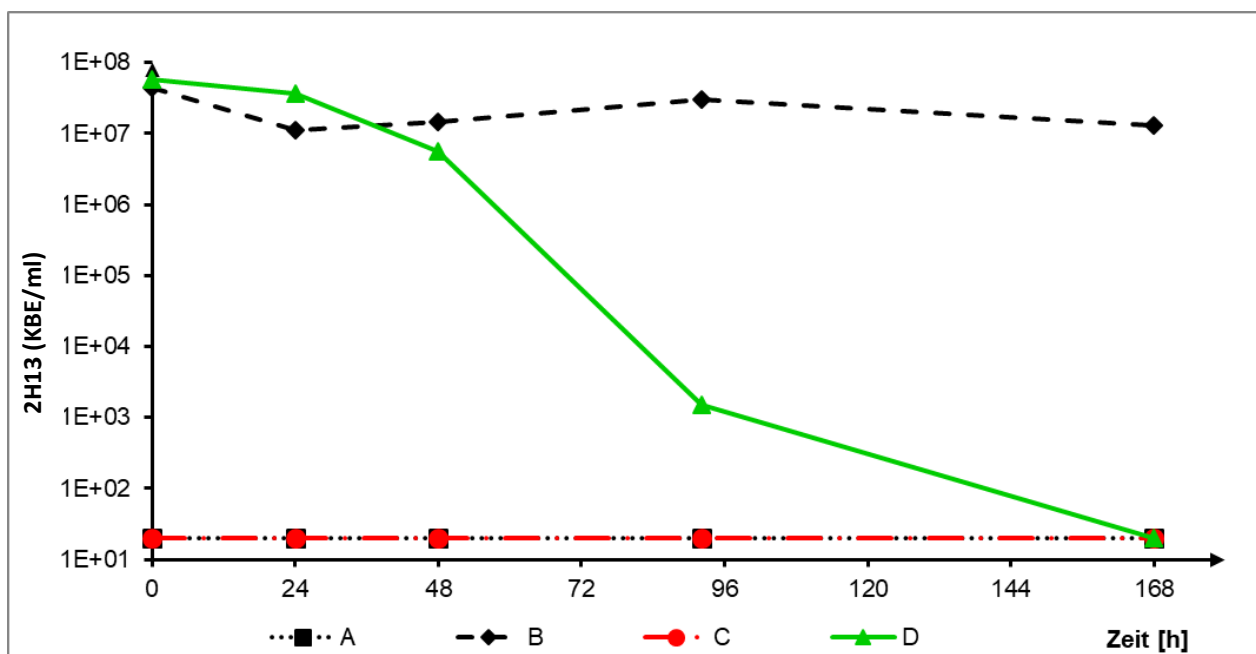


Abbildung 28: Entwicklung der Lebendzellzahl von 2H13 in Traubensaft unter anaeroben Bedingungen.

Kontrollansatz (A) ohne Inokulat, Ansatz B mit 5E+7 KBE/mL 2H13, Ansatz C mit 1E+6 KBE/mL CH771 und Ansatz D mit 5E+7 KBE/mL 2H13 und 1E+6 KBE/mL CH771.

Wegen des geplanten Einsatzes von 2H13 im Weinbau, wurde seine Fähigkeit zur alkoholischen Gärung bzw. der Einfluss auf den Gärprozess von Weinhefen untersucht (Schild, 2019). Der Gärversuch wurde in Merlot Traubensaft durchgeführt. Dieser wurde in Flaschen mit Gärröhrchen gefüllt und mit verschiedenen Hefen inokuliert. Nach Inokulation wurden die

Parameter Lebendzellzahl, Gewichtsverlust, Alkoholgehalt und Zuckergehalt überwacht um eine Aussage über mögliches Wachstum und Gärverhalten zu treffen. Proben wurden mit einer sterilen Kanüle durch das Septum der Versuchsflaschen genommen. Vor der Alkohol- und Zuckermanalyse wurden die Proben zentrifugiert. Nach Beendigung des Versuches wurde der Traubensaft der Versuchsflaschen auf Begleitalkohole untersucht.

2H13 überlebte zwar die anaeroben Bedingungen in den Gäransätzen über den Versuchszeitraum von 7 Tagen, vermehrte sich aber nicht (Abbildung 28) und bildete keinen Alkohol (Tabelle 14). Weder das Wachstum von *S. cerevisiae* in den Gäransätzen noch der Gärverlauf wurden durch die Zugabe von 2H13 negativ beeinflusst. Vielmehr wurde die Lebendzellzahl von 2H13 in den Gäransätzen durch *S. cerevisiae* bzw. durch die Alkoholbildung ab 24 h stark reduziert (Abbildung 28).

Das Ausbringen von 2H13 auf Weinreben und die damit verbundene Möglichkeit, dass 2H13 über behandelte Trauben in den Most und in die Gäransätze gelangt, stellt also keine Gefahr für die alkoholische Gärung und Weinherstellung dar.

Tabelle 14: Alkohole in Traubensaft nach einer Woche unter anaeroben Bedingungen.

Kontrollansatz (A) ohne Inokulat, Ansatz B mit 5E+7 KBE/mL 2H13, Ansatz C mit 1E+6 KBE/mL CH771 und Ansatz D mit 5E+7 KBE/mL 2H13 und 1E+6 KBE/mL CH771.

Substanz	Kontrolle	2H13	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> + 2H13
Ethanol [%]	0,33	0,57	7,98	10,08
1-Propanol [mg/l]	<5	<5	25	21,5
2-Propanol [mg/l]	9,9	5,6	<5	<5
Isobutanol [mg/l]	<5	<5	33	27,5
2-Methyl-1-butanol [mg/l]	<5	<5	9,7	18
3-Methyl-1-butanol [mg/l]	<5	<5	48	66,8
2-Butanon [mg/l]	25,6	16	<5	<5
Ethylacetat [mg/l]	<5	<5	27,5	19,3

4.9 AP10-Weitere Einsatzgebiete

Neben den im Projekt untersuchten Zielpathogenen aus der Gruppe der Oomyceten, gibt es weitere Pflanzenkrankheiten, die mit Kupferfungiziden bekämpft werden. Daraus könnten sich weitere Einsatzgebiete für den Hefestamm 2H13 zur Kupferreduktion ergeben. Zunächst wurde in der Pflanzenschutzmitteldatenbank des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) eine Recherche über zugelassene Kupferpräparate, ihre Inhaltsstoffe sowie deren Anwendungsgebiete durchgeführt und die gefundenen Pathosysteme, die für eine Anwendung von Kupfer + 2H13 in Frage kommen, priorisiert.

Tabelle 15: Übersicht der 6 Pathogene für die eine nähere Untersuchung der Wirkung von Kupfer und 2H13 sinnvoll erschien.

Pathogen	Krankheit/Schadbild	Kultur	Einsatzgebiet	Wirkstoff
<i>Erwinia carotovora</i>	Schwarzbeinigkeit	Kartoffel	Ackerbau	Kupferhydroxid
<i>Stemphylium botryosum</i>	Laubkrankheit	Spargel	Gemüsebau	Kupferhydroxid
<i>Septoria lycopersici</i>	Blattfleckenkrankheit	Tomate	Gemüsebau	Kupferhydroxid
<i>Alternaria solani</i>	Dürrfleckenkrankheit	Tomate	Gemüsebau	Kupferhydroxid
<i>Venturia spp.</i>	Schorf	Kernobst	Obstbau	Kupferhydroxid
<i>Pseudomonas syringae</i>	Pseudomonas syringae	Steinobst	Obstbau	Kupferhydroxid

Als Ergebnis wurden 6 Pathogene ausgewählt, für die eine genauere Untersuchung im Rahmen des Projektes (in abgestufter Priorität) sinnvoll erschien (Tabelle 15). Zu den Pathogenen mit höchster Priorität, *Alternaria solani* (Bussey & Stevenson, 1991; Spletzer & Enyedi, 1999) *Erwinia carotovora* = *Pectobacterium carotovorum* (Düring *et al.*, 1993) sowie *Pseudomonas syringae* (Süle & Seemüller, 1987) wurden mögliche Testsysteme in der Literatur recherchiert. Für *Venturia inaequalis* standen bereits Testsysteme und langjährige Erfahrung zur Verfügung.

4.9.1 Schwarzbeinigkeit an Kartoffeln (*Pectobacterium carotovorum*)

Das Testsystem zur Prüfung der Wirksamkeit von Präparaten gegen *Pectobacterium carotovorum* an Kartoffelscheiben wurde erfolgreich etabliert. Zunächst wurde in der Literatur nach Methoden gesucht, die für diesen Labortest herangezogen werden konnten (Düring *et al.*, 1993a; Baz *et al.*, 2012). Im Laufe der ersten 5 Versuche wurde die Methodik ständig angepasst und danach wurde die Standardmethode festgelegt (siehe Glp. 3.2.6).

P. carotovorum mazeriert das Kartoffelgewebe im Laufe der Infektion, so dass der Gewichtsverlust der Kartoffelscheibe mit dem Befallsfortschritt korrelieren sollte. In ersten Versuchen zeigte sich aber, dass auch nicht inokulierte Kartoffelscheiben ihr Gewicht bei Inkubation in der feuchten Kammer verändern. Um eine quantitative Auswertung trotzdem zu ermöglichen, wurde untersucht, wie sich das Gewicht von Kartoffelscheiben verändert, wenn sie in 0,6% NaCl Lösung vorinkubiert werden. Der physiologische Salzgehalt der Kartoffel beträgt 0,6 %. Nach 2 h Vorinkubation der Kartoffelscheiben in entweder Wasser oder 0,6% NaCl, wurden diese für 2 d bei 25 °C in feuchter Kammer inkubiert (bei Vorinkubation in 0,6% NaCl Inkubation auf 0,6% NaCl getränkten Tüchern, bei Vorinkubation in Leitungswasser (LW) Inkubation auf LW getränkten Tüchern) und die Entwicklung des Gewichts beobachtet (Abbildung 29).

Es zeigte sich, dass Kartoffelscheiben, die in 0,6% NaCl Lösung vorinkubiert wurden ihr Gewicht während der Inkubation nicht signifikant verändert hatten, ganz im Gegensatz zu in

Wasser vorinkubierten Kartoffelscheiben. Die Vorinkubation in 0,6% NaCl Lösung stellte somit eine einfache Möglichkeit dar, den Gewichtsverlauf bei Infektion durch Wiegen zu erfassen, während das Gewicht der Kartoffelscheiben bei Nicht-Infektion konstant blieb.

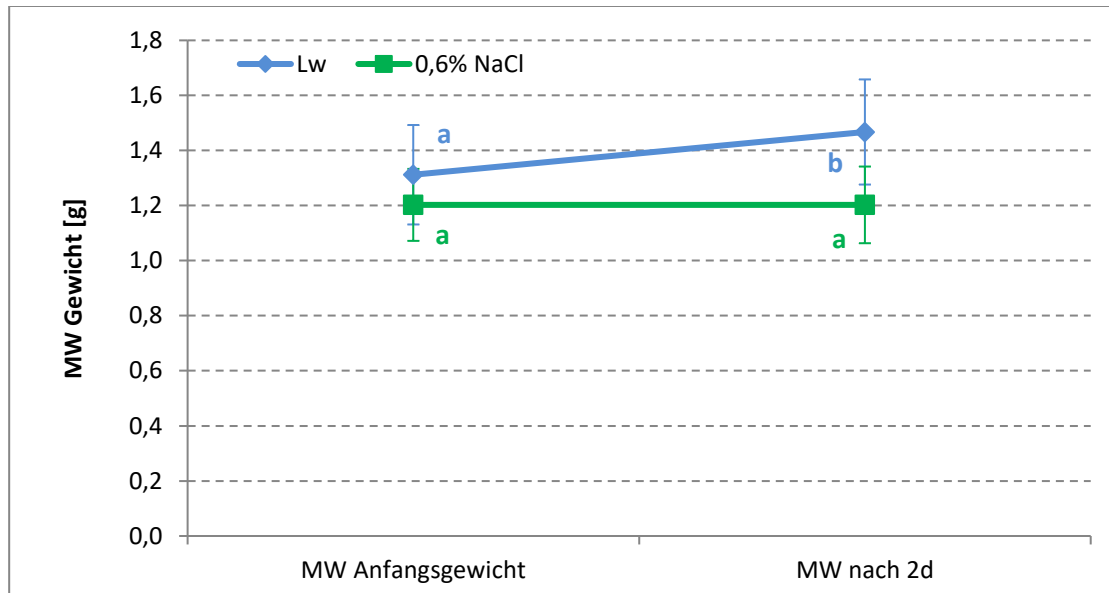


Abbildung 29: Entwicklung des Gewichts von in Wasser bzw. 0,6% NaCl vorinkubierten Kartoffelscheiben nach 2d Inkubation in feuchter Kammer bei 25°C. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede in Student's Ttest. MW: Mittelwert.

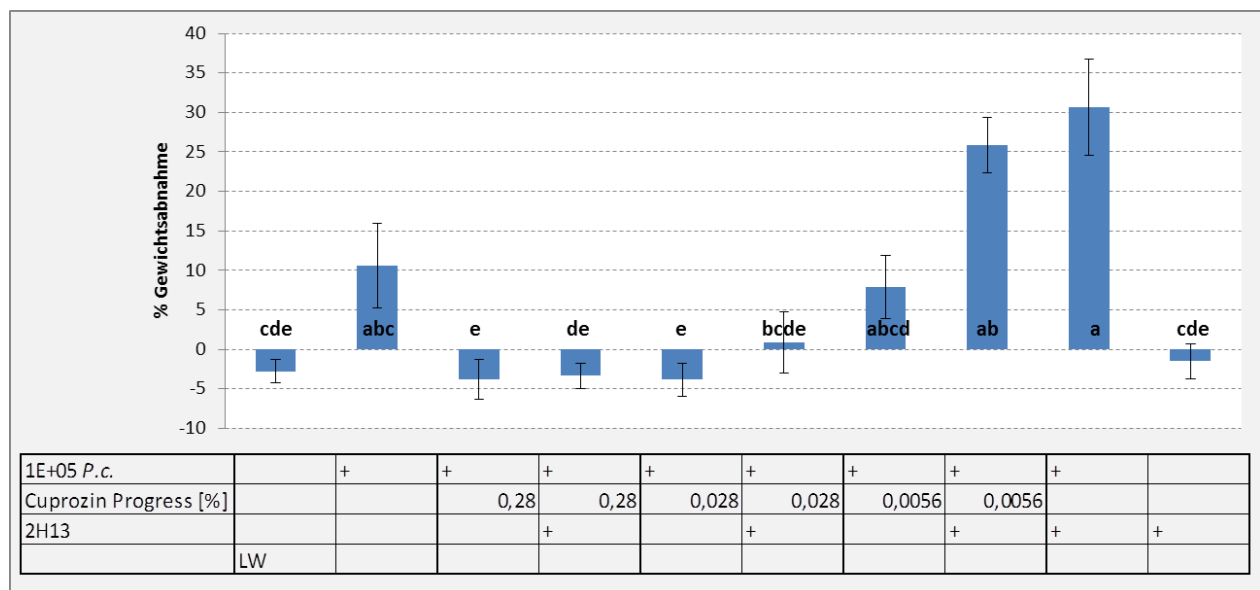


Abbildung 30: Gewichtsabnahme durch *P. carotovorum* Befall bei unterschiedlicher Behandlung. Vorinkubation der Scheiben in 0,6 % NaCl Lösung, Inkubation 2 d bei 25°C auf 0,6% NaCl getränkten Tüchern in feuchter Kammer. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede in Dunn's multiple comparison Test.

