

Einfluss ausgewählter Fungizide auf Milchsäurebakterien

ANGELA NEUBURGER¹, BARBARA SCHILDBERGER², SYBILLE KRIEGER-WEBER³, WOLFGANG KNEIFEL¹ und KARIN MANDL²

¹ Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und Lebensmitteltechnologie
A-1190 Wien, Muthgasse 18

² Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
E-mail: Karin.Mandl@weinobst.at
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74

³ Lallemand
D-71272 Renningen, Am Alten Sportplatz 4/2

Elf kommerziell erhältliche Fungizide, die vorwiegend für die Abschluss-spritzung im Weinbau gegen Botrytis cinerea eingesetzt werden, wurden mittels Plattendiffusionstests (MRS-Agar) auf ihre toxische Wirkung gegen verschiedene Oenococcus oeni-Stämme untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in hohen Konzentrationen einige im Weinbau eingesetzte Präparate auf jene Bakterien toxisch wirken, die für den biologischen Säureabbau eingesetzt werden. Besonders starke Hemmwirkungen wurden bei den fungiziden Wirkstoffen Cymoxanil/Dithianon, Pyrimethanil und Cyprodinil/Fludioxonil beobachtet. Die Wirkstoffe Cymoxanil/Dithianon verhielten in einer Wirkstoffkonzentration von 1000 mg/l das Wachstum aller, Pyrimethanil und Cyprodinil/Fludioxonil das Wachstum von vier der zehn eingesetzten Bakterienkulturen.

Schlagwörter: Fungizide, Botryticide, Toxizität, biologischer Säureabbau, *Oenococcus*

Influence of selected fungicides on malolactic bacteria. Eleven commercially available fungicides mainly used for the last application against Botrytis cinerea in viticulture, were tested for their toxic effect against different strains of Oenococcus oeni, using a disk diffusion assay on MRS-agar. Results demonstrated negative effects of several fungicides on bacterial strains used in malolactic fermentation of wine. All active ingredients displayed growth inhibition of certain Oenococcus oeni strains when applied at a concentration of 1000 ppm. Particularly pronounced inhibition was observed with the fungicides dithianon/cymoxanil, pyrimethanil and cyprodinil/fludioxonil. A combination of dithianon and cymoxanil yielded highest inhibitory effects on all applied strains tested, the active components dithianon and cyprodinil/fludioxonil led to growth inhibition of four out of ten bacterial cultures.

Keywords: fungicides, botryticides, toxicity, malolactic fermentation, *Oenococcus*

L'influence de fongicides sélectionnés sur les bactéries lactiques. Onze fongicides en vente dans le commerce, essentiellement utilisés dans la viticulture pour la pulvérisation finale contre Botrytis cinerea, ont été examinés au moyen du test de diffusion sur disques (agar MRS) en vue de connaître leur effet toxique sur différentes souches d'Oenococcus oeni. Les résultats ont montré que, dans des concentrations élevées, quelques préparations utilisées dans la viticulture ont un effet toxique sur les bactéries utilisées pour la fermentation malo-lactique. Des effets inhibiteurs particulièrement marqués ont été observés pour les matières actives cymoxanile/dithianone, pyriméthanil et cyprodinile/fludioxonile. Dans une concentration de 1000 mg/l, les matières actives cymoxanile/dithianone ont empêché la croissance de la totalité des dix cultures bactériennes utilisées, le pyriméthanil et le cyprodinile/fludioxonile de quatre d'entre eux.

