



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 456 A1**

4(51) A 01 N 63/00

C 12 N 1/14

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 01 N / 280 761 6	(22)	18.09.85	(44)	14.10.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Institut für Technische Mikrobiologie, Alt-Stralau 62, Berlin, 1017, DD
(72)	Huber, Johann, Dr. Dipl.-Biol.; Bochow, Helmut, Prof. Dr. sc. Dipl.-Landw.; Kanther, Peter, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Krebs, Birgit, Dipl.-Gartenbauing.; Junge, Helmut, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Jacob, Marthe, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Storek, Karla; Juhr, Eberhard, Dr. Dipl.-Biol.; Vettermann, Regine, Dr. Dipl.-Biol., DD

(54)	Herstellung mikrobieller Antagonisten zur Bekämpfung von phytopathogenen Bodenpilzen
------	--

(57) Ziel der Erfindung ist es, mittels biotechnischer Verfahren zur massenweisen Herstellung von Applikationsformen definierter Mikroorganismen Antagonisten zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze, bevorzugt für den Einsatz in der gärtnerischen Produktion, bereitzustellen. Erfindungsgemäß werden die Mikroorganismen *Streptomyces spec. G43*, *ZIMET 43 801*, bzw. *Bacillus subtilis T99*, *ZIMET 11 095*, submers oder auf Oberflächen von Nährböden kultiviert. Die submers erzeugten Kulturlösungen mit hohen Keimzahlen oder die hochtitrigen Sporem-Zell-Suspensionen von Oberflächenkulturen werden nach ihrer Verdünnung für großflächige Applikationsmaßnahmen bereitgestellt.



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 250 456 A1

4(51) A 01 N 63/00
C 12 N 1/14

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 01 N / 280 761 6	(22)	18.09.85	(44)	14.10.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Institut für Technische Mikrobiologie, Alt-Stralau 62, Berlin, 1017, DD
(72)	Huber, Johann, Dr. Dipl.-Biol.; Bochow, Helmut, Prof. Dr. sc. Dipl.-Landw.; Kanther, Peter, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Krebs, Birgit, Dipl.-Gartenbauing.; Junge, Helmut, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Jacob, Marthe, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Storek, Karla; Juhr, Eberhard, Dr. Dipl.-Biol.; Vettermann, Regine, Dr. Dipl.-Biol., DD

(54)	Herstellung mikrobieller Antagonisten zur Bekämpfung von phytopathogenen Bodenpilzen
------	--

(57) Ziel der Erfindung ist es, mittels biotechnischer Verfahren zur massenweisen Herstellung von Applikationsformen definierter Mikroorganismen Antagonisten zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze, bevorzugt für den Einsatz in der gärtnerischen Produktion, bereitzustellen. Erfindungsgemäß werden die Mikroorganismen Streptomyces spec. G43, ZIMET 43 801, bzw. Bacillus subtilis T99, ZIMET 11 095, submers oder auf Oberflächen von Nährböden kultiviert. Die submers erzeugten Kulturlösungen mit hohen Keimzahlen oder die hochtitrigen Sporen-Zell-Suspensionen von Oberflächenkulturen werden nach ihrer Verdünnung für großflächige Applikationsmaßnahmen bereitgestellt.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Zur PS Nr. ..250...456.....

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Erfindungsanspruch:

1. Herstellung mikrobieller Antagonisten zur Bekämpfung von phytopathogenen Bodenpilzen mit Streptomyceten oder Bacillen in verschiedenen Applikationsformen, **dadurch gekennzeichnet**, daß *Streptomyces spec. G43* ZIMET Nr. 43801 bzw. *Bacillus subtilis* T99 ZIMET Nr. 11095 submers oder auf Oberflächen von Nährböden kultiviert werden.
2. Die Herstellung von mikrobiellen Antagonisten nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß submers erzeugte Kulturlösungen mit hohen Keimzahlen oder hochtitrige Sporen-Zell-Suspensionen von Oberflächenkulturen nach ihrer Verdünnung für großflächige Applikationsmaßnahmen bereitgestellt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von mikrobiellen Antagonisten zur Bekämpfung von phytopathogenen Bodenpilzen in der gärtnerischen Pflanzenproduktion.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Bekämpfung mikrobieller pilzlicher Erreger von Pflanzenkrankheiten in Gewächshäusern und Pflanzensubstraten erfolgt, neben den üblichen ausbautechnischen Maßnahmen, gegenwärtig durch den Einsatz synthetisch oder mikrobiell hergestellter Fungizide oder durch chemische und/oder thermische Behandlung der Substrate sowie neuerdings im Versuchsstadium auch mittels biologischer Bekämpfungsmaßnahmen.