Um die mögliche Zusatzwirkung von 2H13 zu Cuprozin Progress zu untersuchen, wurde der Labortest nach der Etablierung mit dem Standardverfahren durchgeführt (siehe Glp. 3.2.6). In den inokulierten Kartoffelscheiben wurde durch die Befallsentwicklung mit *P. carotovorum* ein Gewichtsverlust von ca. 10% gemessen. In nicht inokulierten Kartoffelscheiben oder in mit 0,28% bzw. 0,028% Cuprozin progress behandelten Kartoffelscheiben, gab es eine Gewichtszunahme von 2-3%. Hier fand also keine Infektion durch *P. carotovorum* statt. 0,0056% Cuprozin progress konnte den Befall dagegen nicht mehr signifikant verringern.

2H13 wurde in einer Endkonzentration von 0,06 % eingesetzt und konnte keine Zusatzwirkung zu Cuprozin progress erzielen, sondern verschlechterte die Wirkung tendenziell. Auch die alleinige Anwendung von 2H13 steigerte den Befall mit *P. carotovorum* tendenziell (Abbildung 30).

4.9.2 Apfelschorf (*Venturia inaequalis*)

Für Apfelschorf hat die Bio-Protect GmbH bereits etablierte Testsysteme und es wurden auch im Rahmen eines im BÖLN geförderten Projektes („Erarbeitung einer Gesamtstrategie aus direkten und indirekten Maßnahmen zur Substitution bzw. Reduzierung des Kupfereinsatzes bei der Regulierung von pilzlichen Schaderregern in der ökologischen Kernobstproduktion“) bereits erste Versuche mit der Kombination Kupfer+2H13 durchgeführt. Der Aufwand für die Versuche mit Apfelschorf wurde deshalb nicht im EMKUREDÖL abgerechnet. Die Zugabe von 2H13 zu Cuprozin progress in verschiedenen Kupferdosierungen verbesserte jeweils tendenziell die Wirkung im Vergleich zu Cuprozin progress alleine (Kunz & Hinze, 2018).

Die Metaanalyse von insgesamt 6 Versuchen mit 3 verschiedenen Kupferaufwandmengen zeigt eine signifikante Wirkungssteigerung der Mischung im Vergleich zur Cuprozin progress bei protektiver Applikation 2 Stunden vor Inokulation um 14%. Der Effekt von 2H13 auf die Wirksamkeit von Cuprozin progress war allerdings von der Regenmenge abhängig. Während der Wirkungsgrad von Cuprozin progress durch 2H13 ohne Beregnung und nach 10 mm Beregnung signifikant verbessert wurde, erhöhte sich bei 30 mm Regen die Schwankungsbreite der Ergebnisse stark und führte zu einer tendenziellen Verschlechterung der Wirkung. Die Zugabe von 2H13 zu Haftmitteln und Cuprozin progress reduzierte die Wirksamkeit und kann nicht empfohlen werden.

In insgesamt 6 Freilandversuchen, die im Rahmen des vom BÖLN geförderten Projektes von den Kooperationspartnern Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee, Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie und Öko-Obstbau Norddeutschland durchgeführt wurden, wurde in einer Variante die ausgebrachte Kupfermenge durch Zugabe von 2H13 zu einer reduzierten Aufwandmenge von Cuprozin progress um jeweils 25-40% reduziert. Es erfolgten jeweils 2 Kupferapplikationen vor der Blüte mit anschließendem Schwefeleinsatz. Die Bonitur des Schorfbefalls an den Rosettenblättern ergab bei Wirkungen der Kupferstrategie mit voller

Aufwandmenge (550 – 1188 g Cu/ha) von 87% bis 96% einen durchschnittlichen tendenziellen Wirkungsverlust in der Variante mit 2H13 + reduziertem Kupfer (300 – 890 g Cu/ha) von 1,4%. Bei der Bonitur der Langtriebe war der tendenzielle Wirkungsverlust 5,3% und bei der Fruchtschorfbonitur 5%. Die Zugabe von 2H13 zu einer um 25-40% reduzierten Kupfermenge, konnte also nicht ganz die Wirkung der vollen Kupferaufwandmenge wiederherstellen.

4.9.3 Lagerfäuleerreger im Kernobst

Lagerfäulen im Kernobst werden von verschiedenen Pilzen verursacht, wobei in Deutschland die größten Schäden an Apfel von Erregern aus der Gattung *Neofabraea* verursacht werden. Aber auch *B. cinerea*, Moniliaarten, *P. expansum* und an Birne *Stemphylium vesicarium* treten als Lagerfäuleerreger häufig auf. Diese Erreger kommen auch in anderen Kulturen vor, so dass das Testsystem hier als Modell verwendet wurde, um das Potenzial von 2H13 als Zusatzstoff zu verschiedenen Fungiziden und dem Dünger CaCl zu überprüfen.

Die Bekämpfung von Lagerfäulen im Apfel erfolgt im gleichen Zeitraum wie die Apfelschorfbeeämpfung. Kupferpräparate haben eine gute Wirkung gegen Apfelschorf, jedoch keine ausreichende Wirkung gegen Lagerfäulen. Deshalb sollte hier auch getestet werden, ob durch den Zusatz von 2H13 zu Kupferpräparaten dessen Lagerfäulewirkung verbessert werden kann.

Tabelle 16: Wirkungsgrade (WG) und Synergismusfaktoren (SF) der Mischungen aus 2H13 und dem Prüfmittel gegen das jeweilige Pathogen im Apfelwundtest.

*zeigen signifikante Verbesserung der Wirkung des Prüfmittels durch Zugabe von 2H13 in in Tukey' multiple comparison Test (p<0.05). nb= mit negativen Wirkungsgraden nicht berechenbar.

		0,0125% Geoxe	0,04% Cuprozin progress	0,25% Netz- schwefel Stullin	0,5% Vitisan	0,15% Blossom Protect	1% CaCl	0,01% Flint
<i>N. alba</i>	WG	100	1	80	53	83	71	92
<i>N. alba</i>	SF	1,19	0,04	1,16*	0,75	0,90	0,91*	0,98
<i>B. cinerea</i>	WG	87	18	32	21	44	20	11
<i>B. cinerea</i>	SF	1,60*	0,79	0,68	0,97	0,79	1,18*	0,47
<i>Monilia spp.</i>	WG	100	28	65	15	31	25	88
<i>Monilia spp.</i>	SF	1,00	0,60	1,03	0,36	0,50	1,32	1,09
<i>P. expansum</i>	WG	100	19	15	15	60	12	87
<i>P. expansum</i>	SF	1,00	0,76	0,62	0,89	0,84	0,54	1,41*
<i>S. vesicarium</i>	WG	95	-4	-18	11	-3	-6	61
<i>S. vesicarium</i>	SF	1,00			0,45			4,4*

Von den 7 getesteten Präparaten hatte Cuprozin progress die geringste Wirkung gegen die Lagerfäuleerreger und der Zusatz von 2H13 hatte bei keinem Pilz einen positiven Effekt. Auch

der Zusatz von 2H13 zu Vitisan oder Blossom Protect ergab keine positiven Effekte, obwohl Blossom Protect gegen die Lagerfäuleerreger signifikante Wirkungen zeigte (Tabelle 16).

Die Wirksamkeit von Netzschwefel Stulln gegen *N. alba* und gegen *Monilia* wurde durch die Zugabe von 2H13 verbessert, so dass diese Mischung für den ökologischen Anbau weiterverfolgt werden sollte. Auch die Wirkung von CaCl gegen *N. alba*, *B. cinerea* und *Monilia* wurde durch 2H13 zwar verbessert, war aber für die Anwendung in der Praxis noch zu gering. Bis auf *B. cinerea* war die Zugabe von 2H13 zu Flint effektiv und mit der Mischung wurden hohe Wirkungsgrade erreicht. Die beste Wirkung hatte jeweils die Mischung aus 2H13 und Geoxe. Wenn Geoxe alleine keine 100% Wirkung hatte, führte die Zugabe von 2H13 zu einem synergistischen Effekt, bei *B. cinerea* zu einer signifikanten Verbesserung der Wirkung von Geoxe. 2H13 ist also ein interessanter Zusatzstoff zu Geoxe, vor allem auch in den Kulturen, in denen Botrytisstämmen auftreten, die eine verminderte Sensitivität gegen Fludioxinil zeigen. Diese Stämme sind vor allem im Erdbeeranbau in Deutschland häufig zu finden (Hahn *et al.*, 2013).

4.10 AP11-Pathogenität

4.10.1 Literaturstudie zur Pathogenität von *M. guilliermondii*

Der Hefestamm 2H13 wurde durch die DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen) der Art *Meyerozyma guilliermondii* zugeordnet und wird damit in die Risikogruppe 1 (also unbedenklich für Mensch und Tier) nach den Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) eingestuft. Literaturrecherchen zur Toxikologie und Pathogenität von Stämmen dieser Art waren Bestandteil des Vorläuferprojektes Biotechnoomy. Wie bei vielen anderen Hefearten auch, wurden Stämme der Art *Meyerozyma guilliermondii* bei immunsupprimierten Patienten im Zusammenhang mit Infektionen isoliert. Es ist aber nicht bewiesen, dass Stämme dieser Art tatsächlich die Ursache solcher Entzündungen oder Krankheiten sind. Vielmehr wurde diskutiert, dass eine ubiquitär vorkommende Art wie *M. guilliermondii* längst als Humanpathogen beschrieben wäre, wenn von ihr eine wirkliche Gefahr ausginge.

Um einen Überblick über die Pathogenität verschiedener *M. guilliermondii* Stämme zu erhalten wurde eine intensivere Literaturrecherche durchgeführt. Dabei wurde in vier verschiedenen Suchmaschinen nach unterschiedlichen Wortkombinationen und die Anzahl der Treffer notiert (Tabelle 17). Angegeben ist zusätzlich für wie viele der jeweiligen Treffer zumindest die Zusammenfassung gelesen und bewertet wurde.

Zum Vergleich und zur besseren Einordnung der erhaltenen Treffer wurde die Anzahl Treffer in den verwendeten Suchmaschinen auch für die Suchbegriffe: *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida guilliermondii*, *Pichia guilliermondii*, *Candida albicans* und *Candida albicans*

pathogenicity erfasst (Tabelle 17). Die Treffer wurden nicht näher untersucht. Setzt man die Anzahl Treffer eines Organismus + pathogenicity in Beziehung zur Anzahl der Treffer für den Organismus allein erhält man einen Eindruck davon, wie groß der Anteil an Publikationen über den Organismus ist, in dem auch das Wort Pathogenität auftaucht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Anzahl der Artikel für *M. guilliermondii* bzw. seine Synonyme und für *Candida albicans* sowie für die Kombinationen aus „Artnamen“ und „pathogenicity“ in verschiedenen Datenbanken im August/September 2018.

	Science Direct	Pubmed	Springer link	Google Scholar
“<i>Meyerozyma guilliermondii</i>” + “pathogenicity”	69	5	19	641
“<i>Meyerozyma guilliermondii</i>”	193 = 36 %	81 = 6 %	183 = 10 %	1.510 = 42 %
“<i>Candida guilliermondii</i>” + “pathogenicity”	939	77	290	10.800
“<i>Candida guilliermondii</i>”	2.758 = 34 %	1.162 = 7 %	2.363 = 12 %	22.700 = 48 %
“<i>Pichia guilliermondii</i>”+ “pathogenicity”	386	8	119	3.870
“<i>Pichia guilliermondii</i>”	1.211 = 32 %	333 = 2 %	1.132 = 11 %	10.600 = 37 %
“<i>Candida albicans</i>“+ “pathogenicity”	16.494	4.219	2.931	77.300
“<i>Candida albicans</i>”	51.470 = 32 %	37.698 = 11 %	31.415 = 9 %	681.000 = 11 %

Hierbei zeigte sich, dass die Anteile sich zwischen den Suchmaschinen deutlich unterscheiden. Dies kann sowohl mit der Art der Suche der einzelnen Suchmaschinen zusammenhängen (werden die Suchwörter im gesamten Text gesucht oder nur in Teilen etc.) bzw. mit der Auswahl an Zeitschriften, die die Suchmaschine als Grundlage verwendet.

Kein deutlicher Unterschied bestand jedoch zwischen den Anteilen an Publikationen einer Suchmaschine, in denen auch „pathogenicity“ vorkommt, wenn man *M. guilliermondii* und seine Synonyme mit *Candida albicans* vergleicht. Bei google scholar finden sich anteilig sogar deutlich mehr Publikationen die *M. guilliermondii* (bzw. eines seiner Synonyme) + pathogenicity enthalten (37-48%) als Publikationen, die *C. albicans* + pathogenicity (11%) enthalten.

Die detaillierte Analyse der Treffer für *M. guilliermondii* (bzw. eines seiner Synonyme) + pathogenicity (siehe Analyse ab Abschnitt 2), hat jedoch gezeigt, dass die Tatsache, dass die beiden Suchbegriffe innerhalb eines Artikels vorkommen, keine Aussage darüber zulässt, ob es

in diesem Artikel tatsächlich um die Humanpathogenität von *M. guilliermondii* geht. Oft werden nur Vergleiche mit der pathogenen Art *C. albicans* gemacht, wobei sich dann der Begriff Pathogenität auf *C. albicans* bezieht.

Die Durchsicht der jeweils ersten 25 Treffer aus der Literaturrecherche ergab folgende Bewertung:

M. guilliermondii kann als opportunistisches Pathogen Infektionen auslösen (Cebeci Güler *et al.*, 2017), wurde bei Krebspatienten (Savini *et al.*, 2011; Marcos-Zambrano *et al.*, 2017), HIV Patienten (dos Santos & Soares, 2005), immunsupprimierte Patienten (Marcos-Zambrano *et al.*, 2017) und Patienten nach Operationen (Chen *et al.*, 2013) als pathogen beschrieben. Ausgelöst wurden dabei u.a.: Chronische Onychomykose, Peridontitis, Osteomyelitis, Septische Arthritis, Endocarditis (Savini *et al.*, 2011), Pneumonie (dos Santos & Soares, 2005), akute lymphoide Leukämie, multiples Myelom (Papon *et al.*, 2013).

Mit der Anzahl immunsupprimierter Menschen steigt auch die Häufigkeit von Pilzinfektionen. *Candida albicans* ist wichtigste Hefe, die Infektionen bei Immunsupprimierten auslöst, jedoch steigt die Bedeutung, der Candida Infektionen, die nicht der Art *Candida albicans* angehören. Ein Beispiel für diese Arten ist *C. guilliermondii* (Miceli *et al.*, 2011), die 1-5% der gesamten Candida Infektionen auslösen (Krcmery & Barnes, 2002; Das & Ballal, 2008).

Im Allgemeinen verliefen Candidämien (*Candida* spp. in Blutkultur) aufgrund von *C. guilliermondii* milder als wenn Infektionen aufgrund von *C. albicans* vorlag (Marcos-Zambrano *et al.*, 2017). Die Virulenz war ebenfalls geringer als bei *C. albicans* (Arendrup *et al.*, 2002; Papon *et al.*, 2013; Marcos-Zambrano *et al.*, 2017). Probleme traten teilweise durch verminderte Empfindlichkeit von *M. guilliermondii* Stämme gegenüber Fluconazol und Echinocandinen auf (Miceli *et al.*, 2011; Papon *et al.*, 2013; Marcos-Zambrano *et al.*, 2017).

Die Antimykotika Empfindlichkeit ist stammspezifisch. Ein Antimykogramm das bei den Laborärzten in Singen für 2H13 in Auftrag gegeben wurde, zeigte dass 2H13 gegen Flucytosin, Amphotericin B, Fluconazol und Voriconazol sensibel ist und gegen Itraconazol eine intermediäre Sensibilität besteht. Durch 2H13 verursachte Infektionen wären also mit gängigen Antimykotika behandelbar.

Untersuchungen zur Pathogenität von *M. guilliermondii* an Meerschweinchen und Mäusen zeigten nach intraperitonealer oder subkutaner Applikation keine Unterschiede zu Kontrolltieren (Arras *et al.*, 1998). Es konnten auch keine Augenentzündungen an Kaninchen mit *M. guilliermondii* ausgelöst werden (Edwards *et al.*, 1977).