Mots clés : fongicide, botryticide, toxicité, fermentation malo-lactique, *Oenococcus*

Der biologische Säureabbau (BSA) zählt heute zu den Standardverfahren der Weinherstellung. Die Decarboxylierung der Äpfelsäure zur weniger sauren Milchsäure durch Milchsäurebakterien wird hauptsächlich im Rotwein angewendet, aber auch bei verschiedenen Weißweinen gewinnt der BSA zunehmend an Bedeutung. Durch den gezielten Einsatz von Starterkulturen der Gattungen *Oenococcus*, *Lactobacillus* und *Pediococcus* wird eine Verringerung des Gesamtsäuregehalts angestrebt, die gleichzeitig auch zu einer Erhöhung des pH-Werts und zu einer Abnahme des sensorischen Säureindrucks führt. Durch die Summe der ablaufenden stofflichen Umwandlungen wird das gesamte Geruchs- und Geschmacksprofil des Weines verändert. Zusätzlich erfolgt eine biologische Stabilisierung des Weines, die eine nachträgliche Trübung beziehungsweise Kohlendioxidbildung durch Milchsäurebakterien in den bereits gefüllten Flaschen verhindert (DAVIS et al., 1985; DAVIS et al., 1988).

Trotz langjähriger Erfahrung mit dem Einsatz von bakteriellen Starterkulturen kommt es immer wieder zu Problemen im Verlauf des biologischen Säureabbaus, wengleich die Spezies *Oenococcus oeni* als besonders ethanol- und säureresistent gilt (DICKS et al., 1995). Letztendlich kann das Wachstums substrat Wein beziehungsweise Traubensaft aber immer nur als Stressmedium für diese Mikroorganismen betrachtet werden. Starken Einfluss auf das Wachstum beziehungsweise die Abbaurate der Äpfelsäure nehmen im Wein die Faktoren Nährstoffgehalt, pH-Wert, SO₂-Gehalt, Temperatur und Alkoholgehalt ein. Studien zeigten, dass im Wein vorhandene kurzkettige beziehungsweise freie Fettsäuren oder auch Bakteriozine negative Auswirkungen auf den biologischen Säureabbau durch *O. oeni* haben können (CAPUCHO und SAN ROMÃO, 1994; CARRETÉ et al., 2006; NEL et al., 2002; VAN REENEN et al., 1998; GREEN et al., 1997; DAESCHEL et al., 1991; BAUER et al., 2003).

Auch Rückstände von Pflanzenschutzmitteln stehen im Verdacht, Gärstockungen beziehungsweise Verzögerungen beim biologischen Säureabbau im Wein zu verursachen. Vor allem bei Fungiziden ist dieser Verdacht besonders nahe liegend. Strenge gesetzlich geregelte Bestimmungen sehen vor der Zulassung der Pestizide detaillierte Untersuchungsergebnisse vor, die eine Beeinträchtigung der erwünschten Mikroflora ausschließen. Dennoch können schlechte Rahmenbedingungen die Sensibilität von Mikroorganismen auf die verwendeten Wirkstoffe deutlich erhöhen. Studien über mögliche Rückstände von mikrobiziden Wirk-

stoffen in Mosten und Weinen sowie deren Verringerung oder Abbau im Zuge der Weinverarbeitung wurden unter anderem von NAVARRO et al. (1999) durchgeführt. Verschiedenste Untersuchungen gibt es auch über mögliche Auswirkungen von Rückständen auf den Verlauf der alkoholischen Gärung und des biologischen Säureabbaus (HAAG et al., 1988; CABRAS et al., 1994; SALA et al., 1996).

Durch die in dieser Studie verwendete Methode des Plattendiffusionstests wurde die grundsätzliche Fähigkeit unterschiedlicher Fungizide, Milchsäurebakterien zu hemmen, untersucht. Betrachtet wurden hierbei ausschließlich Pflanzenschutzmittel, die mit Abschluss spritzungen häufig auf Reben aufgebracht werden.

Material und Methoden

Mikroorganismen

Die verwendeten Kulturen der Milchsäurebakterien wurden von der Firma Lallemand (Renningen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Bei allen zehn Stämmen handelte es sich um Vertreter der Spezies *Oenococcus oeni*, die teilweise bereits kommerziell erhältlich sind oder sich noch in der Überprüfungsphase hinsichtlich ihrer Eignung für eine praktische Anwendung zum biologischen Säureabbau im Wein befinden.