Die Herstellung synthetisch oder mikrobiell erzeugter Fungizide ist aufwendig und teuer. Die Anwendung der synthetischen Fungizide kann vielfach die Erden und Substrate durch nicht erwünschte Nebenwirkungen belasten; außerdem schränken jeweils notwendige Karenzzeiten den Einsatz dieser Syntheseprodukte ein. Fungizide mikrobiellen Ursprungs (DD-WP 218388) haben nach ihrer Applikation nur eine begrenzte Wirkungsdauer. Diese Nachteile sind beim direkten Einsatz fungistatisch wirksamer Mikroorganismen nicht gegeben, da die Bereitstellung der Mikroorganismen, sei es in Form von Kulturlösungen oder Zell-Sporen-Suspensionen, nur einen geringen Aufwand erfordert, das ökologische System des Bodens bzw. der Pflanzenerden in keiner Weise negativ beeinflusst wird und die applizierten Mikroorganismen im Boden oder den Erds substraten (aus denen sie isoliert wurden) ein natürliches Areal finden.

Ein Verfahren zur Verhütung pilzlicher Krankheiten bei verschiedenen Kulturpflanzen auf torfhaltigem Substrat durch *Streptomyces*-Stämme, die selbst aus Torf isoliert wurden, ist in der DE-OS 3311071 beschrieben worden.

Es gibt ferner mehrere Literaturhinweise, die den Einsatz mikrobieller Antagonisten gegen pilzliche Welke- oder andere Krankheitserreger im Boden unter speziellen Applikationsbedingungen bei unterschiedlichen Wirtspflanzen und geographischen Besonderheiten beinhalten. Als antagonistisch wirksam werden bakterielle Mikroorganismen folgender Taxa genannt: *Streptomyceten*, *Bacillen*, *Pseudomonaden*, *Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.* und nicht näher beschriebene chitinolytische Bakterien. Die taxonomische Species-Zugehörigkeit o. g. Taxa wurde bis auf wenige Ausnahmen nicht angegeben.

Die zur Bekämpfung von bodenbürtigen pilzlichen Pflanzenkrankheiten verwendeten Mikroorganismen werden als Zell-Sporen- oder Mycelsuspensionen im Labormaßstab hergestellt und eingesetzt. Mitteilungen über die Herstellung und Verwendung von Applikationsformen, die im technischen Maßstab produziert werden, liegen nicht vor.

Schließlich sind die hier bekannt gewordenen bakteriellen Antagonisten nur gegen eine begrenzte Anzahl von phytopathogenen Pilzen getestet worden bzw. wirksam.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, biotechnische Verfahren zur massenweisen Herstellung von Applikationsformen definierter Mikroorganismen zu entwickeln und für den Einsatz, insbesondere in der gärtnerischen Produktion, bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit antagonistisch wirkenden Bakterienstämmen der Gattungen *Streptomyces* und *Bacillus* eine wirkungsvolle Bekämpfung bodenbürtiger phytopathogener Schadpilze durchzuführen.

Es wurde gefunden, daß *Streptomyces spec. G43* und *Bacillus subtilis* T99 sehr wirkungsvolle Antagonisten gegen phytopathogene Bodenpilze sind. Sie besitzen sowohl antifungale als auch mycellvisierende Wirkung.

Die antifungale Wirkung wird üblicherweise im Plattentest, s. u., nachgewiesen. Die mycellisierende Wirkung kann in Kulturlösungen der Antagonisten nach Zusatz von lebendem Mycel der Schadpilze ermittelt werden. Nach einer Schütteldauer der mit Pilzmycel versetzten *Bacillus*- oder *Streptomyces*kulturen von drei Tagen wird die An- oder Abwesenheit des Pilzmycels mikroskopisch und durch Ausstreichen der Kulturlösung auf Czapek-Dox-Agar (nach 48 Stunden Bebrütung) erfaßt.

Die erfindungsgemäßen Stämme wurden aus Boden- und Erds substratproben eines Gartenbaubetriebes isoliert. Die Stämme *Streptomyces spec. G43* und *Bacillus subtilis* T99 wurden in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena unter den Nummern ZIMET 43801 und ZIMET 11095 hinterlegt.

