



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 285 920 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 01 N 25/32

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 01 N / 331 043 2

(22) 27. 01. 89

(44) 10. 01. 91

(71) siehe (73)

(72) Nagy, József, Dr.-Ing.; Nagy, István, Dr.; Kecskés, Mihály, Dr.; Balogh, Károly, Dr. Dipl.-Chem.; Mile, Erzsébet; Tarpai, Gyula, Dr.-Ing.; Séllei, Katalin; Fodor, Károly, Dipl.-Chem.; Tóth, Erzsébet; Horváth, Zsuzsanna, HU

(73) Északmagyarországi Vegyiművek, 3792 Sajóbábo, HU

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, Berlin, 1130, DD

(54) Verfahren zur Herstellung antidotumtragender Makroorganismen, welche zur Verminderung der die Kulturpflanzen schädigenden Wirkung von Thiolcarbamaten und Chloracetaniliden geeignet sind

(55) Herstellung; antidotumtragende Makroorganismen; Kulturpflanzen; Thiolcarbamate; Chloracetanilide; Makroorganismen, natürliche, genmanipulierte; Zellkultur; Pestizide; Regulatoren; Antidota

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung antidotumtragender Makroorganismen, welche zur Verminderung der die Kulturpflanzen schädigenden Wirkung von Thiolcarbamaten und Chloracetaniliden geeignet sind. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man irgendeine Art von in oder auf Feldböden lebenden oder unter Laborbedingungen in einem flüssigen oder festen physiologischen Medium gezüchteten, natürlichen oder genmanipulierten Makroorganismen, bevorzugt genmanipulierten Pflanzen höherer Ordnung oder deren Organ-Gewebe- oder Zellkultur mit bestimmten Verbindungen oder deren Gemischen untereinander oder mit anderen Pestiziden, Regulatoren, Antidota usw. in solchen Mengen, die 5 bis 50 000 g/ha Wirkstoff bzw. 0,002 bis 5 000 ppm Wirkstoff entsprechen, behandelt, dann die derart antidotumtragend gewordenen Makroorganismen innerhalb von 30 Tagen nach der Behandlung erntet und erforderlichenfalls konserviert und/oder durch Zerkleinern, Pulverisieren, Extrahieren, Trocknen oder in anderer Weise aufarbeitet.

Patentansprüche:

Verfahren zur Herstellung antidotumtragender Makroorganismen, welche zur Verminderung der die Kulturpflanzen schädigenden Wirkung von Thiolcarbamaten der allgemeinen Formel (I) vorin

R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind, und für eine C_{1-6} -Alkyl- oder C_{3-6} -Cycloalkylgruppe stehen; oder R_1 und R_2 mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, eine Hexamethylenimino-Gruppe bilden; und
 R_3 eine C_{1-6} -Alkylgruppe bedeutet,

oder von Chloracetaniliden der allgemeinen Formel (VIII), worin

R_4 und R_5 gleich oder verschieden sind, und für Wasserstoff oder eine C_{1-6} -Alkylgruppe stehen; und
 R_6 eine C_{1-6} -Alkyl-, C_{2-6} -Alkenyl-, (C_{1-3} -Alkoxy)-(C₁₋₃-alkyl)- oder Pyrazolyl-(C₁₋₃-alkyl)-Gruppe bedeutet,

geeignet sind, dadurch gekennzeichnet, daß man irgendeine Art der in bzw. auf Feldböden lebenden oder unter Laborbedingungen in einem flüssigen oder festen physiologischen Medium gezüchteten, natürlichen oder genmanipulierten Makroorganismen, bevorzugt genmanipulierten Pflanzen höherer Ordnung oder deren Organ-, Gewebe- oder Zellkultur mit irgendeiner der Verbindungen der allgemeinen Formeln (I) bis (VII), worin R_1 , R_2 und R_3 wie oben definiert sind, oder mit deren acylierten oder esterifizierten Derivaten, oder mit deren 0,0001 bis 99 Masseanteilen – in % – Gemischen untereinander oder mit anderen Pestiziden, Regulatoren, Antidota, Kunstdüngern oder anderen organischen oder anorganischen, natürlichen oder synthetischen Stoffen in solchen Mengen, die 5 bis 50000 g/ha Wirkstoff, bzw. 0,002 bis 5000 ppm Wirkstoff entsprechen, behandelt, dann die derart antidotumtragend gewordenen Makroorganismen innerhalb von 30 Tagen nach der Behandlung erntet und erforderlichenfalls konserviert und/oder durch Zerkleinern, Pulverisieren, Extrahieren, Trocknen oder in anderer Weise aufarbeitet.

Hierzu 2 Seiten Formeln

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung antidotumtragender Makroorganismen, welche zur Verminderung der die Kulturpflanzen schädigenden Wirkung von Thiolcarbamaten der allgemeinen Formel (I), worin