Fungizide

In Tabelle 1 sind die verwendeten Fungizide mit den jeweiligen Wirkstoffen, empfohlenen Wartefristen und Aufwandmengen angeführt. Es wurden ausschließlich in Österreich erhältliche Pflanzenschutzmittel verwendet, die für den Weinbau zugelassen sind. Die zugehörigen Daten wurden dem Pflanzenschutzmittelregister des österreichischen Bundesamtes (AGES, 2007) für Ernährungssicherheit entnommen.

Nährmedium

Saures MRS-Medium (Lallemand)

20 g Glucose; 10 g Pepton aus Casein (tryptisch verdaut); 8 g Fleischextrakt; 5 g Fructose; 4 g Malat; 4 g Hefeextrakt; 2 g K₂HPO₄; 2 g Diammoniumcitrat; 1 ml Tween 80; 0,2 g MgSO₄ x 7H₂O; 50 mg MnSO₄ x 4H₂O; mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und auf pH-Wert 5,0 (± 0,1) einstellen. Die Angaben beziehen sich auf Flüssigmedium, im Fall von festem Medium wurden 2 % Agar-Agar zugesetzt (ATLAS, 2004).

Tab. 1: Fungizide und Details ihrer Anwendung (AGES, 2007)

Wirkstoffe	Wirkstoffmenge	Schadfaktoren	Wartezeit	Konzentration (%)
Dithianon / Cymoxanil	250 g/kg 100 g/kg	Peronospora, Roter Brenner, Botrytis	42 Tage	0,1 - 0,125
Boscalid	500 g/kg			
Kupferhydroxid	460,6 g/l *	Botrytis	28 Tage	0,075
Tolyfluanid	505 g/kg	Peronospora	35 Tage	0,10
Mepanipyrim	500 g/kg	Peronospora, Botrytis	35 Tage	0,15
Cymoxanil / Kupferhydroxid	27 g/kg 500 g/kg	Botrytis	21 Tage	0,12
Folpet	451,4 g/l	Peronospora, Roter Brenner	28 Tage	0,50
Pyrimethanil	400 g/l	Peronospora, Roter Brenner, Botrytis	7 Tage	0,30
Cyprodinil / Fludioxonil	375 g/kg 250 g/kg	Botrytis	28 Tage	0,125
Fenhexamid	510 g/l	Botrytis	35 Tage	0,10
Schwefel	800 g/kg	Botrytis	21 Tage	0,16
		Kräusel- und Pockenmilbe	28 Tage	0,2 - 0,5

*Anteil Cu: 300 g/l **Anteil Cu: 290 g/kg

Plattendiffusionstest

Für den Versuch wurden Über-Nacht-Kulturen der verschiedenen Milchsäurebakterienstämme in saurer MRS-Bouillon (28 bis 30 °C) hergestellt, und am nächsten Tag wurden MRS-Agarplatten mit ca. 10⁶ KBE je Platte (photometrische Überprüfung) beimpft. Von den in Tabelle 1 angeführten Wirkstoffen wurden Stammlösungen zu jeweils 1000 mg/l Gesamtwirkstoffkonzentration in destilliertem, keimfreiem Wasser hergestellt und auf 100 bzw. 10 mg/l verdünnt. Jeweils drei sterile Antibiotika-Plättchen (13 mm Durchmesser) wurden in die Pestizidlösungen mit den Konzentrationen 1000, 100 und 10 mg/l eingetaucht und auf die inokulierte Platte gelegt. Es wurde eine Doppelbe-

stimmung durchgeführt. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank sieben Tage bei 28 bis 30 °C anaerob (im Exsikkator, unter Verwendung von Anaerocult[®] A-Kits; Merck) inkubiert und anschließend anhand der Bildung von Hemmhöfen ausgewertet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Fungizidtests sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei der Auswertung wurden Proben mit deutlich erkennbaren Hemmhöfen bei mehreren Konzentrationen als „positiv“ gewertet. Leicht verringertes Wachstum der Bakterien im Umkreis des Plättchens mit der höchsten Wirkstoffkonzentration wurde als