Stammcharakterisierung

Streptomyces spec. G43

Morphologie: Kurze, gerade bis leicht gewellte Sporenketten, die dem Typ Rectus-Flexibilis angehören, glatte Sporenoberfläche
 Zellwandzusammensetzung: Die taxonospezifischen Zellwandaminosäuren sind LL-Diaminopimelinsäure und Glycin
 Phasensensibilität: Sensibel gegen Streptomycesphagen
 Wachstum der Kolonien: Gutes Wachstum auf verschiedenen Medien, z. B. Waksman-Agar, Fleisch-Pepton-Agar, mit rauher Oberfläche und unregelmäßigem Rand. Koloniedurchmesser 2 bis 5 mm.

Farben von Luft- und Substratmycel auf verschiedenen Medien:

Medium	Luftmycel	Substratmycel	Agarverfärbung
Hafermehlagar	hellgrau-gelblich (reichlich)	gelbgrünlich bis oliv	keine
Glycerin-Asparagin-Agar	matt creme-gelblich (reichlich)	helloliv	keine
Anorganischer Salz-Stärke-Agar	hellgrau bis hellbeige (weniger)	beige bis helloliv	keine
Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar	graugelblich bis graugrünlich	dunkelbraun	keine

Physiologische Merkmale: Keine Melaninbildung (nicht chromogen)

Säurebildung aus: D-Glukose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Fructose, D-Mannit, D-Galactose, Salicin

Keine Säurebildung aus: L-Rhamnose, Raffinose, Saccharose, meso-Inosit

Nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) 8. Ausgabe ist dieser Stamm der Gruppe von Streptomyces-Arten zuzuordnen, die durch folgende Merkmale charakterisiert sind:

- graugelbliches Luftmycel
- Sporenketten des Rectus flexibilis-Typs
- Sporenoberfläche glatt
- Chromogenität negativ

Der hier als Streptomyces spec. G43 bezeichnete Stamm unterscheidet sich deutlich von dem von G. Turhan (1981), J. of Plant Diseases and Protection **88**, 373–381, für ähnliche Zwecke benutzten Streptomyces ochraceiselerotiens Pridham.

Bacillus subtilis T99

Form/Lage der Sporen: oval/zentral

Sporulationsverhalten: 75 %, Auf Grießagar, 4 d, 37 °C

Beweglichkeit: beweglich

Gramverhalten: Gram-positive Kurzstäbchen

Koloniemorphologie auf

— Blutplatte: grau-beige, glänzend, Rand glatt

— Nähragar: hellbeige, matt, stark, gefaltet, Rand gelappt

Säurebildung aus: D-Xylose, Glucose, d-Mannose, d-Fructose, Maltose, Trehalose, Saccharose, D-Mannit, Aesculin

Keine Säurebildung aus: d-Galactose, Lactose, Dulcitol, Rhamnose, Raffinose, Sorbit, D-Ribose

VPR: positiv

Zitratverwertung: negativ

Urease: positiv

Gasbildung aus Nitrat: negativ

Katalase: positiv

Stärkehydrolyse: Hydrolysezone 4 mm

Caseinhydrolyse: Hydrolysezone 5 mm

Gelatinehydrolyse: Hydrolysezone 7 mm

Lezithinase: negativ

Starkes Wachstum auf: Glucose-Nitratagar und Glucose-Asparaginagar

Kein Wachstum in 10% NaCl-Bouillon

Serodiagnostik, FAT mit Antisporenserum von B. subtilis

ATCC 6051: positiv

Bacillus subtilis T99 unterscheidet sich vom type strain Bacillus subtilis ATCC 6051 in folgenden Punkten:

- α -Hämolyse
- keine Säurebildung aus: Raffinose, d-Sorbit, D-Ribose
- Säurebildung aus: Xylose und Aesculin
- keine Zitratverwertung

Streptomyces spec. G43 wird zweckmäßig so vermehrt, daß in der Kulturlösung ein diffus verteiltes Mycel gebildet wird. Das Diffusmycel ist bei der Applikation eine entscheidende Voraussetzung für eine gleichmäßige Verteilung im Boden bzw. Erds substrat als Einsatzmedium. Die Herstellung der Kulturlösung erfolgt unter aseptischen Submersbedingungen in zwangsbelüfteten und gerührten Fermentern. Die Bildung eines diffus verteilten Mycels (Pelletbildung ist zu umgehen) wird beispielsweise erreicht durch die in den Beispielen 1 und 2 angegebenen Verfahrensbedingungen.