Eine Studie zur Pathogenität von 60 *M. guilliermondii* Stämmen nach intraperitonealer Injektion in Mäusen zeigte jedoch eine stammspezifische Pathogenität von 8 der 60 Stämme (Kotlyar *et*

al., 1990). Zur Einstufung von 2H13 war deshalb eine Pathogenitätsstudien an Ratten notwendig.

4.10.2 Clearance Studie in Ratten

Methodenentwicklung: Hier kam es zu Zeitverzögerungen, da die Bio-Protect für das 2H13 Präparat angegebene KBE/g bei CiTox Lab nicht wiedergefunden werden konnte. Im Labor von CiTox Lab wurden um Faktor 30 weniger KBE/g gemessen. Auf den Hinweis der Bio-Protect hin, wurde eine Probe des Testpräparates zur Analyse nach Konstanz zurückgesandt und hier erneut untersucht und die für das Präparat angegebene KBE/g konnte bestätigt werden. Erneute Versuche bei CiTox Ende Januar 2018 ergaben, dass durch die Verwendung eines anderen Rührers das Problem behoben werden konnte. Somit konnte die Methodenentwicklung abgeschlossen werden.

Evaluierung der Methode: Für die Evaluierung der Methode wurden Rattenorgane sowie Rattenkot mit *M. guilliermondii* gespiked und anschließend die KBE/g bestimmt. Die erwarteten KBE/g stimmten mit den bestimmten KBE/g überein. Im Mai 2018 wurde der Draft Report zur Evaluierung der Methode erhalten, die nach GLP Richtlinien durchgeführt wurde. Der finale GLP Report zur Methodenevaluierung ging am September 2018 bei der Bio-Protect ein (Soll Januar 2018). Somit ergab sich eine Verzögerung von 9 Monaten.

Clearance Studie: Vor Beginn der Clearance Studie war eine Verfeinerung der Standardmethode bei CiTox Lab nötig unter anderem um die Verträglichkeit von 2H13 mit dem Narkosemittel Pentobarbital zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine Verminderung der KBE/g um Faktor 10, so dass für die Clearance Studie Kohlenstoffdioxid verwendet wurde.

Im Oktober 2018 wurde der Draft Study Plan der Studie von CiTox übermittelt. Allerdings zeigte sich hier, dass die KBE/g des Testpräparates wiederum nicht mit der von der Bio-Protect bestimmten KBE/g übereinstimmten. Nach Klärung dieses Problems lag der Final Study Plan am 30.10.2018 vor und die Clearance Studie startete am 06.11.2018 (mit 11 Monaten Verzögerung im Vergleich zum Zeitplan). Am 13.02.2019 wurde der Draft Report der Studie übermittelt und nach Durchsicht und Änderungen lag der Final Report am 08.03.2019 vor.

In der Studie zeigten sich über einen Zeitraum von 21 Tagen keine toxischen Effekte von 2H13 auf Ratten bei intraperitonealer Applikation von $4-4,2 \times 10^8$ KBE pro Tier. Zudem kam es zu einer vollständigen Clearance aller Organe nach 14 Tagen. Im Bauchraum der Tiere konnte nach 21 Tagen kein 2H13 mehr nachgewiesen werden. Zudem wertet der Versuchsansteller einzelne positive Funde in der Lunge als Kontamination während der Probenaufbereitung. In Blut, Stuhl und Gehirn konnten zu keinem Zeitpunkt lebende 2H13 Zellen nachgewiesen werden.

4.11 AP12-Freilandversuche

In den drei Projektjahren wurden Freilandversuche In Kartoffeln zur Bekämpfung von *P. infestans* und in Weinreben zur Bekämpfung von *P. viticola* durchgeführt.

4.11.1 Freilandversuche in Kartoffeln

Exemplarisch wird hier der Versuch in Hohenheim 2019 beschrieben. Der Versuch der Universität Hohenheim erfolgte auf dem zum Universitätsbetrieb gehörenden Versuchsstandort Heidfeldhof an der Sorte Granola. 7 Versuchsglieder (Tabelle 18) wurden in 4 Wiederholungen behandelt. Zwischen dem 21.06 und 27.08.2019 wurden 10 Behandlungen durchgeführt.

Tabelle 18: Versuchsglieder und Gesamtkupferaufwandmenge im Kartoffelversuch 2019 in Hohenheim.

Kürzel	Versuchsglied	Gesamtkupfermenge bei 10 Behandlungen
Kontrolle	Unbehandelt	0
CU	1,2 l/ha Cuprozin progress	3,0 kg
CU + V9	1,2 l/ha Cuprozin progress + 0,06% 2H13 V9	3,0 kg
CUR	0,8 l/ha Cuprozin progress	2,0 kg
CUR + V9	0,8 l/ha Cup + 0,06% 2H13 V9	2,0 kg
CUR + V11	0,8 l/ha Cup + 0,06% 2H13 V11	2,0 kg
CUR + V9 + NFP	0,8 l/ha Cup + 0,06% 2H13 V9 + 0,03% Nu Film P	2,0 kg

Durch wöchentliche Bonituren wurde der Befallsverlauf in den Parzellen dokumentiert und für jede Parzelle die FUBK berechnet. Der Befallsverlauf zeigte eine gleichmäßige Befallszunahme in der unbehandelten Kontrolle und eine deutliche Reduktion des Befalls durch die Kupferbehandlungen. Wobei die Behandlung mit 3 kg Cu + V9 die geringste Befallszunahme zeigte (Abbildung 31). Dies spiegelt sich auch in den FUBK wider, die zum einfacheren Vergleich der Varianten und zur statistischen Auswertung berechnet wurden (Abbildung 32).

Alle Kupfervarianten reduzierten den Befall tendenziell. Zwischen der Standardkupferaufwandmenge und der reduzierten Kupferaufwandmenge gab es keinen Unterschied. Die Mischung von 3kg Cu mit 2H13 V9 reduzierte den Befall als einzige signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 32). 2H13 V9 verbesserte den Wirkungsgrad des Kupfers dabei um 30% (Tabelle 19). Der Effekt von 2H13 auf die reduzierte

Kupfermenge war geringer. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden 2H13 Versuchspräparaten festgestellt werden. Die Zugabe des Haftmittel NuFilm P zur Mischung aus Kupfer und 2H13 hatte keinen positiven Effekt.

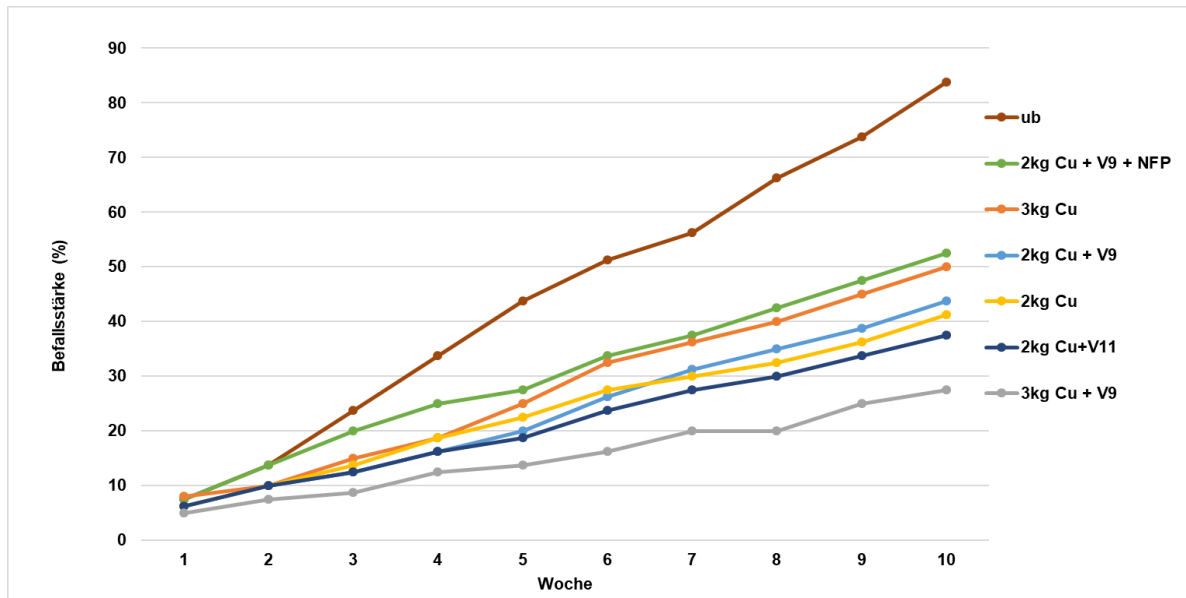


Abbildung 31: Befallsverlauf von *P. infestans* im Kartoffelversuch in Hohenheim 2019 an der Sorte Granola.

Cu: Reinkupfermenge ausgebracht als Cuprozin progress, NFP: NuFilm P, ub: unbehandelte Kontrolle.

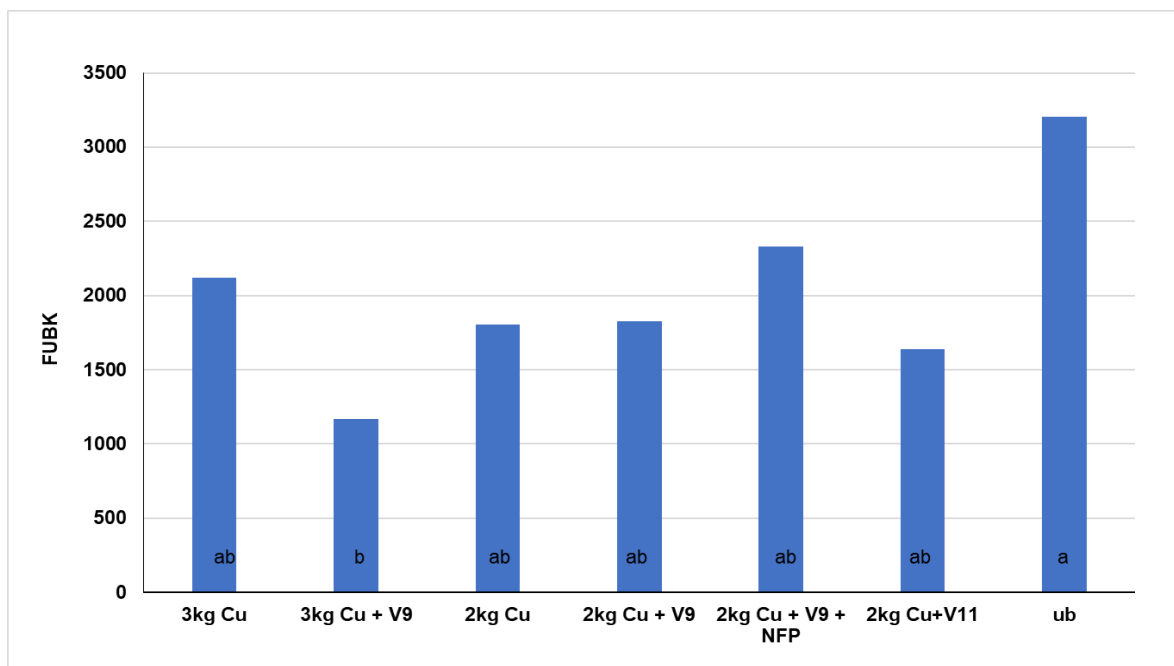


Abbildung 32: Mittelwerte der FUBK im Kartoffelfreilandversuch in Hohenheim 2019 an der Sorte Granola.

Cu: Reinkupfermenge ausgebracht als Cuprozin progress, NFP: NuFilm P, ub: unbehandelte Kontrolle. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede im LSD-Test ($p < 0,05$).

Die Mengenerfassung bei der Ernte bestätigte den positiven Effekt der Kupferbehandlungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zeigte auch einen tendenziellen Mehrertrag durch den Zusatz von 2H13 um ca. 15% im Vergleich zu den Kupferbehandlungen solo (Tabelle 20).

Freilandversuche in Kartoffeln wurden am JKI Institut für Strategien und Folgenabschätzung in Kleinmachnow auf der Versuchsfläche in Dahnsdorf 2017 (Steitmann, 2017) und 2018, im Fachbereich Phytopathologie der Universität Hohenheim 2017, 2018 und 2019 und 2019 bei der Firma CropTrials GmbH aus Burgwedel am Standort Hiddestorf-Hemmingen beauftragt. Zusätzlich prüfte die Außenstelle des LTZ Augustenberg in Donaueschingen in 2018 und 2019 2H13 in je einem Versuchsglied in Freilandversuchen.

Sowohl im Versuch in Dahnsdorf 2018 als auch im Versuch in Hiddestorf-Hemmingen 2019 wurde aufgrund der trockenen Witterung kein Befall mit *P. infestans* in der unbehandelten Kontrolle festgestellt, so dass hier keine Daten zur Wirksamkeit der Präparate vorliegen. In Hiddestorf-Hemmingen wurde trotzdem eine Ernteerfassung in den Versuchsgliedern gemacht.

Tabelle 19: Wirkungsgrade der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) berechnet anhand der FUBK von *P. infestans* in Kartoffel.

In der Spalte CUR+2H13+X wurde zusätzlich ein Haftmittel (KHCO₃ oder Nu-Film P) zugegeben. Die Spalten „Differenz zu WG Cu“ zeigen jeweils die Wirkungsverbesserung durch 2H13 im Vergleich zur entsprechenden Kupferkonzentration alleine. N: Anzahl der Behandlungen.

Jahr_Standort	Sorte	2H13	2H13 (%)	N	Cu (kg/ha)	Wirkungsgrad (%)					Differenz zu WG Cu		
						CU	CU+ 2H13	CUR	CUR+ 2H13	CUR+ 2H13 +X	CU+ 2H13	CUR + 2H13	CUR +2H1 3 +X
2017_Dahnsdorf	Ditta	V8	0,02	6	3	59,6		40,2	34,5				-5,8
2017_Hohenheim	Fasan	V7	0,02	6	1,8	-0,5	-3,9	-4,0	-1,5		-3,5		2,6
2017_Hohenheim	Fasan	V7	0,06	6	1,8			-4,0	-5,5				-1,5
2017_Hohenheim	Fasan	V8	0,02	6	1,8	-0,5	4,2	-4,0	-5,3		4,7		-1,3
2017_Hohenheim	Sevim	V7	0,02	6	1,8	-2,4	-2,8	-4,9	-1,7		-0,4		3,2
2017_Hohenheim	Sevim	V7	0,06	6	1,8			-4,9	-0,2				4,7
2017_Hohenheim	Sevim	V8	0,02	6	1,8	-2,4	1,1	-4,9	-2,6		3,4		2,3
2018_Donaueschingen	Granola	V9	0,06	5	1,35	50,9	49,4				-1,5		
2018_Hohenheim	Concordia	V9	0,06	6	1,8	36,2	38,5	36,1	16,4	15,6	2,3	-19,7	-20,5
2019_Hohenheim	Granola	V9	0,06	10	3	33,7	63,5	43,7	43,0	27,2	29,8	-0,7	-16,5
2019_Hohenheim	Granola	V11	0,06	10	3			43,7	48,8				5,1
2019_Donaueschingen	Granola	V9	0,06	3	1,13	81,3				76,5			-4,8

In den 6 Freilandversuchen mit Befall durch *P. infestans* wurde mit der vollen Kupferaufwandmenge von angestrebt 3 kg Reinkupfer pro ha und Jahr Wirkungsgrade zwischen 0% und 80% erzielt. Wobei nicht in allen Versuchen die 3 kg Cu/ha eingesetzt wurden, da witterungsbedingt die Anzahl der Behandlungen reduziert wurde (Tabelle 19). In den Versuchen wurden Varianten mit reduzierter Kupfermenge im Vergleich zur vollen Aufwandmenge gefahren. Wobei im Durchschnitt der Versuche kein Unterschied in der Wirksamkeit festgestellt wurde. 2H13 wurde in 7 Varianten als Zugabe zur vollen

Kupferaufwandmenge und in 10 Varianten als Zugabe zur reduzierten Kupferaufwandmenge getestet.