R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind, und für eine C_{1-6} -Alkyl- oder C_{3-6} -Cycloalkylgruppe stehen; oder worin R_1 und R_2 mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, eine Hexamethylenimino-Gruppe bilden; und
 R_3 eine C_{1-6} -Alkylgruppe bedeutet, oder von Chloracetaniliden der allgemeinen Formel (VIII), worin
 R_4 und R_5 gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff oder eine C_{1-6} -Alkylgruppe stehen; und
 R_6 eine C_{1-6} -Alkyl-, C_{2-6} -Alkenyl-, (C_{1-3} -Alkoxy)-(C₁₋₃-alkyl)- oder Pyrazolyl-(C₁₋₃-alkyl)-Gruppe bedeutet.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Aus der Praxis des Pflanzenschutzes ist es allgemein bekannt, daß Thiolcarbamate der allgemeinen Formel (I), besonders EPTC [S-Ethyl-N,N-di(n-propyl)-thiolcarbamate], Butylat [S-Ethyl-N,N-di(isobutyl)-thiolcarbamate], Vernolat [S-Propyl-N,N-di(n-propyl)-thiolcarbamate], Ethiolat [S-Ethyl-N,N-diethyl-thiolcarbamate], Cycloat [S-Ethyl-N-ethyl-N-cyclohexyl-thiolcarbamate], Molinat [S-ethyl-N,N-hexamethylen-thiolcarbamate], sowie Chloracetanilide der allgemeinen Formel (VIII), besonders Alachlor (2-Chlor-2',6'-diethyl-N-methoxymethyl-Acetanilid), Acetochlor (2-Chlor-2'-ethyl-6-methyl-N-ethoxymethyl-acetanilid) und Propachlor (2-Chlor-N-isopropyl-acetanilid) sehr wirksame Herbizide sind. Ein gemeinsamer Nachteil beider herbiziden Wirkstoffklassen besteht darin, daß diese eine verhältnismäßig niedrige Selektivität gegen einige Kulturpflanzen, z. B. gegen Mais, aufweisen.

Vor etwa 25 Jahren hatte Hoffmann erkannt, daß es Verbindungen – z. B. 1,8-Naphthalsäureanhydrid-Derivate – gibt, die den phytotoxischen Effekt verringern. Von diesem Zeitpunkt wurde die Erforschung solcher synthetischen Verbindungen begonnen, die den auf die Kulturpflanzen ausgeübten schädigenden Effekte der Herbizide antagonisieren können.

In den folgenden HU-PS werden Antidota verschiedener Typen beschrieben:

Nr. 165736; Verbindungen in Form von Dichloracetamid-Derivaten, z. B. N,N-Diallyl-2,2-dichloracetamid (Kodenummer R-25788) als Antidota gegen Thiolcarbamate;

Nr. 168977; Antidota in Form von Oxazolidinen und Thiazolidinen, die besonders bei Thiolcarbamaten anwendbar sind;

Nr. 170214; Gegengifte (Antidota) in Form von Thiazolidinsulfoxiden und Thiazolidinsulfonen, die bei Thiolcarbamaten und Chloracetaniliden anwendbar sind;

Nr. 173775; Gegengifte (Antidota) in Form von Sulfiden zum Antidotieren von Thiolcarbamaten;

Nr. 176867; Oxazolidinderivate zum Antidotieren von Thiolcarbamaten;

Nr. 179643; N-Benzoylsulfonyl-carbamate zum Antidotieren von Thiolcarbamaten;

Nr. 180069; N-Benzoylsulfonyl-thiolcarbamate zum Antidotieren von Thiolcarbamaten;

Nr. 180068; 2,3-Dibrompropionamid-Derivate zum Antidotieren von Thiolcarbamaten;

Nr. 174487, 176784, 280422, 181621, 183997, 185400 und 188135: Antidota in Form von substituierten Acetaniliden gegen Thiolcarbamate und Chloracetanilide.

Nr. 176669, 176796, 178892 und 178895: Antidotierende Wirkung von Dicarbonsäurederivaten mit den von den obigen abweichenden Strukturen gegen Thiolcarbamate und/oder Chloracetanilide; sowie

Nr. 178883, 179092 und 179093: Naphthalincarbonsäure-Derivate als Antidota gegen Thiolcarbamate und/oder Chloracetanilide.

Ein Ergebnis der zur Erhöhung der Selektivität von Thiolcarbamaten dienenden Forschungen wurde von J.E. Casida und Mitarbeitern in 1974 mit dem Titel „Thiolcarbamate sulfoxide herbicides“ mitgeteilt. Das Wesen dieser Mitteilung besteht darin, daß das Sulfoxid von EPTC, das ein Zersetzungsprodukt von EPTC ist, eine gute herbizide Wirkung ausübt, aber den Mais nicht schädigt. Diese Erkenntnis hat sich aber nur bis zur selbständigen Verwendung des EPTC-Sulfoxides erstreckt, das in der Praxis wegen einiger nachteiliger Eigenschaften (z. B. kann es nicht in allen Böden verwendet werden) nicht angewendet wird. Trotz der hohen Anzahl der Patentschriften, in welchen die Forschungsergebnisse bekanntgemacht wurden, ist es nicht gelungen, eine Verbindung zu finden, mit deren Hilfe der allgemeine Schutz der Kulturpflanzen gegen die schädigende Wirkung der verschiedenen Herbizide erreicht werden konnte. Diese Tatsache wird auch dadurch unterstützt, daß die auf die Aufklärung der antidotierenden Wirkung gerichteten Forschungen keinen einheitlichen Standpunkt hinsichtlich der biochemischen Prozesse, die sich nach der Zugabe von Antidota abspielen, bzw. hinsichtlich der Einflüsse dieser Verbindungen auf die in den Kulturpflanzen durch die herbiziden Wirkstoffe hervorgerufenen Prozesse ergeben konnten.