Bacillus subtilis T 99 wird ebenfalls unter Submersbedingungen im Rührfermenter kultiviert. Die Beimpfung des Produktionsmediums erfolgt mit einer Vorkultur. Nach einer Kultivationsdauer von etwa 30 Stunden wird eine Zelldichte von 10^{10} Keimen/ml erreicht. 25% der Zellen sind dann versport.

Neben submers erzeugten Kulturlösungen können für besondere Applikationszwecke auch hochtitrige Sporensuspensionen von Oberflächenkulturen mit *Streptomyces spec.* G 43 und mit *Bacillus subtilis* T 99 gewonnen werden. Die Oberflächenkulturen, insbesondere von *Streptomyces*, werden angelegt auf Schrägagar in speziell gefertigten Epruvetten mit einem Volumen von 110 ml (Ausmaße: 30 mm Durchmesser, 190 mm Länge). Diese Epruvetten gewährleisten mit 30 ml Agar infolge günstiger Feuchtigkeits- und Belüftungsbedingungen eine gleichmäßige Versporung des *Streptomyces*-Stammes.

Die antagonistische Wirkung der erfindungsgemäßen *Streptomyces*- und *Bacillus*-Stämme wurde gegen mehrere phytopathogene Bodenpilze in vitro- und z. T. in vivo-Versuchen getestet.

In vitro-Teste: 72 Stunden alte Kulturlösungen beider Stämme wurden sterilfiltriert. Das Filtrat wurde heißem Waksman-Agar im Verhältnis 1:4 und 1:8 beigemischt. Nach dem Ausgießen und Erkalten des Agars in den Petrischalen wurden die zu prüfenden Pilze jeweils in das Zentrum der Agarplatte geimpft. Parallel angelegte Kontrollen enthielten kein Kulturfiltrat.

Durch Ausmessen der Koloniedurchmesser nach einer Inkubationszeit von 4 bis 7 Tagen wurde die wachstumshemmende Wirkung der Kulturfiltrate im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt (s. Tab.).

Bodenpilze	Antagonisten	
	Str. spec. G 43	B. subtilis T 99
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. dianthi (Snyder et Hansen)	xx	xxx ^{*)}
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. gladioli (Snyder et Hansen)	xx	xxx
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. gerberae (Gordon)	xx	xxx
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. tulipae Apt.	—	—
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. cucumormum Owen	xx	xxx
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. lycopersici	xxx	xxx
<i>Phomopsis sclerotiodies</i> v. Kest	xxx	xxx
<i>Stromatinia gladioli</i> (Drayt.) Whetz.	x	xxx
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk	xxx	xxx
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Nocca & Bulb	xx	xxx
<i>Nectria radicola</i> Gerlach & Nilsson	—	xx
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> R. Schneider et Gerlach	—	xxx
<i>Phytophthora cryptogea</i>	x	xxx
<i>Curvularia radicum</i>	—	xxx

^{*)} Bewertung: xxx starke Hemmwirkung
 xx weniger stark gehemmt
 x noch gehemmt
 — keine Hemmwirkung

Für die in vivo-Versuche wurden Jungpflanzen der Edelnelke — *Dianthus caryophyllus* L. — und der Gerbera — *Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hooker — verwendet. Es gelangten Kulturlösungen oder Sporensuspensionen der erfindungsgemäßen Stämme zwecks Prüfung des Bekämpfungseffektes gegen die Welkeerreger *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. dianthi (Prill et Del.) Snyder et Hansen und *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. gerberae Gordon zum Einsatz, s. Beispiele 6 und 7.

Anwendungsbeispiele

Beispiel 1

Für die Gewinnung von Applikationsformen antagonistischer Bakterien zur Bekämpfung von phytopathogenen Bodenpilzen wurde *Streptomyces spec.* G 43 verwendet. Der Stamm wurde als Schrägagarkultur mit Waksmanagar, nachdem er 5 Tage lang bei 29°C gewachsen war, bei +4°C aufbewahrt.

Zusammensetzung des Waksman-Agars: Bacto-Peptone (Difco) 5g, Glucose 10g, Fleischextrakt 3g, NaCl 5g, Agar 20g je Liter Leitungswasser, pH 6,8. Sterilisation 30 min bei 121°C.