Insgesamt wurden 17 Varianten mit CU + 2H13 mit der entsprechenden Kupferdosierung solo verglichen (Tabelle 19) und im Durchschnitt verbesserte 2H13 den Wirkungsgrad tendenziell um $1,4\% \pm 9,3\%$ ($p = 0,55$). Zwischen den eingesetzten Versuchspräparaten von 2H13 oder den unterschiedlichen Dosierungen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Zugabe von Nu Film P als Haftmittel oder von Kaliumhydrogencarbonat verschlechterte die Wirkung der Mischung aus 2H13 und Kupfer jeweils und kann nicht empfohlen werden.

Tabelle 20: Relative Erntemenge der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) in den Kartoffelfreilandversuchen.

In der Spalte CUR+2H13+X wurde zusätzlich ein Haftmittel (KHCO₃ oder Nu-Film P) zugegeben. Die Spalten „Differenz zu Ertrag CU“ zeigen jeweils die Differenz im rel. Ertrag durch 2H13 im Vergleich zur entsprechenden Kupferkonzentration alleine. N: Anzahl der Behandlungen.

Jahr_Standort	Sorte	2H13	2H13 (%)	N	Cu (kg/ha)	relativer Ertrag (%)					Differenz zu Cu			
						CU	CU+ 2H13	CUR	CUR + 2H13	CUR+2 H13 +X	CU+ 2H13	CUR + 2H13	CUR+ 2H13 +X	
2017_Dahnsdorf	Ditta	V8	0,02	6	3	109		107	104				-3,6	
2017_Hohenheim	Fasan	V7	0,02	6	1,8	110	120	109	117			9,3	8,5	
2017_Hohenheim	Fasan	V7	0,06	6	1,8	110		109	106				-2,4	
2017_Hohenheim	Fasan	V8	0,02	6	1,8	110		109	114				5,5	
2017_Hohenheim	Sevim	V7	0,02	6	1,8	69		69	82				13,1	
2017_Hohenheim	Sevim	V7	0,06	6	1,8	69		69	80				11,1	
2017_Hohenheim	Sevim	V8	0,02	6	1,8	69	88	69	88			18,8	19,5	
2018_Donaueschingen	Granola	V9	0,06	5	1,35	124	124					0,0		
2018_Hohenheim	Concordia	V9	0,06	6	1,8	116	105	107	105	102		-11,2	-2,2	-5,3
2019_Hohenheim	Granola	V9	0,06	10	3	109	123	103	117	110		14,3	14,3	7,1
2019_Hohenheim	Granola	V11	0,06	10	3			103	119				15,7	
2019_Hiddestorf-Hemmingen	Nicola	V9	0,06	7	5,25	98		100	108	92			7,5	-8,2
2019_Hiddestorf-Hemmingen	Nicola	V11	0,06	7	5,25	98		100	102				1,9	
2019_Donaueschingen	Granola	V9	0,06	3	1,13	113				110				-3,1

In den 7 Freilandversuchen mit Ernteerhebung wurden mit der vollen Kupferaufwandmenge durchschnittlich 106% im Vergleich zu unbehandelt geerntet und mit der reduzierten Kupferaufwandmenge durchschnittlich 99%. In 5 Fällen wurde 2H13 zur vollen Aufwandmenge dazugegeben und in 12 Fällen zur reduzierten Kupferaufwandmenge. Im Mittel über alle 17 Fälle wurde die Erntemenge signifikant um 7% im Vergleich zur jeweiligen Kupferbehandlung alleine erhöht ($p=0,004$). Die Zugabe von Netzmitteln zur Mischung aus Kupfer und 2H13 führte nicht zu einer Erhöhung der Erntemenge.

Obwohl die Wirkungsverbesserung von Kupfer durch 2H13 sich nicht signifikant auf die Befallsentwicklung durch *P. infestans* auswirkte, wurden durch den Einsatz von 2H13 im Durchschnitt signifikant höhere Erntemengen erzielt. Ausgehend von einer mittleren

Erntemenge von 300 dt/ha entspricht ein Mehrertrag von 7 % 21 dt/ha. Bei einem Verkaufspreis von 46 EUR/dt (Steitmann, 2017) ergibt sich ein mittlerer Mehrerlös von 966 EUR/ha durch den Einsatz von 2H13. Bei max. 10 Anwendungen von je 240g /ha (0,06% in 400 L/ha) und Mittelkosten von 100 EUR/kg ergeben sich Mittelkosten von 240 EUR pro ha und Jahr. Da 2H13 als Additiv zu Pflanzenschutzmaßnahmen eingesetzt wird, fallen keine zusätzlichen Arbeits- oder Traktorstunden an. Die Zugabe von 2H13 zu den Kupferspritzungen in Kartoffeln ist also selbst ohne Kupferreduktion wirtschaftlich. Wird zusätzlich die Kupfermenge halbiert, ergeben sich weitere Einsparungen. Bei einem Preis von 32,40 EUR/L Cuprozin progress und einer Aufwandmenge von 10 mal 1,2L/ha (entspricht 3 kg Cu/ha) ergeben sich Gesamtkosten für den Kupfereinsatz von 388,8 EUR. Bei einer Halbierung des Kupfereinsatzes durch den Zusatz von 2H13 werden also weitere 194,40 EUR/ha eingespart.

4.11.2 Freilandversuche in Weinreben

Exemplarisch wird hier der Versuch an der Hochschule Geisenheim 2019 beschrieben. 7 Versuchsglieder wurden in 4 Wiederholungen behandelt. Zwischen dem 23.05.2019 und 05.08.2019 wurden 8 Behandlungen zur Bekämpfung von *P. viticola* ausgebracht (Abbildung 33). Die Blattbonituren auf Befallshäufigkeit und Befallsstärke (Abbildung 33) von *P. viticola* erfolgten am 19.07., 08.08. und 27.08.2019. Während die Befallsstärke in der unbehandelten Kontrolle stetig zunahm, reduzierten alle Behandlungen die Befallsentwicklung deutlich (Abbildung 33).

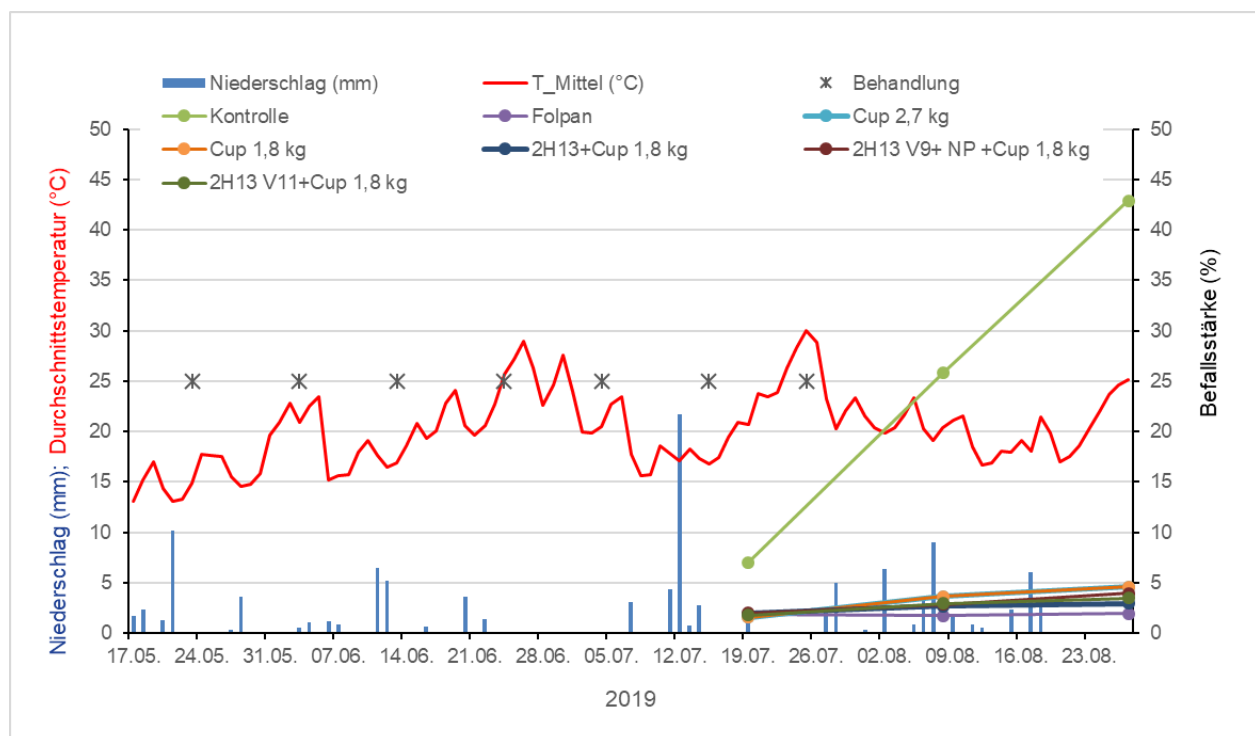


Abbildung 33: Wetterdaten, Behandlungszeitpunkte und Befallsstärke von *P. viticola* an Weinreben in den Varianten im Freilandversuch Geisenheim 2019.

Behandelt wurde mit Cuprozin progress mit der angegebenen Reinkupfermenge in kg pro ha und Jahr.

Tendenzielle Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden erst nach Berechnung der FUBK sichtbar. Die FUBK fasst die drei Blattbonituren zusammen. Die Befallsstärke wurde durch alle Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Zwischen den Behandlungen gab es keine Unterschiede. Die Befallshäufigkeit wurde auch durch alle Behandlungen signifikant reduziert. Der chemische Standard war mit 47% Wirkung signifikant wirksamer als die Kupferbehandlungen. Cuprozin progress, mit einer Gesamtkupfermenge von 2,7 kg/ha/Jahr eingesetzt, war signifikant wirksamer als mit reduzierter Kupfermenge von 1,8 kg Cu eingesetzt. Die Zugabe von 2H13 zu 1,8 kg Cu hob die Variante jeweils auf das Signifikanzniveau von 2,7 kg Cu (Tabelle 21).

An den Trauben erfolgte eine Bonitur von Befallsstärke und Befallshäufigkeit am 27.08.2019. Die Befallshäufigkeit erreichte mit 98% in der unbehandelten Kontrolle einen sehr hohen Wert. Der Chemische standard reduzierte den Befall signifikant um 70%, Die hohe Kupferaufwandmenge war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant wirksam (WG 18%) aber signifikant weniger wirksam als der chemische Standard. Die Reduktion der Kupfermenge führte wiederum zu einer signifikanten Reduktion der Wirkung auf das Niveau von unbehandelt. Die Zugabe von 2H13 führte jeweils zu einer tendenziellen Wirkungssteigerung der niedrigen Kupfermenge auf das Signifikanzniveau von der vollen Kupferaufwandmenge.

Die Befallsstärke wurde durch den chemischen Standard und alle Kupfervarianten signifikant reduziert, wobei die Zugabe von 2H13 in allen drei Fällen die Wirksamkeit der reduzierten Kupfermenge signifikant verbesserte und die Wirksamkeit und das Signifikanzniveau der vollen Kupferaufwandmenge erreichte. Mit Zugabe von 2H13 und NuFilmP wurde sogar das Signifikanzniveau des chem. Standard erreicht (Tabelle 21).

Tabelle 21: Bonitur von Blattbefall (FUBK aus 3 Bonituren) und von Traubenbefall (Bonitur am 27.8.) mit *P. viticola* im Weinversuch in Geisenheim 2019.

Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede in Tukey' Multiple Comparison Test ($p < 0,05$). NP: NuFilm P

	Blattbefall					Traubenbefall				
	Befallsstärke		Befallshäufigkeit			Befallsstärke		Befallshäufigkeit		
	FUBK	WG (%)	FUBK	WG (%)	%	WG (%)	%	WG (%)		
Kontrolle	328 a		1.760 a	0	48,4 a		98 a			
Folpan 80 WDG	35 b	89	938 d	47	9,3 d	81	29 c	70		
Cuprocin prog. 2,7 kg	45 b	86	1.198 c	32	23,5 bc	51	81 b	18		
Cup. Prog. 1,8kg	52 b	84	1.428 b	19	32,9 b	32	96 a	3		
2H13V9+Cup. prog. 1,8 kg	46 b	86	1.333 bc	24	21,9 c	55	91 ab	8		
2H13V9+ NP +Cup. prog 1,8	48 b	85	1.378 bc	22	18,2 cd	62	91 ab	8		
2H13 V11 +Cup.prog 1,8kg	47 b	86	1.358 bc	23	22,7 c	53	90 ab	9		

Freilandversuche in Weinreben wurden am Weinbauinstitut Freiburg 2017, an der Hochschule Geisenheim 2017, 2018, 2019 und am DLR Rheinpfalz in Oppenheim 2019 beauftragt. Zusätzlich führte Luisa Mattedi von der Stiftung Edmund Mach in San Michele, Italien in 2018 einen Versuch mit 2H13 als Kupferzusatz durch.

In den 5 Freilandversuchen, in denen die Befallsstärke mit *P. viticola* an den Blättern ausgewertet wurde, wurden mit der vollen Kupferaufwandmenge von angestrebt 3kg Reinkupfer pro ha und Jahr Wirkungsgrade zwischen 37% und 90% erzielt. Wobei nicht in allen Versuchen die 3kg Cu/ha eingesetzt wurden, da witterungsbedingt die Anzahl der Behandlungen reduziert wurde (Tabelle 22, Tabelle 19). In den Versuchen wurden Varianten mit reduzierter Kupfermenge (2kg Cu/ha oder 1kg Cu/ha) im Vergleich zur vollen Aufwandmenge gefahren. Wobei im Durchschnitt der Versuche der Wirkungsgrad mit der reduzierten Kupfermenge tendenziell ($p=0,26$) um 7% reduziert war. Die Wirkungssteigerung durch 2H13 war in diesen Versuchen dosisabhängig. In den Versuchen 2017 wurde 2H13 mit 0,02% eingesetzt und hatte im Durchschnitt keinen Effekt. Ab 2018 wurden 0,06% 2H13 eingesetzt. In diesen vier Varianten wurde eine tendenzielle Wirkungsverbesserung durch 2H13 von 7% erreicht (Tabelle 22). Damit wurde durch 2H13 der durch die Kupferreduktion auf 2/3 verursachte Wirkungsrückgang ausgeglichen.

Tabelle 22: Wirkungsgrade der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) berechnet anhand der FUBK der Befallsstärke von *P. viticola* in an Blättern der Weinreben.

In der Spalte CUR+2H13+NFP wurde zusätzlich Nu-Film P zugegeben. Die Spalten „Differenz zu WG Cu“ zeigen die Wirkungsverbesserung durch 2H13 im Vergleich zur reduzierten Kupferkonzentration alleine. N=Anzahl der Behandlungen. MW =Mittelwert.

					Wirkungsgrad (%)					WG CUR + 2H13 +NFP	Differenz zu WG CU	
					2H13	2H13	N	Cu (kg/ha)	Folpan		CU	CU + 2H13
2017_Freiburg		0,02%	10	3	91	90		87	89			1,7
2017_Freiburg		0,02%	10	3		90		83	83			0,2
2017_Geisenheim		0,02%	8	2,6	97	88		86	83			-3,5
2017_Geisenheim		0,02%	8	2,6		88		66	70			4,1
											MW	0,6
2018_Geisenheim	V9	0,06%	8	2,7	91	37	33	24	41			17,3
2019_Geisenheim	V9	0,06%	8	2,7	89	86		84	86	74		1,8
2019_Geisenheim	V11	0,06%	8	2,7		86		84	86			1,5
2018_San Michele	V9	0,06%	8	R 1,6				72	78			6,6
											MW	6,8

Noch deutlicher zeigte sich der Effekt von 2H13 bei Auswertung der Befallsstärke von *P. viticola* an den Trauben in den 6 Freilandversuchen. Wieder hatte 0,02% 2H13 in 4 Varianten in 2017 keinen Effekt. In den Jahren 2018 und 2019 verbesserte 0,06% 2H13 die Wirkung von

reduzierten Kupfermengen in 4 Varianten signifikant ($p=0,039$) um durchschnittlich 23% (Tabelle 23). Die Reduktion der Kupferaufwandmenge auf 2/3 reduzierte den durchschnittlichen Wirkungsgrad der vollen Kupferaufwandmenge um 23%. Diese Wirkungsreduktion konnte durch Zugabe von 2H13 ausgeglichen werden.