Tab. 2: Ergebnisse der Plattendiffusionstests mit verschiedenen *Oenococcus oeni*-Stämmen (+++ : starke Hemmwirkung ausgeprägter Hemmhof; + : schwacher Hemmhof bei höchster Konzentration; leeres Feld: keine Reaktion sichtbar ungehemmtes Wachstum)

Fungizid	R1054	R1098	R1101	R1105	R1106	R1108	R1118	R1120	R1123	R1124
Dithianon/ Cymoxanil	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Boscalid		+	+			+	+++	+++	+	+
Kupferhydroxid								+++	+++	
Tolyfluanid						+++		+++	+	+
Mepanipyrim	+	+				+	+	+		+
Cymoxanil/ Kupferhydroxid									+++	+
Folpet	+++								+++	
Pyrimethanil	+++	+		+++	+	+	+++	+++	+	+
Cyprodinil/ Fludioxonil							+++	+++	+++	+++
Fenhexamid							+	+++		
Schwefel		+						+++	+	

„teilweise positiv“ gewertet. War keinerlei Veränderung um die Plättchen erkennbar, wurde die Probe als „negativ“ gewertet. Besonders wirksam gegen die verwendeten *Oenococcus oeni*-Stämme waren die Wirkstoffe Cymoxanil/Dithianon, die bei allen Versuchen gut sichtbare Hemmhöfe verursachten. Die Wirkstoffe Pyrimethanil und Fludioxonil/Cyprodinil zeigten in Kombination mit jeweils vier unterschiedlichen Bakterienstämmen starke bakterizide Wirkung. Die restlichen Fungizide verursachten lediglich bei einem oder zwei Teststämmen eine starke Hemmhöfbildung. Mepanipyrim war der einzige getestete Wirkstoff, bei dem keine deutliche Inhibition sichtbar war.

Diskussion

Die Ergebnisse des Plattendiffusionstests zeigten, dass fast alle verwendeten Pflanzenschutzmittel eine bakteriostatische bis bakterizide Wirkung haben, wenn sie in ausreichend hoher Konzentration zum Einsatz kommen. Zu beachten ist hierbei aber, dass die Tests auf einem für die Teststämmen optimalen Medium durchgeführt wurden und die Bedingungen somit nicht den Bedingungen im weniger idealen Medium Wein entsprechen. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 1000 mg/l zeigten besonders die Wirkstoffe Cymoxanil/Dithianon, Pyrimethanil und Cyprodinil/Fludioxonil beträchtliche Hemmwirkung auf die verschiedenen *Oenococcus oeni*-Stämme. In Anbetracht dieser Ergebnisse muss aber erwähnt werden, dass in den Trauben bzw. im Traubenmost solche hohen Konzentrationen an Pestizidrückständen nicht erlaubt und auch nicht gefunden werden. CABRAS et al. (1997) zeigten in ihrer Studie das unterschiedliche Abbauverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Trauben und Wein auf. Rückstandskonzentrationen, die deutlich über den gesetzlich erlaubten Grenzwerten lagen, wurden dabei jedoch kaum beschrieben.

Andererseits sollte aber auch beachtet werden, dass die Milchsäurebakterien mit dem in diesem Experiment verwendeten MRS-Agar ein Vollmedium zur Verfügung hatten, dessen Eigenschaften stark vom Substrat Wein abweichen. So besteht die Möglichkeit, dass ein Zusammenspiel von diversen Störfaktoren wie Nährstoffknappheit oder ein besonders niedriger pH-Wert im Wein die hemmende Wirkung von Fungizidrückständen auf die Aktivität von Milchsäurebakterien durchaus noch verstärkt. Diese möglichen Wechselwirkungen sollten in weiteren Studien untersucht werden.