Für die Herstellung der Kulturlösung wurde ein 12l-Rührfermenter mit 8l Füllung benutzt. Das Produktionsmedium hatte folgende Zusammensetzung: Saccharose 0,05%, Glucose 0,2%, Stärke 1,5%, Harnstoff 0,1%, Hefeextrakt 0,1%, Pepton 0,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,2%, KCl 0,05%, Leitungswasser, pH $6,9 \pm 0,1$. Sterilisation 30 min bei 121°C.

Das Produktionsmedium wurde mit einer Sporensuspension von einer Schrägagarkultur beimpft. Die Impfdichte belief sich auf etwa 10^6 colony forming units (cfu)/ml. Fermentationsparameter: Belüftung 0,15 vvm, Umdrehung des Rührers 300/min, Temperatur 29°C, Schaumbekämpfung mit Polypropylenglycol. Nach einer Kulturdauer von 40 Stunden war die stationäre Wachstumsphase erreicht, die Kulturlösung enthielt etwa $5 \cdot 10^7$ cfu/ml. Nach dem Verdünnen mit Leitungswasser stand diese Kulturlösung zur Bekämpfung der phytopathogenen Testpilze der Fusarienwelkeerreger bei Nelke und Gerbera zur Verfügung.

Beispiel 2

Zur Herstellung größerer Mengen von Kulturlösung mit *Streptomyces spec.* G 43 wurde ein 350l-Fermenter verwendet. Die Zusammensetzung des Produktionsmediums (220l) war die gleiche wie in Beispiel 1. Das Medium wurde bei 121°C 30 min sterilisiert und danach mit einer Vorkultur aus einem gerührten Laborfermenter mit diffus verteiltem Mycel beimpft. Die Impfdichte in dem Produktionsmedium lag bei etwa 10^6 cfu/ml.

Fermentationsparameter: Belüftung 0,1 vvm, Umdrehung des Rührers 200/min, Temperatur 29°C, Schaumbekämpfung mit Polypropylenglycol.

Nach einer Kulturdauer von 38 Stunden war in der Kulturlösung eine Myceldichte von etwa $8 \cdot 10^7$ cfu/ml erreicht. Sie wurde abgebaut, mit Leitungswasser 1:10 verdünnt und für einen Großversuch zur Bekämpfung der Fusarienwelke der Nelke eingesetzt.

Beispiel 3

Zur Herstellung einer Applikationslösung mit *Bacillus subtilis* T99 wurde ein 12l-Rührfermenter mit 7l Füllung verwendet. Der Stamm wurde als Schrägagarkultur auf Waksman-Agar (Zusammensetzung s. Beispiel 1), nachdem er 48 Stunden bei 30°C gewachsen war, aufbewahrt.

Mit einer Platinöse wurden die Bakterien auf eine Vorkultur überimpft, die bei 30°C 24 Stunden (in 500ml-Rundkolben mit 100ml Füllung) geschüttelt wurde. Die Vorkultur diente zur Beimpfung des Produktionsmediums des Fermenters. Vorkultur- und Produktionsmedium bestanden aus Glucosenährbouillon folgender Zusammensetzung: Pankreatisches Pepton 22,5g, Glucose 1,0g, K_2HPO_4 2,0g, NaCl 3,0g je Liter Leitungswasser, pH 7,2 $\pm$ 0,2. Sterilisation des Mediums bei 121°C 30 min.

Das Produktionsmedium des Fermenters wurde mit einer Impfdichte von 10^7 Keimen/ml beimpft.

Fermentationsparameter: Belüftung 0,1 vvm, Umdrehung des Rührers 200/min, Temperatur 30°C, Schaumbekämpfung mit Polypropylenglycol. Nach einer Kulturdauer von 28 Stunden befanden sich die Zellen in der stationären Phase, sie waren etwa zu einem Viertel versport. Die Zellzahl lag bei etwa 10^{10} /ml.

Beispiel 4

Zur Herstellung einer Mycel-Sporensuspension von *Streptomyces spec.* G43 wurden Schrägagarkulturen in den Eprouvetten angelegt. Die Beimpfung der Agaroberfläche erfolgte, von Aufbewahrungskulturen ausgehend, mit der Öse, so daß ein einheitlicher Mycelrasen entstand.

Als Schrägagar diente Fleischpeptonagar folgender Zusammensetzung: Bacto-Pepton (Difco) 10g, Hefeextrakt 10g, NaCl 5g, Agar 20g in einem Liter dest. Wasser, pH 7,0 $\pm$ 0,2. Sterilisation 15 min bei 120°C.