Durch die im Weinbau notwendige hohe Aufwandmenge von 0,06% 2H13 und die hohen Wasseraufwandmengen von bis zu 1.600 l/ha werden 0,96 kg 2H13 pro Behandlung und ha benötigt. Dies entspricht Kosten von 96 EUR für 2H13. Demgegenüber stehen bei einer Kupferreduktion auf 2/3 Einsparungen beim Kupferpräparat von nur 15,5 EUR. Die Kupferreduktion mit Hilfe von 2H13 im Weinbau ist also mit Mehrkosten für den Weinbauern verbunden. Weitere Versuche mit reduzierten Aufwandmengen sind notwendig.

Tabelle 23: Wirkungsgrade der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) berechnet anhand der Befallsstärke von *P. viticola* an den Trauben.

In der Spalte CUR+2H13+NFP wurde zusätzlich Nu-Film P zugegeben. Die Spalten „Differenz zu WG Cu“ zeigen die Wirkungsverbesserung durch 2H13 im Vergleich zur reduzierten Kupferkonzentration alleine. N=Anzahl der Behandlungen. MW =Mittelwert.

					Wirkungsgrad (%)						Differenz zu WG CU		
					2H13	2H13	N	Cu (kg/ha)	Folpan	CU	CU + 2H13	CUR	CUR + 2H13
2017_Freiburg		0,02%	10	3	100	74		76	73				-3,0
2017_Freiburg		0,02%	10	3	100	74		64	69				5,3
2017_Geisenheim		0,02%	8	2,6	98	38		36	35				-0,9
2017_Geisenheim		0,02%	8	2,6	98	38		19	19				-0,5
												MW	0
2018_Geisenheim	V9	0,06%	8	2,7	91	25	33	14	22				8,1
2019_Geisenheim	V9	0,06%	8	2,7	81	51		32	55	62			22,8
2019_Geisenheim	V11	0,06%		2,7		51		32	53				21,1
2019_Oppenheim	V9	0,06%		3		66		22	62				40,4
												MW	23

5 Diskussion

Pflanzenpathogene aus der Gruppe der Oomyceten (*Phytophthora* spp. und falsche Mehltaupilze) gelten im Pflanzenbau als schwer zu bekämpfen. Die Braunfäule bei Tomate und die Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln werden von *Phytophthora infestans* verursacht. *P. infestans* oder falsche Mehltaupilze im Wein (*Plasmopara viticola*) und in verschiedenen Gemüsekulturen können Ernten vernichten, wenn keine geeigneten Gegenmaßnahmen getroffen werden. Im ökologischen Anbau wird gegen Oomyceten hauptsächlich Kupfer eingesetzt. Beim wiederholten Einsatz von Kupfer besteht die Gefahr der Anreicherung dieses Schwermetalls im Boden, weswegen Kupferreduktionsprogramme ins Leben gerufen wurden (Gitzel & Kühne, 2016). Ein Ansatz zur Kupferreduktion ist der Zusatz von Hefen, die die Wirksamkeit von reduzierten Kupferaufwandmengen erhöhen (Kunz *et al.*, 2016a). Die Firma Bio-Protect verfügt über einen entsprechenden Hefestamm und strebt die Listung des Hefestammes 2H13 als Zusatzstoff zu Pflanzenschutzmitteln an. Zur Weiterentwicklung dieses Zusatzstoffes bis zur Praxisreife wurde das hier bearbeitete Forschungsprojekt von der DBU genehmigt. Die Arbeiten wurden für 3 Jahre geplant und in 12 Arbeitspakete aufgeteilt.

Im AP9 wurde die Stammcharakterisierung von 2H13 vorgenommen. Für die Stammerhaltung und für die Qualitätskontrolle des zu entwickelnden Präparates war es notwendig den Stamm eindeutig von Hefestämmen anderer Arten zu unterscheiden, aber auch 2H13 von anderen Stämmen der gleichen Art abgrenzen zu können. Die Unterscheidung von anderen Arten war meist an der Koloniemorphologie auf Agarplatten bzw. durch Selektivmedien möglich. Im Zweifelsfall konnten Einzelkolonien gepickt und über eine ITS-Sequenzierung und einem Datenbankabgleich einer Art zugeordnet werden. Die Abgrenzung von Stämmen der gleichen Art ist mit dieser Methode nicht möglich, da es keine stammspezifischen Unterschiede in der ITS-Sequenz gibt. Im Projekt wurde mit 4 Vergleichsstämmen gearbeitet, die bei der DSMZ als *Meyerozyma guilliermondii* geführt wurden. Die ITS-Sequenzierung dieser Stämme ergab nur für 3 die Zuordnung zur Art *M. guilliermondii*. Unterschiede zwischen den *M. guilliermondii* Stämmen zeigten sich vor allem in der Koloniemorphologie auf McConkey Agar. Hier müssten weitere Stämme beschafft und verglichen werden, um zu prüfen, ob die gefundene Kolonief orm wirklich stammspezifisch für 2H13 ist. Eine andere Möglichkeit wäre die molekularbiologische Charakterisierung von 2H13 bis hin zur kompletten Sequenzierung und der Ableitung einer stammspezifischen PCR oder einer quantitativen PCR. Dies konnte in der Projektlaufzeit mit den geplanten Ressourcen nicht erreicht werden.

Neben der stammspezifischen Identifizierung von 2H13 im Labor ist auch seine Unbedenklichkeit für Mensch und Tier Voraussetzung für den Einsatz im Pflanzenschutz. Der Hefestamm 2H13 wurde durch eigene ITS-Sequenzierung der Art *Meyerozyma guilliermondii* zugeordnet und wird damit in die Risikogruppe 1 (also unbedenklich für Mensch und Tier) nach

den Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) eingestuft. Die Artbestimmung wurde durch die DSMZ bestätigt.

Wie bei vielen anderen Hefearten auch, wurden Stämme der Art *Meyerozyma guilliermondii* bei immunsupprimierten Patienten im Zusammenhang mit Infektionen isoliert. Es ist aber nicht bewiesen, dass Stämme dieser Art tatsächlich die Ursache solcher Entzündungen oder Krankheiten sind. Vielmehr wurde diskutiert, dass eine ubiquitär vorkommende Art wie *M. guilliermondii* längst als Humanpathogen beschrieben wäre, wenn von ihr eine wirkliche Gefahr ausginge. Um einen Überblick über die Pathogenität verschiedener *M. guilliermondii* Stämme zu erhalten wurde eine Literaturrecherche durchgeführt und die gefundenen Studien ausgewertet (siehe Glp. 4.10.1). *Candida albicans* ist die Art, die am häufigsten Pilzinfektionen beim Menschen auslöst. Da ‚Meyerozyma‘ und ‚Candida‘ synonym verwendet werden, gehören *Meyerozyma guilliermondii* (synonym *Candida guilliermondii* oder *Pichia guilliermondii*) und *Candida albicans* der gleichen Gattung an. Stämme der beiden Arten sind aber auf Selektivmedien (z.B. Chromogenic Nutrient Agar) gut zu unterscheiden und auch die ITS-Sequenzierung unterscheidet zwischen den beiden Arten. Verwechslungen sind also unwahrscheinlich. Trotzdem blieb die Frage ob auch Stämme von *M. guilliermondii* pathogen sein können.

Bei immunsupprimierten Menschen steigt die Bedeutung, der Candida Infektionen, deren Auslöser nicht der Art *Candida albicans* angehören. Ein Beispiel für diese Arten ist *C. guilliermondii* (Miceli *et al.*, 2011), die 1-5% der gesamten Candida Infektionen auslösen (Krcmery & Barnes, 2002; Das & Ballal, 2008). Untersuchungen zur Pathogenität von *M. guilliermondii* an Meerschweinchen und Mäusen zeigten nach intraperitonealer oder subkutaner Applikation keine Unterschiede zu Kontrolltieren (Arras *et al.*, 1998). Es konnten auch keine Augenentzündungen an Kaninchen mit *M. guilliermondii* ausgelöst werden (Edwards *et al.*, 1977). Eine Studie zur Pathogenität von 60 *M. guilliermondii* Stämmen nach intraperitonealer Injektion in Mäusen zeigte jedoch eine stammspezifische Pathogenität von 8 der 60 Stämme (Kotlyar *et al.*, 1990). Zur Einstufung von 2H13 war deshalb eine Pathogenitätsstudie an Ratten notwendig, die im Rahmen des Projektes bei CiToxLab durchgeführt wurde.

In der Studie zeigten sich über einen Zeitraum von 21 Tagen keine toxischen Effekte von 2H13 auf Ratten nach intraperitonealer Applikation. Zudem kam es zu einer vollständigen Clearance aller Organe nach 14 Tagen. Im Bauchraum der Tiere konnte nach 21 Tagen kein 2H13 mehr nachgewiesen werden. Die vollständige Clearance bestätigte die Apathogenität des Stammes 2H13. Da ein Antimykogramm, das bei den Laborärzten in Singen für 2H13 in Auftrag gegeben wurde, zeigte dass 2H13 gegen Flucytosin, Amphotericin B, Fluconazol und Voriconazol sensibel ist, wären Infektionen durch 2H13 behandelbar.

Im AP2 wurde das Scale-up des Produktionsprozesses in den industriellen Maßstab für den Hefestamm 2H13 als Unterauftrag bei der Firma Agrano in Riegel durchgeführt. Im August 2017 wurde nach der 4. Pilotfermentation in Hefeextraktmedium Hefegranulat im großen Industrie-Wirbelschichttrockner getrocknet. So konnten 50kg Hefegranulat mit einer Zellzahl von $8E+10$ KBE/g produziert werden (V9), die den vorläufigen Produktspezifikationen entsprachen. Das Versuchspräparat V9 stand für weitere Tests im Projekt zur Verfügung. Im 3. Projektjahr wurde eine weitere Pilotfermentation in Melassemedium durchgeführt, um industriell produziertes Hefegranulat aus diesem Medium für Vergleiche in Wirksamkeitsversuchen zu haben. Die im Melassemedium produzierten 2H13 Zellen waren im Downstream processing deutlich aufwändiger als nach Produktion im Hefeextraktmedium. Die Zellen mussten vor dem Filtrieren und Extrudieren gewaschen werden. Die zusätzlichen Arbeitsschritte verteuern den Prozess und erhöhen die Wahrscheinlichkeit für ungewollte Kontaminationen, wie sie in der Qualitätskontrolle der im Melassemedium produzierten V10 und V11 festgestellt wurden. Laut Agrano kann die Kontaminationswahrscheinlichkeit in der Produktionsanlage minimiert werden. Trotzdem wurde die Verwendung des Melassemediums für die industrielle Produktion nicht empfohlen, da der Aufwand durch die notwendigen Waschschrte größer wird. Da sich in den Wirksamkeitsversuchen kein Vorteil von V11 im Vergleich zu V9 ergab, wird das Produktionsverfahren in Zukunft nach den Vorgaben der 4. Pilotfermentation im Hefeextraktmedium durchgeführt.

In AP2 konnte also Dank der guten Zusammenarbeit mit der Firma Agrano ein industrielles Produktionsverfahren für die Hefe 2H13 entwickelt werden, so dass es nun möglich ist ein Hefegranulat mit der Ziel KBE von mind. $5 E+10$ KBE/g und einer Restfeuchte unter 6% zu produzieren. Gemäß der Preiskalkulation vom Produzenten und unter Berücksichtigung der Margen für den Entwickler und die Zwischenhändler gehen wir von einem Endverbraucherpreis von brutto 100 EUR/kg aus.

In AP3 wurden die Qualitätskriterien für das 2H13 Präparat definiert und die Methoden der Qualitätskontrolle auch mit Hilfe der Daten aus AP9 festgelegt. Bei der Zellzahl an 2H13 im Produkt konnte die angestrebten $5E+10$ KBE/g in den Versuchspräparaten der Agrano erreicht werden und die Methode zur Zellzahlbestimmung ist im eigenen Labor etabliert. In Bezug der Qualitätskontrolle auf Fremdkeime wurde mit dem zertifizierten Labor Novum Analytik in Neckarsulm kooperiert. Novum Analytik konnte mit Standardmethoden die Verunreinigung mit *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* in den Testpräparaten ausschließen. In der Versuchscharge V9 aus dem August, konnten auch sonst keine Fremdkeime nachgewiesen werden. Allerdings waren die Nachweisgrenzen für aerobe mesophile Bakterien und für mesophile Hefen und Pilze mit den Standardmethoden hoch, da die hohe Konzentration von 2H13 im Präparat die Nachweise störte. Hier waren weitere Anpassungen der Methodik notwendig. Auf Nutrient Broth Agar mit 3.500 ppm

Fluconazol wuchsen alle getesteten Bakterien, 2H13 jedoch nicht, so dass dieser Agar für die Qualitätskontrolle eingesetzt wurde. Auf McConkey Agar, konnte man Backhefe, *Aureobasidium pullulans* und sogar Stämme von *Meyerozyma guilliermondii* von 2H13 anhand der Kolonieförmigkeit differenzieren. Zugabe von 3.500 ppm Fluconazol zu McConkey Agar erlaubte den selektiven Nachweis von Backhefe im 2H13 Granulat, so dass diese Platten in der Qualitätskontrolle eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze für mesophile Keime und Fremdhefe konnte mit den ausgewählten Agarplatten jeweils auf 800 Keime/g 2H13 Granulat gesenkt werden und unterschreiten damit den Anforderungen an die Qualitätskontrolle für Pflanzenschutzmittel (100.000 mesophile Keime/g bzw. 1.000 Fremdhefen/g).

Die Einstufung von 2H13 als wasserdispergierbares Granulat (WG-Formulierung) wurde durch die ermittelten Phys-Chem Parameter bestätigt. Einzig die gemessene wettability von 180-300 s war höher als in den Anforderungen der FAO vorgeschlagen (<60 s). Dies bedeutet, dass beim Ansetzen der Spritzbrühe 2H13 in Wasser eingerührt werden muss und die Spritzbrühe laufend gerührt werden muss. Da keine Zulassung als Pflanzenschutzmittel angestrebt wird, sollte dieser Parameter aber sonst keinen negativen Einfluss haben. Bei weiteren Produktionen von 2H13 sollten Additive zur Verbesserung der wettability getestet werden. Eventuell kann diese Produkteigenschaft verbessert werden, ohne die eigentliche Wirkung zu beeinflussen.