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung sollen die Nachteile des Standes der Technik beseitigt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Im Laufe von Untersuchungen zur Verminderung der die Kulturpflanzen schädigenden Wirkung von Herbiziden der Typen Thiolcarbamate der allgemeinen Formel (I) und der Chloracetanilide der allgemeinen Formel (VIII) wurde gefunden, daß die in dem mit den Thiolcarbamaten der allgemeinen Formel (I) vorbehandelten Boden, weiterhin in Makroorganismen entstehenden Verbindungen der allgemeinen Formeln (II) bis (VII), worin

R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind, und für eine C₁₋₆-Alkyl- oder C₃₋₆-Cycloalkylgruppe stehen; oder R₁ und R₂ mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, eine Hexamethylenamino-Gruppe bilden;

R₃ eine C₁₋₆-Alkylgruppe bedeutet;

R₄ und R₆ gleich oder verschieden sind, und Wasserstoff oder eine C₁₋₆-Alkylgruppe bedeuten;

R₆ für eine C₁₋₆-Alkyl-, C₂₋₆-Alkenyl-, (C₁₋₃-Alkoxy)-(C₁₋₃-alkyl)- oder Pyrazolyl-(C₁₋₃-alkyl)-Gruppe steht,

oder deren acylierte oder esterifizierte Derivate für den Schutz gegen die Phytotoxizität beider obigen herbiziden Wirkstoffe erfolgreich verwendet werden können, wenn man die Verbindungen der allgemeinen Formeln (II) bis (VII) vor der Behandlung oder gleichzeitig mit der Behandlung oder nach der Behandlung mit den herbiziden Wirkstoffen auf den Boden ausbringt. Erfindungsgemäß geht man so vor, daß man irgendeine Art der in bzw. auf Feldeböden lebenden oder unter Laborbedingungen in einem flüssigen oder festen physiologischen Medium gezüchteten, natürlichen oder genmanipulierten Makroorganismen, bevorzugt genmanipulierten Pflanzen höherer Ordnung oder deren Organ-, Gewebe- oder Zellkultur mit irgendeiner der Verbindungen der allgemeinen Formeln (II) bis (VII) oder mit deren acylierten oder esterifizierten Derivaten, oder mit deren 0,0001 bis 99 Massenanteilen – in % – Gemischen untereinander oder mit anderen Pestiziden, Regulatoren, Antidota, Kunstdüngern oder anderen organischen oder anorganischen, natürlichen oder synthetischen Stoffen in solchen Mengen, die 5 bis 50 000 g/ha Wirkstoff, bzw. 0,002 bis 5000 ppm Wirkstoff entsprechen, behandelt, dann die derart antidotumtragend gewordenen Makroorganismen innerhalb von 30 Tagen nach der Behandlung erntet und erforderlichenfalls konserviert und/oder durch Zerkleinern, Pulverisieren, Extrahieren, Trocknen oder in anderer Weise aufarbeitet.

Im Laufe des Behandlungsverfahrens über die aus den Verbindungen der allgemeinen Formeln (II) bis (VII) entstehenden Zersetzungsprodukte, bevorzugt irgendeine der Verbindungen der allgemeinen Formeln (II) bis (VII), oder deren Gemisch, oder irgendeines deren esterifizierter oder acylierter Derivate eine herbizid-antidotierende Wirkung aus, wobei sie sich an die Makroorganismen binden. So werden als Endresultat antidotumtragende, lebende Organismen erhalten.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert, ist jedoch nicht auf diese Beispiele beschränkt.

Beispiel 1

Prüfung des mit dem zu den herbiziden Wirkstoffen der allgemeinen Formel (I) gehörenden EPTC vorbehandelten Bodens, als eines Trägers der antidotierenden Stoffwechselprodukte mikrobieller Ursprungs, Feldeboden, mit einem pH-KC1-Wert von 5,7 und Gebundenheit von 46 AK, der insgesamt 0,03 % Salz, 1,9 % Humus, 14,8 ppm NO₃ + NO₂, 735 ppm P₂O₅, 853 ppm K₂O,

246 ppm Mg, 60 ppm Na, 2,1 ppm Zn, 3,2 ppm Cu und 151 ppm Mn enthielt, wurde mit einer Dosis von 8 l/ha des 72 % Wirkstoff enthaltenden Witox 72 EC (als einer Formulierung des herbiziden Wirkstoffes EPTC), bzw. mit einer Dosis von 8 l/ha des 72 % EPTC und 8 % AD-67 [N-(2,2-Dichloracetyl)-1-oxa-4-aza-bicyclo[4,5]decan] als Antidotum enthaltenden Alirox 80 EC vorbehandelt.

Von diesem Boden wurden je 600 g in Zuchtgefäße eingewogen, und darin wurde je 10 Körner verschiedener Typen von Hybridmais, sowie je 20 Körner von Mohrenhirse als Unkraut gesät.

Am 11. Tag nach dem Aussäen wurden die Grünmasse und die Sproßlänge der unter HGMIP-400/D Tageslichtlampen mit einer Beleuchtungsperiode von 16 Stunden gezüchteten und täglich bis zur Wasserkapazität des Bodens berieselten Pflanzen gemessen und das Außenbild des Maies mittels der folgenden Skala bonitiert;

4: starke Deformation, Torsion;

3: mittelmäßige Deformation, Torsion;

2: schwache Phytotoxizität;

1: intakte, gesunde Pflanze.

Anschließend wurden die Pflanzen am 14. Tag nach dem ersten Säen wieder in die Zuchtgefäße eingesät, dann wurde der Boden mit einer Dosis von 8 l/ha, bzw. 20 l/ha des 72 % EPTC enthaltenden Witox 72 EC behandelt. Am 11. Tag nach dem zweiten Säen wurden die Grünmasse und die Sproßlänge des Maies gemessen.

Aus den Angaben der Tabelle I ist ersichtlich, daß die verschiedenen Typen der in den mit EPTC, sowie mit durch AD-67 antidiotierten EPTC vorbehandelten Boden gesäten Hybridmaispflanzen sowohl die Dosis von 8 l/ha als auch von 20 l/ha günstig ertrugen, während die als Unkraut gesäte Mohrenhirse vernichtet wurde.