Die Bebrütung der Kulturen dauerte 14 Tage bei 29°C. Nach einem weiteren Aufenthalt dieser Kulturen — 1 Woche — im Kühlschrank bei +4°C wurde der Mycelsporenrasen in mehreren Portionen mit insgesamt 100ml Leitungswasser abgeschwemmt. In der Mycel-Sporensuspension waren etwa 10^9 cfu/ml vorhanden.

Beispiel 5

Die Herstellung einer Sporen-Zell-Suspension von *Bacillus subtilis* T99 erfolgte analog zu Beispiel 4. Die Bebrütung der Schrägagarkulturen dauerte 8 Tage bei 30°C. Danach wurde der Oberflächenrasen mit 100ml Leitungswasser abgeschwemmt. In der erhaltenen Suspension waren etwa 10^{10} Keime/ml vorhanden.

Beispiel 6

Zur Bekämpfung der gefäßparasitären Welke der Edelnelke, verursacht durch *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*, wurden Kulturlösungen von jeweils *Streptomyces spec.* G43 mit $5 \cdot 10^7$ cfu/ml und *Bacillus utilis* T99 mit $3 \cdot 10^9$ Keimen/ml verwendet. Die Applikation der 1:10 bzw. 1:100 verdünnten Kulturlösungen erfolgte durch Wurzeltauchung der Nelkenjungpflanzen und durch Inoculation des Erdsubstrates (20ml Kulturlösung je 1kg gebrauchsfertiges Substrat). Vor der Bepflanzung wurden die torfhaltigen Kultursubstrate mit einer Konidiensuspension des phytopathogenen Pilzes *Fusarium oxysporum dianthi* inokuliert. Sie waren die Ausgangssubstrate sowohl für die unbehandelten Kontrollstecklinge (ohne Kontakt mit dem Antagonisten) als auch für die Bekämpfungsversuche mit dem Antagonisten, s. Tab.

Applikation	Anzahl gesunder Pflanzen (in %) 8 Wochen nach Pflanzung	Krankheitsindex Ki (in %) 1 ... 100 (Totalbefall)
Kontrolle	16,6	80,0
Wurzeltauchung		
— Str. spec. G 43	50,0	35,0
— Bac. subtilis T 99	56,5	34,6
Bodenapplikation und Wurzeltauchung		
— Str. spec. G 43	63,6	23,6
— Bac. subtilis T 99	66,7	18,3

Beispiel 7

Die Bekämpfung der gefäßparasitären Erkrankungen bei der Edelnelke und bei der Gerbera, verursacht durch Fusarien, wurde unter praxisüblichen Versuchsbedingungen mit technisch hergestellten Kulturlösungen von *Streptomyces spec.* G43 und *Bacillus subtilis* T99 durchgeführt.

Bei 35000 Jungpflanzen der Edelnelke wurden folgende Applikationsmethoden mit der verdünnten Kulturlösung von *Streptomyces spec.* G43 mit etwa $3 \cdot 10^6$ cfu angewandt:

- Wurzeltauchung der Jungpflanzen (Dauer 15 Minuten)
- Gießen des Substrats vor der Pflanzung mit 2l Kulturlösung/m² und
- Spritzen des Substrates mit 0,5l Kulturlösung/m² vor der Pflanzung

Als Kontrollen dienten 18000 Jungpflanzen mit einer betriebsüblichen fungiziden Behandlung.

In einem weiteren Versuch wurden 1 000 Jungpflanzen von *Gerbera jamesonii* eingesetzt. Die Applikation erfolgte durch Gießen des Bestandes (2 l Kulturlösung/m²) unmittelbar nach der Pflanzung mit Kulturlösungen von *Streptomyces spec. G 43* ($\sim 3 \cdot 10^6$ cfu/ml) und *Bacillus subtilis T 99* ($\sim 10^7$ Keime/ml), s. Tab.

Applikation		Edelnelke kranke Pflanzen (in %)	Gerbera kranke Pflanzen (in %)
Kontrolle (chem. Bekämpfungsmaßnahmen)		5,0	2,4
Wurzeltauchung	— G 43 —	4,8	n. b. *)
Bodenbehandlung			
— Gießen —	— G 43 —	2,6	1,5
	— T 99 —	n. b.	0,9
Bodenbehandlung			
— Spritzen —	— G 43 —	3,4	n. b.

*) n. b. = nicht bestimmt