Im AP4 wurde die Lagerstabilität der 2H13 Versuchschargen geprüft, wobei die in erster Linie die Lebendzellzahl an 2H13 in den Produkten überwacht wurde. Aber auch der Einfluss der Lagerung auf die physikalisch-chemischen Parameter wurde getestet. Aus einem Vorläuferprojekt zur Verfügung stehende gefriergetrocknete Versuchspräparate waren bis 600 Tage bei 8°C stabil. Die im Projekt produzierten gefriergetrockneten Versuchspräparate waren bei 8°C in Abhängigkeit der im Produkt enthaltenen Restfeuchte (RF) zwischen 250 Tagen (RF 10,5%) und größer 1.000 Tagen (RF 97,5%) lagerstabil. Das aus der Pilotproduktion stammende Granulat V9 war mit einer RF von 7,9% bei 8°C für 2 Jahre stabil. Bei 20°C und 40°C war die Lagerdauer kürzer und der Einfluss der RF und der Verpackung auf die Lagerstabilität konnte schneller geprüft werden. So hatte Vakuumverpackung keinen positiven Effekt auf die Lagerstabilität. Die Reduzierung der Restfeuchte um 2% durch Nachtrocknen des Granulats, hatte allerdings eine verbesserte Lagerstabilität zur Folge. Eine Lagerstabilität von 60 Tagen bei 20°C ist aber noch deutlich unter dem für das Hefepreparat Blossom Protect (*Aureobasidium pullulans*) von der Herstellerfirma angegebene Haltbarkeit von 18 Monaten. Für das 2H13 Produkt bedeutet die vergleichsweise kurze Lagerstabilität, dass das Präparat beim Produzenten, Zwischenhändlern und Anwender kühl gelagert werden muss. Eine Verbesserung der Lagerstabilität bei 20°C sollte angestrebt werden, um die Akzeptanz des Präparates im Markt zu erhöhen. Möglich wäre die Beeinflussung des physiologischen Zustands der Hefezellen vor der Trocknung. So wird z.B. bei Backhefe die Lagerstabilität durch einen Hitzeschock am Ende der Fermentation verbessert.

In AP5 wurden Testsysteme an Tomaten – und Kartoffeltopfpflanzen im Gewächshaus etabliert um die Wirksamkeit verschiedener Kupferdosierungen mit und ohne Kombination mit 2H13 zu prüfen und um Versuche zur Aufklärung des Wirkmechanismus (AP6) zu machen. Trotz Heizung und Zusatzbeleuchtung gab es jahreszeitliche Schwankungen in der Geschwindigkeit des Pflanzenwachstums, so dass im Winter weniger Versuche gemacht werden konnten als im Frühjahr und Sommer. Im Sommer stiegen die Temperaturen im Gewächshaus zeitweise über 30°C, was die Keimung der *P. infestans* Sporangien verhinderte und damit die Infektion der Versuchspflanzen. In den Sommermonaten musste deshalb zur Inokulation der Pflanzen auf eine Klimakammer ausgewichen werden. Durch den Zukauf von veredelten Tomatenpflanzen von einem Jungpflanzenproduzenten, konnte die Standzeit pro Versuch von 6 auf 4 Wochen reduziert werden. Im Durchschnitt konnte so ein Versuch an Kartoffel oder Tomaten je Monat durchgeführt werden.

Die durch den Wechsel von Tomatenblattscheiben auf Topfpflanzen erhoffte Stabilisierung der Versuchsergebnisse hat sich leider nicht bestätigt. Auch auf den Topfpflanzen blieben die Varianzen im Versuch und zwischen den Versuchen hoch, so dass häufig Tendenzen in der Wirksamkeit von Präparaten sichtbar waren, aber selten signifikante Unterschiede nachweisbar waren. Vor allem die Wirksamkeit der reduzierten Kupferaufwandmengen schwankten stark. Bei höheren Kupfermengen wurden stabile Wirkungsgrade im Bereich über 90% erreicht. In diesem Bereich war aber der Nachweis einer Zusatzwirkung von 2H13 nicht möglich. Idealerweise hätte man eine Kupferdosierung gefunden, die reproduzierbar ca. 50% Wirkung hat. Dies war aber nicht möglich, da in den meisten Biosystemen in diesem Wirkungsbereich die höchsten Varianzen zu finden sind. Deshalb blieb für verlässliche Aussagen nur die Wiederholung der Varianten in mehreren Versuchen und die Auswertung über die Metaanalyse. Mit der Metaanalyse konnte geprüft werden, ob die Tendenzen immer in die gleiche Richtung gehen und dadurch durch mehrfaches Wiederholen signifikant wurden, oder ob die Tendenzen von Versuch zu Versuch unterschiedlich waren. Die Metaanalysen zeigten signifikante Wirkungssteigerungen von 0,1% Cuprozin progress durch 2H13 von 17% an Kartoffeltopfpflanzen und 7% an Tomatentopfpflanzen. Ebenfalls wurde die Wirksamkeit von Bordoflow new durch 2H13 an Tomatentopfpflanzen signifikant um 5% verbessert. An Gurkenpflanzen wurde die Wirksamkeit von 0,01% Cuprozin progress gegen *P. cubensis* durch 2H13 signifikant um durchschnittlich 21% erhöht und 0,03% Cuprozin progress um 13%.

Die hohen Varianzen in den Topfpflanzenversuchen erschwerten auch die Aufklärung des Wirkmechanismus in AP6. Zur sicheren Identifikation von Einflussfaktoren wie z.B. den pH-Wert der Spritzbrühe oder Zugabe von Haftmitteln mussten die Varianten immer in mehreren Versuchen wiederholt werden und über eine Metaanalyse die Effekte berechnet werden. Dadurch wurde die Anzahl der möglichen Prüfvarianten reduziert.

Zoosporen von *P. infestans* keimen auf der Oberfläche von Wirtspflanzen und bilden Hyphen welche über Stomata oder Pflanzenwunden in das Gewebe einwandern. Die Hyphen bilden im Gewebe Haustorien aus über die sie Nährstoffe aus der Wirtszelle ziehen (Szabo & Bushnell, 2001) und sogenannte Effector Proteine (RXLR) über die extrahaustoriale Membran in die Wirtszellen einbringen (Whisson *et al.*, 2016). Diese Effector Proteine unterdrücken zum einen die Apoptose der Wirtszelle (Bos *et al.*, 2010; Whisson *et al.*, 2016) oder fördern den Nährstofftransport in die extrahaustoriale Membran (Bozkurt *et al.*, 2015). Dadurch ist *P. infestans* in der Lage außerhalb der Stomata erneut Sporangien zu bilden und sich schnell auf der Pflanze auszubreiten. Die Wirkung von kupferhaltigen Fungiziden besteht in der unspezifischen Hemmung und Denaturierung von Enzymen (Matolcsy G., Nádasy M., 1988). Dies erfolgt hauptsächlich bei Sporangien und Zoosporen von *P. infestans*, da Kupfer ein Kontaktfungizid ist (Fernández-Northcote, 2019), wenngleich Kupfer dieselbe Wirkung auch auf das Mycel hat (Goldsworht & Green, 1936).

Nach der Behandlung von Sämlingen mit *M. guilliermondii* konnten diese zu späteren Zeitpunkten hauptsächlich in den Stomata und Xyleme wiedergefunden werden (Gai *et al.*, 2009). Das bevorzugte besiedeln der Stomata zusammen mit einer Akkumulation von Kupfer in den Hefezellen (Junghans & Straube, 1991; de Silloniz *et al.*, 2002) könnte eine Möglichkeit sein die Wirkung von Kupfer zu erhöhen, indem dieses in das Gewebe der Wirtspflanze transportiert wird und dort auf die Hyphen und Haustorien von *P. infestans* wirkt bzw. das Ausbilden neuer Sporangien verhindert. Versuche im Projekt zeigten, dass die Zugabe von 2H13 zum Kupferfungizid die Kupfermenge auf dem Blatt nach 24 h tendenziell erhöhte, was die These der Akkumulation von Kupfer an den Hefezellen stützt. Wurden die Pflanzen 20 h nach der Behandlung beregnet und danach die Proben zur Kupferanalyse genommen, verringerte die Zugabe von 2H13 allerdings die Kupfermenge auf den Blättern (Abbildung 20). Dies spricht gegen die These, dass die Hefezellen das Kupfer in die Stomata transportieren und dort akkumulieren. Es ist eher zu befürchten, dass die Hefezellen schlecht auf der Oberfläche haften und dadurch das Kupfer mit den Hefezellen leichter abgewaschen wurde.

Nach Literaturangaben ist *M. guilliermondii* in der Lage Biosurfaktanten zu produzieren (Coimbra *et al.*, 2009), welche in Zusammenspiel mit anderen Mikroorganismen die Löslichkeit von Kupfer erhöhen (Camargo *et al.*, 2018). Dies würde eine bessere Verfügbarkeit der Kupferionen mit sich bringen, jedoch das Abwaschen erleichtern, wie es mit Kupfermessungen an Kartoffelblättern gefunden wurde (Abbildung 20). Dagegen spricht die gute Wirkungsverbesserung von Kupfer durch 2H13 an Gurkenpflanzen auch nach Beregnung (Abbildung 25). Möglicherweise beeinflusst die Blattoberfläche der verschiedenen Pflanzenarten das Verhalten von 2H13 auf der Pflanze und das Zusammenspiel von 2H13 und Kupfer.

Die Versuche zur Etablierung von 2H13 auf Kartoffelblättern, die Aufschluss darüber geben sollten unter welchen Bedingungen 2H13 sich auf den Blättern etabliert, waren methodisch nicht aussagekräftig, da die Hefezellen nach Abwaschen von den Blättern über eine KBE Bestimmung quantifiziert wurden. Es blieb aber unklar wie viele 2H13 sich am Blatt anhaften und dadurch bei der Quantifizierung in der Waschlösung nicht erfasst wurden. Spezifische Anfärbung von 2H13 mit einem Fluoreszenzfarbstoff und Auswertung unter dem Mikroskop könnte hier Abhilfe schaffen oder eine quantitative stammspezifische PCR-Methode. Leider gelang es in der Projektlaufzeit nicht eine dieser Methoden zu etablieren und die Besiedelung der Blätter zu messen oder Hefezellen in den Stomata zu lokalisieren.

In AP6 wurde im ersten Projektjahr gezeigt, dass lebende Hefezellen für die Verbesserung der Kupferwirkung verantwortlich sind. Deshalb wurde in AP8 überprüft, welche Pflanzenbehandlungsmittel 2H13 abtöten und mit welchen der Hefestamm in Tankmischungen ausgebracht werden kann. Von 21 geprüften Präparaten können 14 in Tankmischung mit 2H13 eingesetzt werden und 7 nicht. Es stehen also durchaus Optionen für ökotaugliche Spritzpläne im Kartoffelanbau und im Weinbau mit 2H13 zur Verfügung. Zu beachten ist, dass nicht alle getesteten Kupferpräparate mit 2H13 mischbar sind. Hier gab es konzentrationsabhängige Verträglichkeiten, die nicht nur mit dem Reinkupfergehalt korrelieren, sondern auch von der Formulierung des Kupfers abhängen. Für einen Einsatz in der Praxis müssen hier detaillierte Anwendungsempfehlungen ausgearbeitet werden. Fraglich ist noch wie groß der Spritzabstand bei nicht mischbaren Präparaten sein muss, um die Wirksamkeit von 2H13 nicht zu gefährden.

In 2019 wurden in Deutschland mit Flowbrix (Kupferoxychlorid), Airone WG, Badge, Coprantol Duo, Grifon SC (jeweils Kupferoxychlorid + Kupferhydroxid) neue Kupferpräparate im Wein- und Kartoffelanbau zugelassen. Für Flowbrix und Airone WG konnte die Mischbarkeit getestet werden, aber noch keine Versuche in den Topfpflanzentests oder im Freiland. Für die anderen Präparate liegt noch kein Mischbarkeitsversuch vor. Die im Projekt erarbeiteten Daten erlauben bisher also nur eine Anwendungsempfehlung in Kombination mit Cuprozin progress und Bordoflow new.

Bordoflow new konnte bis zu einer Konzentration von 0,4% (0,05 Reinkupfer/l) mit 2H13 gemischt werden und die Zugabe von 2H13 zu 0,4% Bordoflow new wirkte sich positiv auf die Wirksamkeit gegen *P. infestans* an Kartoffelpflanzen und gegen *P. cubensis* an Gurkenpflanzen aus. Aus einem Freilandversuch aus Italien gab es positive Tendenzen vom Zusatz von 2H13 zu Bordoflow new.

Für Cuprozin progress liegen umfangreiche Daten aus allen Testsystemen vor. Auch mit einer Konzentration von 1,5% (0,375 g Cu/l) war Cuprozin progress mit 2H13 mischbar. In den Tomaten- und Kartoffeltopfpflanzenversuchen wurde meist eine Kontrolle mit 0,5% Cuprozin progress mitgeführt, die Wirkungsgrade über 90% ergab. Hier wäre eine Zusatzwirkung von

2H13 nicht messbar gewesen. Die besten Effekte von 2H13 zeigten sich in den Gewächshausversuchen an Tomate und Kartoffel bei einer Reduktion von Cuprozin progress auf 0,1% (0,025 g Cu/l) und in den Klimakammerversuchen an Gurken bei 0,03% (0,0075 g Cu/l) und 0,01% (0,0025 g Cu/l). *P. cubensis* war in den Versuchen sensitiver gegen Kupfer als *P. infestans* und die Zugabe von 2H13 zu den niedrigen Kupferdosierungen zeigte im System *P. cubensis* /Gurke die besten und reproduzierbarsten Effekte. Die Klimakammerversuche an Rebensämlingen ergaben dagegen keine reproduzierbaren positiven Effekte von 2H13. 0,1% Cuprozin progress hatte meist schon eine hohe Eigenwirkung von über 90%, die dann durch Zugabe von 2H13 nicht zu verbessern war und bei noch weiter reduzierten Dosierungen waren keinen reproduzierbaren Effekte zu sehen.

In den Kartoffelfreilandversuchen wurde meist 1,2 l Cuprozin progress /ha in 400 l Wasser eingesetzt (entspricht 0,3% Cuprozin progress oder 300 g Cu/ha), um mit den geplanten 10 Behandlungen die zugelassene Höchstmenge von 3kg Cu/ha einzuhalten. Reduzierte Kupferaufwandmengen entsprachen dann 2 kg Cu/ha (0,2% Cuprozin progress) oder 1,5 kg/ha (0,15 Cuprozin progress). Die Cuprozin progress Konzentrationen lagen also etwas höher als in den Gewächshausversuchen.

Im Gegensatz zu den Gewächshausversuchen, in denen eine signifikante Wirkungsverbesserung von 0,1% Cuprozin progress durch 2H13 gegen *P. infestans* festgestellt wurde, war die Wirkungsverbesserung gegen den Blattbefall in Freilandversuchen mit durchschnittlich 1,4% nur tendenziell. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Mehrertrag in den 17 Varianten mit Kupfer + 2H13 im Vergleich zu den Kupfervarianten alleine. Dieser Mehrertrag war nicht mit der Befallsreduktion oder Befallsverzögerung zu erklären. Dies zeigte sich auch im Versuch in Hiddestorf-Hemmlingen, in dem der Mehrertrag in den Cuprozin + 2H13 Varianten festgestellt wurde, obwohl aufgrund der Trockenheit es nicht zu Befall mit *P. infestans* kam. Hier sind weitere Versuche zur Klärung des Wirkmechanismus notwendig.

Im Weinbau wurden wie geplant 6 Freilandversuche in den 3 Projektjahren durchgeführt. Auch hier wurde mit 10 Behandlungen mit einer Gesamtkupferaufwandmenge von 3 kg Cu /ha und Jahr geplant, so dass pro Behandlung im Durchschnitt 1,2 l Cuprozin progress pro ha eingesetzt wurden mit Wassermengen bis zu 1.600 l/ha. Die Konzentration von Cuprozin progress lag also bei 0,075% und damit in dem Bereich, in dem bei Kartoffeltopfpflanzen und bei Gurken signifikante Wirkungssteigerungen durch 2H13 erreicht wurden. In den Freilandversuchen im Weinbau lag die tendenzielle Wirkungsverbesserung durch 0,06% 2H13 bei der Befallsstärke auf Blättern durchschnittlich bei 7%. Dass es beim Blattbefall durch *P. viticola* nicht zu einer signifikanten Wirkungsverbesserung kam, entsprach den Versuchen an den Rebensämlingen in der Klimakammer. Aber immerhin wurde mit den 7%

Wirkungssteigerung durch 2H13 in den Freilandversuchen im Durchschnitt der gleiche Wirkungsgrad erreicht wie mit der vollen Kupferaufwandmenge (siehe Glp. 4.11.2).