Tabelle I

Gestaltung der Sproßlänge, der Grünmasse und des äußeren Bildes von Hybridmais, sowie Veränderung der Grünmasse von Mohrenhirse unter Einwirkung der Behandlung mit EPTC

	Unbehandelte Kontrolle	8 l/ha	Dosis von EPTC 20 l/ha
Sproßlänge des Maies (cm/Einzelpflanze)			
Erstes Säen	21	8	–
Zweites Säen	19	19	19
Grünmasse des Maies (cm/Einzelpflanze)			
Erstes Säen	0,56	0,49	–
Zweites Säen	0,5	0,59	0,63
Bonitierung (Mais)			
Erstes Säen	2,0	1,2	–
Zweites Säen	2,0	2,0	2,0
Grünmasse der Mohrenhirse (g/Gefäß)			
Erstes Säen	0,15	0	–
Zweites Säen	0,14	0	0

Beispiel 2

Ein Versuch wurde in Labortoriums-Zuchtgefäßen ausgeführt, um die aufeinander ausgeübte synergistische, antagonistische Wirkung von verschiedenen Typen der Thiolcarbamate und antidotumtragender Bakterien (Bakteriumsuspension NI-86/21 EPTC 250) zu prüfen.

1. Materialien, Geräte und Methode

1.1. Herstellung der Bakteriumsuspension NI-86/21

Reine Stammkultur des aus dem Boden isolierten, EPTC-abbauenden Bakteriums NI-86/21 wurde auf 5 ml schräges Nutrient-Nährmedium mit der folgenden Zusammensetzung geimpft:

Fleischauszug	1 g
Hefe	2 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilliertes Wasser	1 000 ml
pH-Wert	7,4

Es wurden solche Kulturen angewandt, die älter als 3 bis 4 Tage, aber jünger als 120 Tage waren. Danach wurden im Reagenzglas vermehrte Bakterien in 10 ml sterilisiertem, destilliertem Wasser gewaschen. Die derart gewonnene Suspension enthielt etwa 10^9 /ml Bakterien. In Erlenmeyerkolben von 500 ml Inhalt wurden je 200 ml physiologische Nährlösungen gemessen, deren Zusammensetzung die folgende war:

NH_4NO_3	0,5 g
KH_2PO_4	0,4 g
K_2HPO_4	1,6 g
NaCl	0,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,5 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 mg
ZnCl_2	0,5 mg.

Dazu wurde der Wirkstoff EPTC bis auf eine Konzentration von 250 ppm gegeben. Danach wurden je 2 ml der Bakteriumsuspension in die Kolben eingemischt, die dann 24 Stunden lang auf einer Maschine geschüttelt wurden, um antidotumtragende Bakterien zu erhalten.

Anschließend wurde die Selektivität der in den einzelnen Behandlungen verwendeten Herbizide (EPTC, Butylat, Vernolat, Molinat) allein, sowie in Kombinationen mit je 10 ml der antidotumtragenden Bakteriumsuspension NI-86/21 EPTC 250 untersucht.

Zuchtgefäßversuch

Als Zuchtgefäße wurden mit PVC-Folien bekleidete Kunststoffgefäße mit einer Aufnahmefähigkeit von jeweils etwa 800 g Boden, mit einer Oberfläche von $0,8 \text{ dm}^2$ angewandt. In diese Gefäße wurden zuerst je 400 g lufttrockner, oberflächlicher Feldboden mit einem pH-Wert von 5,7, einem Humusgehalt von 1,95% und einer Gebundenheit (nach Arany) von 46 eingewogen. Darin wurden je 10 Körner des Hybridmaises Pioneer 3707, je 20 Körner der gezüchteten Mohrenhirseart „Alföldi I“ und je 0,5 g der roten Rispenhirse gesät. Die Aussaat wurde mit je 10 g Boden bedeckt und eine 6 l/ha Dosis von EPTC, bzw. Ernolat, bzw. Molinat Wirkstoff, oder eine 24 l/ha Dosis von Butylat aus den Fabriksformulierungen von ÉMV (Chemische Werke von Nord-Ungarn) ausgebracht. Die behandelte Bodenoberfläche wurde mit je 100 g Boden bedeckt und je 10 ml des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 wurden gemäß der folgenden Behandlungsliste auf die Bodenoberfläche aufgebracht.

Behandlungsliste

0	Unbehandelte Kontrolle
1	EPTC 6 l/ha
2	EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 10 ml
3	Butylat 24 l/ha
4	Butylat 2 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 10 ml
5	Vernolat 6 l/ha
6	Vernolat 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 10 ml
7	Molinat 6 l/ha
8	Molinat 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 10 ml

Ergebnisse des Zuchtgefäßversuches

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in den Tabellen II, III und IV zusammengefaßt.

Aus der Tabelle II ist ersichtlich, daß die Sproßlänge des Maises in der unbehandelten Kontrolle 22 cm betrug. Wurden EPTC bzw. Vernolat, bzw. Molinat in einer Dosis von 6 l/ha, bzw. Butylat in einer Dosis von 24 l/ha angewandt, so wurden die Sproßlängen bedeutend vermindert (9, 11, 13 bzw. 12 cm). Wurden dagegen je 10 ml des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 zu den oben angeführten Herbiziden gegeben, wurde die Sproßlänge vermindernde Wirkung von EPTC, Butylat und Vernolat aufgehoben (21, 23, bzw. 21 cm), wohingegen die Phytotoxizität von Molinat unverändert blieb (17 cm).

Die in der Tabelle III zusammengefaßten Angaben, die die Veränderung der Grünmasse des Maises betreffen, zeigen ein der Sproßlänge ähnliches Bild.

Durch Verwendung von NI-86/21 EPTC 250 in einer Dosis von je 10 ml/Zuchtgefäß wurde der Mais gegen den schädigenden Effekt der Herbizide EPTC, Butylat und Vernolat völlig geschützt.

Dies wird auch durch die Tabelle IV klar veranschaulicht, wobei der ausgezeichnete Antidotumeffekt dieses Biopräparates durch die äußere Erscheinung des Maises beurteilt werden konnte.