Auffällig bei diesem Experiment war die unterschiedliche Sensitivität der eingesetzten *Oenococcus oeni*-Stämme. Einige Stämme wurden von fast allen Fungiziden stark gehemmt, bei anderen konnten kaum negative Reaktionen festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass durch eine gezielte Auswahl der eingesetzten Kulturen mögliche Probleme im Zuge des biologischen Säureabbaus umgangen werden können. Durch die Selektion von besonders unempfindlichen BSA-Starterkulturen versucht die Weinindustrie auch in diesem Zusammenhang problematischen Weinen einen zügigen und vollständigen Säureabbau zu sichern.

Literatur

- AGES (2007): Pflanzenschutzmittelregister. - Wien: Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Juni 2007
- ATLAS, R.M. (2004): Handbook of microbiological media. 3rd Ed. - Boca Raton: CRC Press, 2004
- BAUER, R., NEL, H.A. and DICKS, L.M.T. 2003: Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. Am. J. Enol. Vitic. 54(2): 86-91
- CABRAS, P., MELONI, M., MELIS, M., FARRIS, A., BUDRONI, M. and SATTÀ, T. 1994: Interactions between lactic acid bacteria and fungicides during lactic fermentation. J. Wine Res. (5): 53-59
- CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., MELIS, M., PIRISI, F.M., MINELLI, E.V., CABITZA, F. and CUBEDDU, M. 1997: Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil and tebuconazole) from vine to wine. J. Agric. Food Chem. 45: 2708-2710
- CAPUCHO, I. and SAN ROMÃO, M.V. 1994: Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Oenococcus oeni*. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 391-395
- CARRÉTÉ, R., REGUANT, C., ROZÉS, N., CONSTANTÍ, M. and BORDONS, A. 2006: Analysis of *Oenococcus oeni* strains in simulated microvinifications with some stress compounds. Am. J. Enol. Vitic. 57(3): 356-362
- DAESCHEL, M.A., JUNG, D.-S. and WATSON, B.T. 1991: Controlling wine malolactic fermentation with Nisin and Nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. 57(2): 601-603
- DAVIS, C.R., WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., LEE, T.H. and FLEET, G.H. 1985: Practical implications of malolactic fermentation: A review. Am. J. Enol. Vitic. 36: 290-301
- DAVIS, C.R., WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., LEE, T.H. and FLEET, G.H. 1988: Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. Am. J. Enol. Vitic. 39: 137-142
- DICKS, L.M.T., DELLAGLIO, F. and COLLINS, M.D. 1995: Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 395-397
- GREEN, G., DICKS, L.M.T., BRUGGEMAN, G., VANDAMME, E.J. and CHIKINDAS, M.L. 1997: Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J. Appl. Microbiol. 83: 127-132
- HAAG, V.B., KRIEGER, S. und HAMMES, W.P. 1988: Hemmung der Starterkulturen zur Einleitung des biologischen Säureabbaus durch Spritzmittelrückstände im Wein. Wein-Wiss. 43: 261-278

- NAVARRO, S., BARBA, A., OLIVA, J., NAVARRO, G. and PARDO, F. 1999: Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. *J. Agric. Food Chem.* 47: 264-270
- NEL, H.A., BAUER, R., WOLFAARDT, G.M. and DICKS, L.M.T. 2002: Effect of bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53(3): 191-196
- SALA, C., FORT, F., BUSTO, O., ZAMORA, F., AROLA, L. and GUASCH, J. 1996: Fate of some common pesticides during vinification process. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3668-3671
- VAN REENEN, C.A., DICKS, L.M.T. and CHIKINDAS, M.L. 1998: Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1131-1137

Manuskript eingelangt am 8. Jänner 2008