Deutlich ausgeprägter war die Wirkungssteigerung durch 2H13, wenn man die Befallsstärke an den Trauben betrachtet. Hier verbesserte 0,06% 2H13 die Wirkung von reduzierten Kupfermengen in 4 Varianten signifikant ($p=0,039$) um durchschnittlich 23%. Die Reduktion der Kupferaufwandmenge auf 2/3 reduzierte den durchschnittlichen Wirkungsgrad der vollen Kupferaufwandmenge um 23%. Diese Wirkungsreduktion konnte durch Zugabe von 2H13 ausgeglichen werden. Hier konnte im Mittel über die Versuche durch Zugabe von 2H13 also 33% der Kupfermenge ohne Wirkungsverlust eingespart werden.

Neben der Wirksamkeit der Behandlung sind für die Entscheidungsfindung des Anwenders auch die Kosten der Behandlung entscheidend. Für die folgenden Berechnungen wurde ein Endverbraucherpreis von 100 EUR/kg 2H13 zu Grunde gelegt, der sich aus dem Angebot der Produzenten unter Berücksichtigung der Margen für den Entwickler und Zwischenhändler ergibt. Die volle Aufwandmenge Cuprozin progress wurde in allen Kulturen mit 1,2 l/ha und Behandlung angenommen und der Preis für Cuprozin progress aus der Preisliste der Firma Beiselen 2019 entnommen.

In Kartoffeln ergäbe sich bei Verwendung von 0,06% 2H13 Kosten von 24 EUR/ha. Bei einer Reduktion auf die Halbe Kupfermenge würden diese Kosten am Cuprozin progress eingespart (Tabelle 24). Bei einer Reduktion der Kupfermenge auf nur zwei Drittel, ergeben sich Mehrkosten für die Behandlung von 8 EUR. Berücksichtigt man bei der Kartoffel allerdings den durchschnittlichen Mehrertrag von 7% in den Freilandversuchen (siehe Glp. 4.11.1) ist der Einsatz von 2H13 auf jeden Fall wirtschaftlich.

Tabelle 24: Preiskalkulation (EUR/Behandlung) für die kombinierte Anwendung von 2H13 mit reduzierten Mengen von Cuprozin progress in verschiedenen Kulturen.

	Wasser- menge (L/ha)	2H13 (%)	2H13 (kg/ha)	2H13 (€/kg)	2H13 (€/ha)	Cuprozin progress (L/ha)	Cuprozin progress (€/ha)	Halfte Cup + 2H13 (€/ha)	2/3 Cup + 2H13 (€/ha)
Kartoffel	400	0,06	0,24	100	24	1,2	46,6	47,3	55,1
Weinbau	1.600	0,06	0,96	100	96	1,2	46,6	119,3	127,1
Weinbau	1.600	0,02	0,32	100	32	1,2	46,6	55,3	63,1
Kernobst	1000	0,06	0,6	100	60	1,2	46,6	83,3	91,1
Kernobst	1000	0,02	0,2	100	20	1,2	46,6	43,3	51,1
Kernobst	400	0,06	0,24	100	24	1,2	46,6	47,3	55,1

Durch die im Weinbau notwendige hohe Aufwandmenge von 0,06% 2H13 und die hohen Wasseraufwandmengen von bis zu 1.600 l/ha werden 0,96 kg 2H13 pro Behandlung und ha benötigt. Dies entspricht Kosten von 96 EUR für 2H13. Kupferreduktion auf 2/3 Einsparungen

beim Kupferpräparat von nur 15,5 EUR. Die Kupferreduktion mit Hilfe von 2H13 im Weinbau ist also mit Mehrkosten für den Weinbauern verbunden. In den Weinbauversuchen wurden keine Erträge erfasst, so dass keine Daten zu einem eventuellen Mehrertrag vorliegen, der die Mehrkosten ausgleichen könnte. Weitere Versuche mit reduzierten Aufwandmengen (Reduktion der Konzentration oder der Wassermenge) sind notwendig.

Versuche zur Bekämpfung von Apfelschorf, die außerhalb des Projektes gemacht wurden, zeigten, dass auch dort Kupferreduktion durch 2H13 möglich ist, solange keine großen Regenmengen auftreten (siehe Glp. 4.9.2). Der Einsatz von 2H13 mit der halbierten Kupfermenge wäre im Kernobst gegen Apfelschorf dann wirtschaftlich neutral, wenn 2H13 mit 0,02% eingesetzt würde. Bei einer Reduktion der Wassermenge auf 400 l/ha, wie sie in vielen Anbaugebieten üblich ist, wäre auch der Einsatz von 0,06% 2H13 wirtschaftlich neutral.

6 Öffentlichkeitsarbeit

Die Ergebnisse aus den Biotests wurden im November 2017 auf der Europäischen Tagung zu Kupfer als Pflanzenschutzmittel in Berlin vorgestellt. Armin Weiß war Teilnehmer der 3. Europäische Tagung zu Kupfer als Pflanzenschutzmittel am 15./16.11.2018 und der 4. Europäische Tagung zu Kupfer als Pflanzenschutzmittel am 14./15. 11. 2019 jeweils in Berlin. Im Rahmen dieser Veranstaltung konnten Pflanzenschutzberater und Vertreter von Fachverbänden angesprochen werden.

Des Weiteren fand am LTZ Augustenberg/ Außenstelle Donaueschingen im Rahmen einer Versuchsfeldbesichtigung 2017 mit Herrn Messmer ein Gespräch mit Mitarbeitern des Beratungsdienstes Kartoffelanbau Heilbronn e.V. (Herr Mitschke, Frau Fuchs) statt. Das LTZ konnte dabei als Versuchsansteller zur Prüfung von 2H13 gewonnen werden.

Die Etablierung der Testsysteme an Topfpflanzen von Tomate und Kartoffel im Gewächshaus zur Prüfung der Wirksamkeit von Präparaten und die Metaanalysen zur Verbesserung der Wirksamkeit von Kupfer durch 2H13 wurden auf der 61. Deutschen Pflanzenschutztagung mit einem Poster präsentiert (Hornig-Schwabe *et al.*, 2018).

Auf der gleichen Veranstaltung wurde der im Unterauftrag durchgeführte Kartoffelversuch in Kleinmachnow 2017 von Pro. Kühne, JKI, präsentiert. Frau Steitmann hat über den Versuch ihre Masterarbeit geschrieben (Steitmann, 2017).

Dr. Kunz hat das Projekt und 2H13 auf einer Kurzpräsentation auf einem Meeting von internationalen Pflanzenschutzberatern im Obst- und Weinbau am Strickhof, Winterthur, CH, vorgestellt, was Dr. Mattedi vom Forschungsinstitut in St. Michael an der Etsch veranlasste 2H13 in Praxisversuchen im Weinbau in Italien zu testen (siehe Glp. 4.11.2).

Bei Meetings auf der ABIM 2018 in Basel wurden mehrere Pflanzenschutzmittelfirmen über den Stand der Arbeiten im Projekt informiert, die Interesse an einer späteren internationalen Vermarktung des Produktes bekundeten. Auf der ABIM 2019 in Basel wurden die Firmenvertreter der Biokontrollbranche über ein Poster über den Stand der Arbeiten informiert. Mit den Daten aus diesem Abschlussbericht werden die Kontakte zu am Vertrieb von 2H13 interessierten Firmen intensiviert.

Für die Dt. Pflanzenschutztagung im September 2020 sind zwei Poster mit den Projektergebnissen angemeldet (Schild *et al.*, 2020; Schmitt *et al.*, 2020).

Informationsmaterial für Händler und Anwender wird erstellt und verbreitet, sobald die Listung als Zusatzstoff beim BVL erfolgt ist.

7 Fazit

Das Forschungsprojekt wurde erfolgreich durchgeführt. Im Rahmen des Projektes wurden mit den Gewächshaustests zur Prüfung der Wirksamkeit gegen *P. infestans* an Tomate und an Kartoffeln und mit dem Labortest zur Prüfung der Wirksamkeit gegen *Pectobacterium carotovorum* (Schwarzbeinigkeit der Kartoffel) 3 neue Testsysteme zur Wirksamkeitsprüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln etabliert, die nun das Portfolio an Dienstleistungen erweitern.

Auch das Ziel, einen biotechnologischen Zusatzstoff zu kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln zu entwickeln, der eine Reduktion der Kupfermenge beim Einsatz gegen Oomyceten (Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln, Rebenperonospora u.a.) erlaubt, wurde im Rahmen des Projektes erreicht.

Für den Hefestamm 2H13 konnten stammspezifische Charakteristika definiert werden, die die Stammerhaltung und Qualitätskontrolle ermöglichen. Eine Clearancestudie an Ratten bestätigte, dass der Stamm nicht pathogen gegen Warmblütler ist. Das Produktionsverfahren für den Hefestamm 2H13 konnte auf den industriellen Maßstab übertragen werden und aus der Pilotproduktion stand genügend Präparat für die Versuche im Projekt zur Verfügung. Qualitätsparameter sind definiert und Methoden zur Qualitätssicherung etabliert. Das Präparat ist bei 8°C für 2 Jahre lagerstabil.

Problematisch gestaltete sich die Überprüfung der Wirksamkeit der Versuchspräparate in den Biotests. Die Varianzen innerhalb der Versuchsglieder waren hoch, wodurch meist keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgliedern auftraten, und die Wirksamkeit der Kupferstandards variierte stark zwischen den Versuchen, wodurch Vergleiche über die Versuche hinweg schwierig waren. Eindeutige Aussagen über die Wirksamkeit konnten nur nach Metaanalysen über mehrere Versuche hinweg getroffen werden, wodurch die Anzahl der Prüfglieder eingeschränkt war und Versuche zum Wirkmechanismus nur eingeschränkt möglich waren. Die Metaanalysen zeigten signifikante Wirkungssteigerungen von niedrigen

Kupfermengen durch Zugabe von 2H13 gegen *P. infestans* an Tomate und Kartoffel, sowie gegen *P. cubensis* an Gurke.

In den Freilandversuchen in Kartoffeln wurde bei Auswertung des Verlaufs der Befallsstärke mit *P. infestans* zwar nur eine geringe Wirkungssteigerung der Zugabe von 2H13 zu niedrigen Kupferdosierungen nachgewiesen, dafür aber eine signifikante Steigerung des Knollenertrags um 7%. Der Reduktion von Cuprozin progress auf die Hälfte unter Zugabe von 0,06% 2H13 wäre in den Kartoffeln für den Anwender hinsichtlich der Mittelkosten kostenneutral. Bei dem in den Versuchen gemessenen Mehrertrag auch wirtschaftlich sinnvoll.

Die Freilandversuche im Weinbau zeigten, dass eine Kupferreduktion um 33% durch Zugabe von 0,06% 2H13 ohne Wirkungsverlust möglich war, wobei sich bei Auswertung der Befallsstärke auf Trauben eine signifikante Verbesserung der Wirksamkeit von niedriger Kupferaufwandmenge durch Zugabe von 2H13 ergab. Im Weinbau ist der Einsatz von 2H13 aufgrund der hohen Wassermengen allerdings mit Mehrkosten für den Anwender verbunden. Es bleibt abzuwarten, ob die Weinbauern bereit sind die Mehrkosten für die Kupferreduktion zu tragen.

Die Bio-Protect wird 2H13 beim BVL als Zusatzstoff zu Pflanzenschutzmitteln listen und plant die Markteinführung im Laufe des Jahres 2020.


Dr. Stefan Kunz (Geschäftsführer)

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

2H13	Hefestamm 2H13 der Art <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
ABIM	Annual Biocontrol Meeting
AP	Arbeitspaket
BAM	Bacteriological Analytical Manual (Bakteriologischer, analytischer Leitfaden)
BBCH	Code der B iologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, B undessortenamt und CH emische Industrie für die Entwicklungsstadien von Pflanzen
BIOTECHOOMY	Akronym des Forschungsprojektes: "Entwicklung eines biotechnologischen Pflanzenschutzmittels zur Bekämpfung von Oomyceten"
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CIPAC	Collaborative International Pesticides Analytical Council
DBU	Deutsche Bundesstiftung Umwelt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ECOVIN	Bundesverband Ökologischer Weinbau e.V.
EMKUREDÖL	Akronym des Forschungsprojektes: "Einsatz von Mikroorganismen zur Kupferreduktion bei der Bekämpfung von Kraut- und Knollenfäule und falschen Mehлтаupilzen (Oomyceten) im ökologischen Landbau"
EPPO	European Plant Protection Organization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FiBL	Forschungsinstitut für biologischen Landbau
FUBK	Fläche unter der Befallsentwicklungskurve
ITS	internal transcribed spacer
JKI	Julius Kühn Institut
KBE	Koloniebildende Einheiten
LTZ	Landwirtschaftliches Technologiezentrum
MIK	Minimale inhibitorische Konzentration
MPS	Magermilchpulver + Saccharose
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Versuche
nb	nicht bestimmt
OD660	Optische Dichte bei 660 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Phys-Chem Parameter	Physikalisch und chemische Parameter
ppm	parts per million (Teile von einer Million)
Q	Quartal
RF	Restfeuchte
rpm	Umdrehungen pro Minute
TRBA	Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe
TS	Trockensubstanz
V1 - V11	Versuchspräparate von 2H13
WG	Wirkungsgrad

WG-Formulierung	Wasserdispergierbares Granulat
WHO	World Health Organization
YGC	Yeast Medium mit Chloramphenicol
YM	Yeast Medium

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Verfahrensschritte in der industriellen Produktion von Hefegranulat.-----	8
Abbildung 2: Agarplatte mit 2H13 Kolonien in verschiedenen Verdünnungsstufen nach 2 d auf YM-Agar.-----	13
Abbildung 3: Zwei Apfelhälften eines durchgeschnittenen Apfels mit vier Wunden auf der äquatorialen Ebene 6 Tage nach der Inokulation bei 20°C gelagert.-----	17
Abbildung 4: Qualitätskontrolle V11: -----	25
Abbildung 5: Verlauf der Lebendzellzahl (KBE/g) von 2H13 Versuchspräparaten (siehe Tabelle 3) über die Zeit bei Lagerung bei 8°C. -----	27
Abbildung 6: Verlauf Lebendzellzahl (KBE/g) in Proben aus der Pilotproduktion 180823 nach unterschiedlicher Aufarbeitung und Lagerung bei 8°C.-----	28
Abbildung 7: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 40°C in Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher Verpackung. -----	29
Abbildung 8: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 20°C in Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher Verpackung. -----	29
Abbildung 9: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 40°C in nachgetrockneten Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher TS. -----	30
Abbildung 10: Verlauf Lebendzellzahl (Prozent vom Startwert) bei Lagerung bei 20°C in nachgetrockneten Proben aus der Pilotproduktion 180823 mit unterschiedlicher TS.-----	31
Abbildung 11: Verlauf Lebendzellzahl (log(KBE/g)) bei Lagerung bei 20°C von 2 Produktionschargen in jeweils drei unterschiedlichen Verpackungen. -----	31
Abbildung 12: Befall (Sporangien/cm ²) mit <i>P. infestans</i> (Säulen) im Tomatenblattscheibentest 170809 und Wirkungsgrad (rote Raute).-----	32
Abbildung 13: FUBK von <i>P. infestans</i> (M16 inokuliert mit 5E+03 Sporangien/ml) an Tomatentopfpflanzen (Hellfrucht Hilmar).-----	34
Abbildung 14: FUBK von <i>P. infestans</i> (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Tomatentopfpflanzen (Sportivo).-----	35
Abbildung 15: FUBK von <i>P. infestans</i> (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Kartoffeltopfpflanzen (Fasan). -----	37
Abbildung 16: FUBK von <i>P. infestans</i> (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Kartoffeltopfpflanzen (Marabel).-----	38
Abbildung 17: Befall von Tomatenblattscheiben mit <i>P. infestans</i> (Sporangien/cm ²) 6 Tage nach der Behandlung und der Inokulation mit 5E+03 Sporangien/ml. -----	39