Die als Unkraut gesäte rote Rispenhirse und Mohrenhirse wurden in allen Behandlungen vernichtet, d. h. diese Pflanzen wurden durch das Biopräparat NI-86/21 EPTC 250 nicht geschützt.

Tabelle II

Verminderung der durch die Herbizide EPTC, Butylat, Vernolat und Molinat auf die Sproßlänge des Maises ausgeübten Phytotoxizität mit dem Biopräparat NI-86/21 EPTC 250

Herbizide	Dosis l/ha	Sproßlänge	des Maises (cm/Einzel- pflanze) Biopräparat NI-86/21 EPTC 250
EPTC	6	9	21
Butylat	24	12	23
Vernolat	6	11	21
Molinat	6	13	17

Die Sproßlänge des unbehandelten Kontrollmaises betrug 22 cm.

Tabelle III

Wirkung der Kombinationen der Herbizide EPTC, Butylat, Vernolat und Molinat mit dem Biopräparat NI-86/21 EPTC 250 auf der Grünmasse von Mais

Herbizide	Dosis l/ha	Grünmasse –	des Maises (10^{-2} Einzel- pflanze) Biopräparat NI-86/21 EPTC 250
EPTC	6	51	86
Butylat	24	60	83
Vernolat	6	54	88
Molinat	6	57	64

Die Grünmasse des unbehandelten Kontrollmaises betrug 82×10^{-2} g/Einzelpflanze.

Tabelle IV

Wirkung der Kombinationen der Herbizide EPTC, Butylat, Vernolat und Molinat mit dem Biopräparat NI-86/21 EPTC 250 auf das äußere Bild von Mais

Herbizide	Dosis l/ha	äußeres Bild –	des Maises (%) Biopräparat NI-86/21 EPTC 250
EPTC	6	55	100
Butylat	24	61	100
Vernolat	6	63	100
Molinat	6	58	61

Das äußere Bild des unbehandelten Kontrollmaises wurde als 100% angenommen.

Bonittierungsskala

100 %:	intakter, sich normal entwickelnder Mais
99–87 %:	schwache Phytotoxizität, Sproßdeformation
86–75 %:	mittelmäßige Sproßdeformation, Torsion
74–61 %:	starke Sproßdeformation, Vernichtung
50 %:	der Mais wurde vernichtet, blieb in der Keimscheide.

Beispiel 3

Die Wirkung von verschiedenen Mengen der Suspension des gemäß dem Beispiel 2 hergestellten antidotumtragenden Bakteriums NI-86/21 EPTC 250 auf die Selektivität von EPTC wurde geprüft.

Während des Zuchtgefäßversuches wurden mit PVC-Folie bekleidete Kunststoffzuchtgefäße mit einer Oberfläche von $0,8 \text{ dm}^2$, mit einer Aufnahmefähigkeit von 800 g lufttrockenem Boden angewandt, in welche zuerst je 400 g Boden eingewogen wurden. Dieser mittelmäßig gebundene obere Feldboden hatte einen Humusgehalt von 1,95% und einen pH-Wert von 5,7. Als Testpflanzen wurden je 10 Körner des Hybridmaises Pioneer 3707, 20 Körner von Mohrenhirse und 0,5 g Rispenhirse eingesät. Die Aussaat wurde durch je 100 g Boden bedeckt, dann wurden die Behandlungen mit Thiolcarbamat, bzw. mit dem Biopräparat NI-86/21 EPTC 250 wie folgt ausgeführt.

Behandlungen

0 Unbehandelte Kontrolle

1 EPTC 6 l/ha (Wirkstoff)

2 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 1 000 l/ha

3 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 5 000 l/ha

4 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 10 000 l/ha

5 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 20 000 l/ha

Die behandelte Bodenoberfläche wurde wiederholt mit je 100 g Boden bedeckt.

Der Versuch wurde am 10. Tag nach der Behandlung bonitiert, wenn die Sproßlänge und die Grünmasse des Maises, sowie die Grünmasse der Mohrenhirse und Rispenhirse gemessen wurden.

Aus der Tabelle V ergibt sich der Vorteil der Kombinationen von EPTC und NI-86/21 EPTC 250.

Tabelle V

Wirkung des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 auf die Phytotoxizität von EPTC in Maiskulturen (Angaben als % der unbehandelten Kontrolle)

Behandlungen	Mais		Mohrenhirse Grünmasse %	Rispen- hirse Grünmasse %
	Grünmasse %	Sproßlänge %		
1 EPTC 6 l/ha	74	41	0	0
2 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 1 000 l/ha	117	115	0	0
3 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 5 000 l/ha	113	112	0	0
4 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 10 000 l/ha	95	113	0	0
5 EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 20 000 l/ha	118	113	0	0

Beispiel 4

Es wurden Zuchtgefäßversuche durchgeführt, um die antidotierende Wirkung des Bakteriums NI-86/21 und die der lyophilisierten Formen des antidotumtragenden Bakteriums NI-86/21 EPTC 250 gegen EPTC, Butylat, Vernolat und Acetochlor zu vergleichen.

1. Materialien, Geräte und Methode

1.1. Herstellung der Proben des lyophilisierten NI-86/21 und NI-86/21 EPTC 250

Eine reine Stammkultur von NI-86/21 wurde auf ein schräges Nutrient-Nährmedium (Zusammensetzung siehe Beispiel 2) in fünf Reagenzgläsern geimpft. Die 3 Tage lang bei Raumtemperatur gezüchtete Bakteriummasse wurde in je 5 ml physiologische Lösung (Zusammensetzung siehe Beispiel 2) gewaschen. Mengen von je 0,1 ml der derart vorbereiteten Bakteriumssuspension wurden in 100 Petri-Schalen an Nutrienplatten versprüht. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 25°C wurde die Bakteriumskolonie in je 3 ml physiologischer Lösung suspendiert, die dann zu zehnen in 10 Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Volumen eingetragen wurden, um 10 × 30 ml Bakteriumssuspension zu gewinnen. Von denen wurden 3 × 30 ml mit 3 × 8 µl EPTC behandelt und dann bis zur an dem von diesem Zeitpunkt berechneten 5. Tag ausgeführten Lyophilisierung bei -10°C gehalten. Die Lyophilisierung wurde bei -40°C in einem „Labor MIM“ Gerät ohne Anwendung von Schutzkolloid durchgeführt. Bei der Anwendung wurden die lyophilisierten Produkte NI-86/21 und NI-86/21 EPTC 250 in je 60 ml Leitungswasser in einer jeden Flasche resuspendiert und dann gleichzeitig mit den Behandlungen mit dem Herbizidenpräparat (vor Auflauf) oder presowing (vor dem Säen) verbraucht.

1.2. Zuchtgefäßversuch

Es wurden mit PVC-Folie beklebte Kunststoffzuchtgefäße mit einer Oberfläche von 0,8 dm², mit einer Aufnahmefähigkeit von je 800 g Boden angewandt.

In diese Gefäße wurden zuerst je 400 g lufttrockener Feldboden mit einem Humusgehalt von 1,95%, einem pH-Wert von 5,7 und einer Gebundenheit (nach Arany) von 46 eingewogen. Dann wurden je 10 Körner von Mais, Sorte Pioneer 3909 sowie je 20 Körner von Mohrenhirse HIBAR eingesät. Die Aussaat wurde mit jeweils 100 g Boden bedeckt, und dann wurde eine 6 l/ha Dosis von EPTC, bzw. 12 l/ha Dosis von Butylat, bzw. eine 6 l/ha Dosis von Vernolat, oder eine 3 l/ha Dosis von Acetochlor ausgebracht. Auf diese behandelte Oberfläche wurden die aus dem Lyophilisat des Bakteriums NI-86/21 gewonnene Suspension in einer Dosis von $0,05 \times 10^3$, $0,5 \times 10^3$, 10^3 oder $2,5 \times 10^3$ l/ha, sowie das Biopräparat NI-86/21 EPTC 250 in denselben Dosen gesondert ausgebracht. Schließlich wurde die Bodenoberfläche nochmals mit je 100 g Boden bedeckt.

Behandlungen

EPTC 6 l/ha

EPTC 6 l/ha + NI-86/21 $0,05 - 0,5 - 1,0 - 2,5 \times 10^3$ l/ha

EPTC 6 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 $0,05 - 0,5 - 1,0 - 2,5 \times 10^3$ l/ha

Butylat 12 l/ha

Butylat 12 l/ha + NI-86/21 $0,05 - 0,5 - 1,0 - 2,5 \times 10^3$ l/ha

Butylat 12 l/ha + NI-86/21 EPTC 250 $0,05 - 0,5 - 1,0 - 2,5 \times 10^3$ l/ha

Verrilat 6l/ha

Vernolat 6l/ha + NI-86/21 0,05 – 0,5 – 1,0 – 2,5 × 10³l/ha

Vernolat 6l/ha + NI-86/21 EPTC 250 0,05 – 0,5 – 1,0 – 2,5 × 10³l/ha

Acetochlor 3l/ha

Acetochlor 3l/ha + NI-86/21 0,05 – 0,5 – 1,0 – 2,5 × 10³l/ha

Acetochlor 3l/ha + NI-86/21 EPTC 250 0,05 – 0,5 – 1,0 – 2,5 × 10³l/ha

Jede Behandlung wurde in fünf Wiederholungen durchgeführt. Die Pflanzen wurden bis zum 10. Tag nach der Behandlung unter Tageslichtlampen von HgMIF/400W mit einer Lichtstärke von etwa 15 KLX und Beleuchtungsperioden von 16 Stunden gezüchtet. Das Wasser wurde täglich bis zur Wasserkapazität des Bodens von oben ergänzt.

Es wurden die Grünmasse der Pflanzen und die Sproßlänge des Mais gemessen. Der Grad der Torsion des Mais wurde auf Grund der im Beispiel 1 beschriebenen Skala bewertet.

2. Ergebnisse und Folgerungen

Aus den Ergebnissen, die in Tabellen VI bis XIII zusammengefaßt sind, ist ersichtlich, daß das Lyophilisat, welches aus dem auf einem 230ppm enthaltenden Boden gezüchteten Bakterium NI-86/21 hergestellt wurde, eine bedeutende Antidotumwirkung ausübt. Eine Dosis von 500, bzw. 1000, bzw. 2500l/ha des hergestellten Lyophilisates NI-86/21 EPTC 250 beseitigt die auf den Mais ausgeübte phytotoxische Wirkung von 6l/ha EPTC, bzw. 12l/ha Butylat, bzw. 6l/ha Vernolat oder 3l/ha Acetochlor. Ohne eine Vorbehandlung mit EPTC weist das Bakterium NI-86/21 keinen antidotierenden Effekt auf.