Abbildung 18: FUBK von <i>P. infestans</i> (K17 inokuliert mit 5E+03 Sporangien/ml) an Tomatentopfpflanzen (Hellfrucht Hilmar).-----	41
Abbildung 19: Fläche unter der Befallskurve (FUBK) von <i>P. infestans</i> (K17 inokuliert mit 2E+04 Sporangien/ml) an Kartoffeltopfpflanzen (Marabel).-----	42
Abbildung 20: Gemessene Kupferkonzentration auf Kartoffelblättern nach Behandlung und teilweiser Beregnung mit 15 mm. -----	43
Abbildung 21: Von Kartoffelblättern durch Abwaschen in 0,06% NaCl oder 0,1% Tween 80 (T) rückisolierte Menge von 2H13 nach Auftropfen in Nu-Film P (Nu) oder in 0,9% Netzschwefel Stulln (NS). -----	44
Abbildung 22: Abundanz von 2H13 [$\log(\text{KBE}/\text{cm}^2)$] auf Kartoffeltopfpflanzen über einen Zeitraum von sieben Tagen.-----	45
Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichung der Befallsstärke mit <i>P. cubensis</i> auf Blättern von Gurkentopfpflanzen im Klimakammerversuch. -----	46
Abbildung 24: Box-Plots der Boniturwerte der befallenen Blattfläche nach protektiven Behandlungen mit Cuprozin progress, Bordoflow und 2H13 (V9) sowie Kombinationen dieser Präparate gegen den <i>P. cubensis</i> an getopften Gurken. -----	47
Abbildung 25: Boxplots der Boniturwerte der 13 Varianten von mit falschem Mehltau befallenen Gurkenblättern nach Behandlung mit Wasser, Cuprozin (2 versch. Konzentrationen), ggf. zusätzlich je dem Hefestamm 2H13 (ggf. zusätzlich einem Netzmittel (Nufilm P) mit oder ohne anschließende Beregnung. -----	49
Abbildung 26: Mittelwerte und Standardabweichung der Befallsstärke mit <i>P. viticola</i> auf Blättern von Rebensämlingen im Phytokammerversuch.-----	51
Abbildung 27: Kolonien von 2H13 (groß, rosa) und CH771 (klein, dunkelrot) auf McConkey Agar nach 14 Tagen Inkubation bei 25°C. -----	56
Abbildung 28: Entwicklung der Lebendzellzahl von 2H13 in Traubensaft unter anaeroben Bedingungen. -----	56
Abbildung 29: Entwicklung des Gewichts von in Wasser bzw. 0,6% NaCl vorinkubierten Kartoffelscheiben nach 2d Inkubation in feuchter Kammer bei 25°C. -----	59
Abbildung 30: Gewichtsabnahme durch <i>P. carotovorum</i> Befall bei unterschiedlicher Behandlung.-----	59
Abbildung 31: Befallsverlauf von <i>P. infestans</i> im Kartoffelversuch in Hohenheim 2019 an der Sorte Granola. -----	67
Abbildung 32: Mittelwerte der FUBK im Kartoffelfreilandversuch in Hohenheim 2019 an der Sorte Granola. -----	67
Abbildung 33: Wetterdaten, Behandlungszeitpunkte und Befallsstärke von <i>P. viticola</i> an Weinreben in den Varianten im Freilandversuch Geisenheim 2019. -----	70

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeits- und Zeitplan für EMKUREDÖL. -----	7
Tabelle 2: Herkunft und Art der verwendeten Mikroorganismen. -----	12
Tabelle 3: Übersicht der Präparate aus den Pilotfermentationen. MPS: Magermilchpulver + Saccharose. n.b.: nicht bestimmt. -----	20
Tabelle 4: Wachstum von Mikroorganismen auf YM-Agar und MacConkey-Agar mit 0,35% Fluconazol. -----	22
Tabelle 5: Ergebnisse der mikrobiologischen Qualitätskontrolle in den 2H13 Versuchspräparaten. -----	24
Tabelle 6: Phys.-Chem. Parameter: -----	26
Tabelle 7: Anzahl der Versuche (N) und Mittelwert (MW) der Wirkungsgrade von zwei Cuprozin progress Dosierungen in Tomatenblattscheibentests. -----	33
Tabelle 8: Metaanalyse zur Verbesserung der Wirksamkeit von Cuprozin progress oder Bordoflow new (0,4%, 0,2%, 0,04%) gegen <i>P. infestans</i> an Tomatentopfpflanzen durch die Zugabe von 2H13 (0,02 %; 0,06%). -----	36
Tabelle 9: Metaanalyse zur Verbesserung der Wirksamkeit von Cuprozin progress gegen <i>P. infestans</i> an Kartoffeltopfpflanzen durch die Zugabe von 2H13 (0,02%, 0,06%, 0,1%). -----	38
Tabelle 10: Fläche unter der Befallsentwicklungskurve (FUBK) in verschiedenen Behandlungen nach Inokulation von Tomatenpflanzen mit <i>P. infestans</i> und Auswertung der Befallsstärke. -----	40
Tabelle 11: Metaanalyse zur Verbesserung der Wirksamkeit von Cuprozin progress durch die Zugabe von 2H13 (0,02%, 0,06%, 0,18%) gegen <i>P. cubensis</i> . -----	50
Tabelle 12: Wirkstoff, Wirkstoffgehalt und im Mischbarkeitstest eingesetzte Konzentration (Konz.) der Präparate sowie deren Wirkung auf 2H13 (WG%). -----	52
Tabelle 13: Vergleich von Hefestämmen der Arten <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Mg), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc), <i>Pichia manshurica</i> (Pm) und <i>Aureobasidium pullulans</i> (Ap) in Bezug auf Ihre Wachstumsbedingungen und Sensitivität gegenüber Antimycotica und Fungiziden. -----	54
Tabelle 14: Alkohole in Traubensaft nach einer Woche unter anaeroben Bedingungen. -----	57
Tabelle 15: Übersicht der 6 Pathogene für die eine nähere Untersuchung der Wirkung von Kupfer und 2H13 sinnvoll erschien. -----	58
Tabelle 16: Wirkungsgrade (WG) und Synergismusfaktoren (SF) der Mischungen aus 2H13 und dem Prüfmittel gegen das jeweilige Pathogen im Apfelwundtest. -----	61
Tabelle 17: Anzahl der Artikel für <i>M. guilliermondii</i> bzw. seine Synonyme und für <i>Candida albicans</i> sowie für die Kombinationen aus „Artname“ und „pathogenicity“ in verschiedenen Datenbanken im August/September 2018. -----	63
Tabelle 18: Versuchsglieder und Gesamtkupferaufwandmenge im Kartoffelversuch 2019 in Hohenheim. -----	66
Tabelle 19: Wirkungsgrade der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) berechnet anhand der FUBK von <i>P. infestans</i> in Kartoffel. -----	68
Tabelle 20: Relative Erntemenge der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) in den Kartoffelfreilandversuchen. -----	69

Tabelle 21: Bonitur von Blattbefall (FUBK aus 3 Bonituren) und von Traubenbefall (Bonitur am 27.8.) mit <i>P. viticola</i> im Weinversuch in Geisenheim 2019.-----	71
Tabelle 22: Wirkungsgrade der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) berechnet anhand der FUBK der Befallsstärke von <i>P. viticola</i> in an Blättern der Weinreben.-----	72
Tabelle 23: Wirkungsgrade der Kupferbehandlungen (CU), der Behandlung mit reduzierter Kupfermenge (CUR) jeweils mit und ohne Zugabe von 2H13 Versuchspräparat (V) berechnet anhand der Befallsstärke von <i>P. viticola</i> an den Trauben.-----	73
Tabelle 24: Preiskalkulation (EUR/Behandlung) für die kombinierte Anwendung von 2H13 mit reduzierten Mengen von Cuprozin progress in verschiedenen Kulturen.-----	82

8.4 Literatur

- Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**, 265–267.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N, 2002. In Vivo Pathogenicity of Eight Medically Relevant Candida Species in an Animal Model. *Infection* **30**, 286–291.
- Arras G, De Cicco V, Arru S, Lima G, 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**, 413–418.
- Baumgart J, 1999. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. , 695.
- Baz M, Lahbabi D, Samri S *et al.*, 2012. Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 303–311.
- Bos JIB, Armstrong MR, Gilroy EM *et al.*, 2010. Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 9909–9914.
- Bozkurt TO, Belhaj K, Dagdas YF *et al.*, 2015. Rerouting of Plant Late Endocytic Trafficking Toward a Pathogen Interface. *Traffic* **16**, 204–226.
- Bussey MJ, Stevenson WR, 1991. A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. *Plant Disease* **75**, 385–390.
- Camargo FP, Prado PF do, Tonello PS, Dos Santos ACA, Duarte ICS, 2018. Bioleaching of toxic metals from sewage sludge by co-inoculation of *Acidithiobacillus* and the biosurfactant-producing yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Journal of Environmental Management* **211**, 28–35.
- Cebeci Güler N, Tosun, Aydin F, 2017. The identification of *Meyerozyma guilliermondii* from blood cultures and surveillance samples in a university hospital in Northeast Turkey: A ten-year survey. *Journal de Mycologie Medicale* **27**, 506–513.
- Chen CY, Huang SY, Tang JL *et al.*, 2013. Clinical features of patients with infections caused by *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* and antifungal susceptibility of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-10. *J Antimicrob Chemother.*
- Coimbra CD, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA, 2009. Studies of the cell surface properties of candida species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology* **58**, 245–251.

- Colby SR, 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* **15**, 20–22.
- Das VM, Ballal M, 2008. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista iberoamericana de micologia* **25**, 208–210.
- Dobrat W, A. M, 2007. *CIPAC Handbook Volume F: Physico-chemical Methods for Technical and Formulated Pesticides*. (CIPAC Limited, Ed.). Abingdon: Marston Book srvcies Ltd.
- Dobrat W, Martijn A, 2003. *CIPAC Handbook Volume K: Analysis of Technical and Formulated Pesticides*. (CIPA Council, Ed.). Abingdon.
- Dobrat W, Martijn A, 2005. *CIPAC Handbook Volume L - Analysis of Technical and Formulated Pesticides* (Collaborative International Pesticides Analytical Council LTD, Ed.). Abingdon.
- Düring K, Porsch P, Fladung M, Lörz H, 1993b. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal* **3**, 587–598.
- Edwards JJE, Montgomerie JZ, Ishida K, Morrison JO, Guze LB, 1977. Experimental Hematogenous Endophthalmitis Due to *Candida*: Species Variation in Ocular Pathogenicity. *The Journal of Infectious Diseases* **135**, 294–297.
- FAO/WHO, 2016. *Manual on development and use of FAO and WHO Specifications for Pesticides* (FJM on P Specifications, Ed.). Rome.
- Fernández-Northcote EN, 2019. *Fungicides: Past, Present and Future of Fungicides Used for Late Blight Control*.
- Gai CS, Lacava PT, Maccheroni Jr. W *et al.*, 2009. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *J Basic Microbiol.* **49**, 441–451.
- Gitzel J, Kühne S, 2016. Status Quo der Forschung zu Minimierung und Ersatz kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel in Deutschland. *Journal für Kulturpflanzen* **68**, 125–129.
- Goldswortht MC, Green EL, 1936. AVAILABILITY OF THE COPPER OP BORDEAUX MIX-TURE RESIDUES AND ITS ABSORPTION BY THE CONIDIA OP SCLEROTINIA PRUCTICOLA». *Journal of Agricultural Research* **52**, 517–533.
- Hahn M, Leroch M, Plesken C, Naoshin Z, Weber R, 2013. Grey mould isolates from German strawberry fields show multiple fungicide resistance and represent a novel clade between *B. cinerea* and *B. fabae*. *Journal für Kulturpflanzen* **65**, 170–171.
- Hornig-Schwabe S, Weiß A, Schwarz M, Hinze M, Weißhaupt S, Kunz S, 2018. P. infestans - Gewächshausversuche an Tomaten- und Kartoffelpflanzen zur Entwicklung einer Kupferreduktionsstrategie. In: Institut J-K, ed. *61. Deutsche Pflanzenschutztagung*. Berlin: Arno Brynda GmbH, 491.
- Junghans K, Straube G, 1991. Biosorption of copper by yeasts. *Biology of Metals* **4**, 233–237.
- Kotlyar AN, Nagornaya SS, Zharova VP, 1990. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* on the organs of laboratory animals. *Mikrobiologicheskii Zhurnal 1990 Vol.52 No.1 pp.61-64 ref.13* **52**, 61–64.
- Krcmery V, Barnes AJ, 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* **50**, 243–260.
- Kunz S, Hinze M, 2018. Assessment of new scab control strategies in greenhouse trials. In: FÖKO e.v., ed. *Proceedings of the 18th International Conference on Organic Fruit-Growing*. Weinsberg, 50–56.
- Kunz S, Hinze M, Weiß A *et al.*, 2016a. *Entwicklung eines biotechnologischen Pflanzenschutzmittels zur Bekämpfung von Oomyceten* (B-P GmbH, Ed.). TIB Hannover.
- Kunz S, Hinze M, Weiß A *et al.*, 2016b. *Entwicklung eines biotechnologischen Pflanzenschutzmittels zur Bekämpfung von Oomyceten*. TIB Hannover.

- Lima G, Spina AM, Castoria R, De Curtis F, De Cicco V, 2005. Integration of biocontrol agents and food-grade additives for enhancing protection of stored apples from *Penicillium expansum*. *J Food Prot* **68**, 2100–2106.
- Marcos-Zambrano LJ, Puig-Asensio M, Pérez-García F *et al.*, 2017. *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**.
- Matolcsy G., Nádasy M. A V., 1988. Studies in Environmental Science, 5. Fungicides. In: *Studies in Environmental Science*. 272–486.
- Miceli MH, D'Áz JA, Lee SA, 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases* **11**, 142–151.
- Papon N, Savini V, Lanoue A *et al.*, 2013. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet*. **59**, 73–90.
- dos Santos ALS, Soares RM de A, 2005. *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **43**, 13–20.
- Savini V, Catavittello C, Onofrillo D *et al.*, 2011. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* **54**, 434–441.
- Schild M, 2019. Establishment of quality criteria and methods for quality control of microbial plant protection agents. Hochschule Offenburg.
- Schild M, Weißhaupt S, Weiß A, Hornig-Schwabe S, Schwarz M, Kunz S, 2020. Ein Additiv zur Verbesserung der Wirksamkeit von Kupferpräparaten gegen Oomyceten. In: 62. *Deutsche Pflanzenschutztagung*. angemeldet.
- Schmitt A, Scherf A, Porsche F *et al.*, 2020. *Meyerozyma guilliermondii* Stamm 2H13 - ein vielversprechender Kandidat zur Kupferreduktion im Pflanzenschutz. In: 62. *Deutsche Pflanzenschutztagung*. angemeldet.
- de Siloniz M-I, Balsalobre L, Alba C, Valderrama M-J, Peinado J, 2002. Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology* **153**, 173–180.
- Spletzer ME, Enyedi AJ, 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* **89**, 722–727.
- Steitmann S, 2017. Feldversuch zur Regulierung der Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) an Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.) durch Halbierung der Kupferaufwandmenge und Einsatz von Mikroorganismen als Zusatzstoff im Ökologischen Landbau. Hochschule für nachhaltige Entwicklung Eberswalde.
- Süle S, Seemüller E, 1987. The Role of Ice Formation in the Infection of Sour Cherry Leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.
- Szabo LJ, Bushnell WR, 2001. Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7654–7655.
- Whisson SC, Boevink PC, Wang S, Birch PR, 2016. The cell biology of late blight disease. *Current Opinion in Microbiology* **34**, 127–135.