Tabelle VI

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen der Bakteriumsuspension NI-86/21 bei einer Dosis von 6l/ha des Herbizids EPTC in Mais

Dosis von EPTC l/ha	NI-86/21 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzel- pflanze	Grünmasse g/Gefäß	
6	0	4,4	2,1	4
6	0,05	4,8	2,8	4
6	0,5	5,0	3,4	4
6	1,0	5,3	3,4	4
6	2,5	7,6	3,9	3
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD ₅₀ %		1,7	0,8	

Tabelle VII

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 bei einer Dosis von 6l/ha des Herbizids EPTC in Mais

Dosis von EPTC l/ha	NI-86/21 EPTC 250 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzel- pflanze	Grünmasse g/Gefäß	
6	0	4,4	2,1	4
6	0,05	5,9	3,1	3
6	0,5	18,6	5,1	1
6	1,0	20,9	5,7	1
6	2,5	22,5	5,8	1
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD ₅₀ %		1,7	0,8	

Tabelle VIII

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen der Bakteriumsuspension NI-86/21 bei einer Dosis von 12l/ha des Herbizids Butylat in Mais

Dosis von Butylat l/ha	NI-86/21 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzel- pflanze	Grünmasse g/Gefäß	
12	0	16,1	4,6	3
12	0,05	16,3	4,6	3
12	0,5	17,4	4,8	2
12	1,0	16,7	4,6	2
12	2,5	15,5	4,1	2
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD ₅₀ %		1,7	0,8	

Tabelle IX

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Mengen des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 bei einer Dosis von 12 l/ha des Herbizids Butylat in Mais

Dosis von Butylat l/ha	NI-86/21 EPTC 250 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzelpflanze	Grünmasse g/Gefäß	
12	0	16,1	5,6	3
12	0,05	16,0	5,0	2
12	0,5	18,1	5,1	2
12	1,0	18,6	5,0	1
12	2,5	18,7	5,0	1
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD _{5%}		1,7	0,8	

Tabelle X

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen der Bakteriumsuspension NI-86/21 bei einer Dosis von 6 l/ha von Vernolat in Mais

Dosis von Vernolat l/ha	NI-86/21 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzelpflanze	Grünmasse g/Gefäß	
6	0	7,5	4,1	4
6	0,05	6,3	3,7	4
6	0,5	8,1	4,0	4
6	1,0	7,7	4,1	4
6	2,5	12,2	4,6	3
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD _{5%}		1,7	0,8	

Tabelle XI

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 bei einer Dosis von 6 l/ha des Herbizids Vernolat in Mais

Dosis von Vernolat l/ha	NI-86/21 EPTC 250 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzelpflanze	Grünmasse g/Gefäß	
6	0	7,5	4,1	4
6	0,05	8,8	4,3	4
6	0,5	16,6	4,6	3
6	1,0	18,7	5,1	2
6	2,5	19,0	5,0	1
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD _{5%}		1,7	0,8	

Tabelle XII

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen der Bakteriensuspension NI-86/21 bei einer Dosis von 3 l/ha des Herbizids Acetochlor in Mais

Dosis von Acetochlor l/ha	NI-86/21 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzelpflanze	Grünmasse g/Gefäß	
3	0	16,0	3,9	3
3	0,05	16,4	4,1	3
3	0,5	16,6	4,8	2
3	1,0	17,3	4,8	2
3	2,5	17,9	4,7	2
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD _{5%}		1,7	0,8	

Tabelle XIII

Herbizid-antidotierende Wirkung zunehmender Dosen des Biopräparates NI-86/21 EPTC 250 bei einer Dosis von 3 l/ha des Herbizids Acetochlor in Mais

Dosis von Acetochlor l/ha	NI-86/21 EPTC 250 10 ³ l/ha	Mais		Bonitierungswert
		Sproßlänge cm/Einzelpflanze	Grünmasse g/Gefäß	
3	0	16,0	3,9	3
3	0,0	18,9	5,1	2
3	0,5	19,1	5,4	1
3	1,0	20,8	5,5	1
3	2,5	21,4	6,0	1
Unbehandelte Kontrolle		18,9	5,0	1
SZD ₅₀ %		1,7	0,8	

Beispiel 5

Es wurde ein Labor-Zuchtgefäßversuch durchgeführt, um die EPTC-antagonisierende Wirkung von aus den Sprossen und den Wurzeln von mit EPTC vorbehandelten Maispflänzchen gewonnenen acetonischen und wäßrigen Filtrate, sowie der zurückbleibenden faserigen Stoffe in Maiskulturen zu prüfen.

1. Materialien, Geräte, Methode**1.1. Verfahren zur Herstellung eines antidotumtragenden Maises**

Es wurden mit PVC-Folie bekleidete Kunststoffgefäße mit einer Oberfläche von 4 dm², mit einer Aufnahmefähigkeit von je 6000 g lufttrockenem Boden verwendet. In diese wurden zuerst je 4000 g oberer Feldboden mit einem Humusgehalt von 1,95%, einem pH-Wert von 5,7 und einer Gebundenheit (nach Arany) von 46 eingewogen. Danach wurden je 50 Körner Mais der Sorte Pioneer 3707 eingesät, die dann durch je 1000 g Boden bedeckt wurden. Danach wurden die Behandlungen der mit (E) markierten Zuchtgefäße mit je einer 6 l/ha-Dosis von EPTC durchgeführt. Die derart behandelte Bodenoberfläche wurde wiederholt mit je 1000 g Boden bedeckt.

Die Maispflanzen, welche die Behandlung (E) bekamen, wurden bis zum 14. Tag nach der Behandlung unter Tageslichtlampen von HGMIF/400 W, mit einer Lichtstärke von etwa 11 KLX mit einer täglichen Beleuchtungsperiode von 16 Stunden bei einer Temperatur von 26 ± 4 °C gezüchtet.

Das zum Berlesen gebrauchte Wasser wurde täglich bis zur Wasserkapazität von oben ergänzt. Am 14. Tag wurde der Sproß der Pflanzen in jedem Zuchtgefäß gesondert abgeschnitten, bzw. wurden die Wurzeln aus dem Boden herausgewaschen.

1.2. Gewinnung der Filtrate und der faserigen Stoffe aus dem Mais**1.2.1. Aufarbeitung des Sprosses des mit EPTC vorbehandelten /Behandlung (E)/ Maises**

55 g von dem Sproß des mit EPTC vorbehandelten /Behandlung (E)/ Maises wurden sofort nach dem Abschneiden in einer Turmixmaschine in 50 ml Wasser zerkleinert. Der so erhaltene Grus wurde halbiert, 250 ml wurden durch ein Laboratoriums-Vakuumfilter filtriert und davon wurde ein wäßriges Filtrat (Sz) gewonnen, welches mit der Kode E-Ha-Vi-Sz bezeichnet wurde. Der auf dem Filter verbliebene faserige Stoff wurde in einem Scheidetrichter mit 500 ml Aceton geschüttelt, und die Acetonphase wurde abgelassen. Diese Phase wurde mit der Kode E-Ha-Ac-Sz bezeichnet.

Die zurückbleibenden 250 ml von wäßrigem Grus wurden durch ein Vakuumfilter filtriert und der auf dem Filter gebliebene faserige Stoff wurde als selbständige Probe behandelt, welches mit dem Kode E-Ha-Vi-R bezeichnet wurde.

1.2.2. Aufarbeitung der Wurzeln des mit EPTC vorbehandelten Maises

Man arbeitete wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, daß 28 g mit einem Messer zerkleinerte Wurzeln in einer Turmixmaschine mit 400 ml Leitungswasser behandelt wurden. Aus 200 ml Grus wurden das wäßrige und dann das acetonische Filtrat gewonnen bzw. wurde der faserige Stoff aus den anderen 200 ml erhalten.

Die Kodebezeichnungen der derart gewonnenen Materialien sind die folgenden:

E-Gyö-Vi-Sz
E-Gyö-Vi-R
E-Gyö-Ac-Sz.

1.3. Prüfung der EPTC-antagonisierenden Wirkung der aus dem Mais gewonnenen Filtrate und Fasern im Zuchtgefäß**1. Anordnung des Versuches**

Es wurden mit PVC-Folie bekleidete Kunststoffgefäße mit einer Oberfläche von 0,8 dm² und einer Aufnahmefähigkeit von je 800 g Boden angewandt. In diese Gefäße wurden zuerst je 400 g oberer Feldboden mit den unter 1.1. beschriebenen Eigenschaften eingewogen. Danach wurden je 10 Körner des Maises Pioneer 3707 eingesät. Diese Aussaat wurde mit je 100 g Boden bedeckt, dann wurde EPTC in einer Dosis von 6 l/ha ausgebracht. Die derart behandelte Bodenoberfläche und die unbehandelten Gefäße wurden wiederholt mit je 10 g Boden bedeckt, und auf diese Bodenoberflächen wurden je 100 ml wäßriges Filtrat, bzw. je 100 g faserige Substanz, bzw. je 5 ml acetonisches Filtrat appliziert.

Die Pflanzen wurden bis zum 7. Tag nach dem Säen unter den unter 1.1. beschriebenen Bedingungen gezüchtet, dann wurden die Sproßlänge und die Grünmasse des Maises gemessen, und das äußere Bild des Maises wurde mittels der im Beispiel 1 beschriebenen Bonitierungsskala bewertet.

Tabelle XIV

Wirkung der aus den Sprossen (Ha) des mit EPTC (6l/ha) vorbehandelten (E) Maises gewonnenen wäßrigen (Vi) und acetonischen (Ac) Filtrate (Sz), sowie der zurückbleibenden faserigen Substanzen (R) auf die Selektivität des Herbizids EPTC (6l/ha) im Mais

Behandlungen	Sproßlänge cm/Einzel- pflanze	Mais	
		Grünmasse 10 ⁻² g/Einzel- pflanze	Bonitierungswert
Unbehandelte Kontrolle	19	72	2,0
EPTC	9	56	1,2
EPTC + (E-Ha-Vi-Sz)	19	62	1,8
EPTC + (E-Ha-Vi-R)	19	72	2,0
EPTC + (E-Ha-Ac-Sz)	20	70	2,0
E-Ha-Vi-Sz	20	72	2,0
E-Ha-Vi-R	20	79	2,0
E-Ha-Ac-Sz	18	68	2,0

Aus den Angaben der Tabelle XIV geht hervor, daß die aus den Sprossen der mit einer Dosis von 6l/ha von EPTC vorbehandelten Maispflänzchen gewonnenen Extrakte, sowie der zurückbleibende faserige Stoff den phytotoxischen Effekt des Herbizids (6l/ha EPTC) völlig beseitigt hat. Das Ergebnis der Antidotumwirkung dieser Biopräparate besteht darin, daß die Sproßlänge und das Äußere der Kulturpflanze ebenso intakt und gesund, wie die der unbehandelten Kontrolle, sind.

Tabelle XV

Wirkung der aus der Wurzel (Gyö) der mit EPTC (6l/ha) vorbehandelten (E) Maises gewonnenen wäßrigen (Vi) und acetonischen (Ac) Filtrate (Sz), sowie der zurückbleibenden faserigen Stoffe (R) auf die Selektivität des Herbizids EPTC (6l/ha) im Mais

Behandlungen	Sproßlänge cm/Einzel- pflanze	Grünmasse 10 ⁻² g/Einzel- pflanze	Bonitierungswert
Unbehandelte Kontrolle	19	72	2,0
EPTC	9	56	1,2
EPTC + (E-Gyö-Vi-Sz)	5	16	1,0
EPTC + (E-Gyö-Vi-R)	19	72	2,0
EPTC + (E-Gyö-Ac-Sz)	18	70	2,0
E-Gyö-Vi-Sz	7	22	1,4
E-Gyö-Vi-R	20	73	2,0
E-Gyö-Ac-Sz	19	68	2,0

Aus den Angaben der Tabelle XV geht klar hervor, daß das acetonische Filtrat, sowie der faserige Stoff, die aus der Wurzel der mit einer Dosis von 6l/ha EPTC vorbehandelten Maispflänzchen gewonnen wurden, eine ausgezeichnete Antidotumwirkung ausüben.



