

Einfluss ausgewählter fungizider Wirkstoffe auf das Wachstum von Hefen

BARBARA SCHILDBERGER, RUDOLPH RÜTTGER und KARIN MANDL

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-mail: Barbara.Schildberger@hblawo.bmlfuw.gv.at

*Der Einfluss von fünf fungiziden Wirkstoffen (Pyrimethanil, Folpet, Fenhexamid, Boscalid und Kupfer) auf das Wachstum verschiedener Hefen wurde untersucht. Es kam zu einer Simulation der Applikation von Pflanzenschutzmitteln und des Verhaltens von Hefen auf Beeren, indem die Hefen auf Nährmedium wuchsen und der Wirkstoff aufgesprüht wurde. Von allen getesteten Mitteln verursachte Folpet die stärkste Wachstumsverminderung bei den Hefen, wobei aber die Gärhefe *Saccharomyces cerevisiae* nur wenig beeinflusst wurde. Bei sehr hohen Konzentrationen, die weit über der gesetzlich zugelassenen Höchstmenge lagen, wirkte sich neben Folpet auch noch Kupfer sehr negativ auf das Wachstum aus. Es konnte beobachtet werden, dass der Einsatz von Fungiziden die Zusammensetzung der Hefeflora beeinflusst. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass es bei einem Reinzuchtheferzusatz im Most üblicherweise keine Gärprobleme durch die hier getesteten Wirkstoffe geben sollte.*

Schlagwörter: Gärprobleme, Fungizid, *Saccharomyces cerevisiae*, Wachstum, Hefetoxizität

*Influence of selected fungicidal active agents on yeast growth. The influence of five fungicidal active agents (Pyrimethanil, Folpet, Fenhexamid, Boscalid and copper) on the growth of different yeasts was examined. The application of plant protection agents and the behaviour of yeasts on berries were simulated, as the yeasts were grown on growth medium and then sprayed with the active agents. From all tested agents Folpet caused the strongest growth reduction with the yeasts, the fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae*, however, was affected only a little. With very high concentrations, far above legally specified maximum amounts, besides Folpet also copper affected yeast growth very negatively. It could be observed that the use of fungicides affects the composition of the yeast flora. The results show that there should be no fermenting problems with selected dry yeasts when these tested active agents are used.*

Key words: fermenting problems, fungicide, *Saccharomyces cerevisiae*, growth, yeast toxicity

*L'influence de substances actives fongicides sur la croissance des levures. L'influence de cinq substances actives fongicides (pyriméthanil, folpet, fenhexamide, boscalide et cuivre) sur la croissance de différentes levures a été examinée. L'application de produits phytosanitaires et le comportement des levures sur baies ont été simulés en vaporisant la substance active sur les levures poussant sur un substrat nutritif. Parmi toutes les substances testées, le folpet a provoqué la baisse la plus forte de la croissance des levures; cependant, les levures de fermentation *Saccharomyces cerevisiae* n'ont été influencées que faiblement. Dans les concentrations très élevées qui se situaient largement au-dessus de la quantité maximale admise par la loi, le cuivre - à côté du folpet - a également eu un effet très négatif sur la croissance. On a pu observer que l'utilisation de fongicides exerce une influence sur la composition de la flore levurienne. Les résultats font apparaître que les substances actives ici testées ne devraient normalement pas provoquer des problèmes de fermentation lors d'un ajout de levures sélectionnées.*

Mots clés : problèmes de fermentation, fongicide, *Saccharomyces cerevisiae*, croissance, toxicité pour les levures

Durch die besonders hohen Fungizidaufwandmengen, kam es vermehrt zu Gärschwierigkeiten, die bereits zu jener Zeit mittels Gärversuchen untersucht wurden, die in den 50-er bis 70-er Jahren ausgebracht wurden,

(LEMPERLE et al., 1969). So hatte LEMPERLE (1989a) das Vorhandensein von Fungizidrückständen nachgewiesen. Dabei wurden 50% der Fungizidrückstände im Most gefunden, die restlichen 50% mit den Traubenschalen verworfen. Durch Vorklärung konnten aus dem Most wiederum 80% der Wirkstoffe entfernt werden. Von VIVIANI-NAUER et al. (1997) wurden Fungizid-Wirkstoffe wie Phtalimid-Derivat, Folpet (N-(Trichloromethylthio)phtalimid) sowie die Schwermetall-Verbindung Kupferoxychlorid im Hinblick auf Auswirkungen auf die alkoholische Gärung beobachtet.

Dabei stellte sich heraus, dass der Wirkstoff Folpet eine generelle Gärverzögerung um ein bis fünf Tage verursacht. Außerdem wurde bei einem Folpet-Gehalt ab 4,56 mg/l im Most eine Gärnfähigkeit festgestellt. Folpet zerfällt sehr zügig in Phtalimid-Verbindungen, Kohlendioxid, Kohlenwasserstoffsäure und Schwefel, wobei dieser Vorgang von verschiedenen Faktoren, beispielsweise dem pH-Wert, abhängt (LEMPERLE, 1989b). Bei einem alkalischen pH-Wert in einer Glucoselösung war Folpet bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Hingegen wurden bei saurem pH-Wert noch 57% der ursprünglichen Folpet-Konzentrationen gefunden (LEMPERLE, 1989b).

Auch für Kupfer ist dessen hefehemmende Wirkung beschrieben, da bei Mosten, die 14 Tage vor der Lese mit Kupfer gespritzt wurden, eine Gärstockung festgestellt wurde (TROMP und DE KLERK, 1988). Durch einen Reinzuchthehezusatz von 5 bis 10 g/hl zum vorgeklärten Most konnten Gärstörungen jedoch kompensiert

werden (LEMPERLE, 1989b). Auch bei den Wirkstoffen Captafol, Captan und Dichlofluanid wurden Gärstörungen festgestellt (LEMPERLE, 1989b), wobei jedoch nur noch Captan eine Zulassung im österreichischen Weinbau hat, aber nicht in der Integrierten Produktion zugelassen ist.

Ebenfalls wurde in Versuchen bestätigt, dass durch einen Fungizideinsatz, vor allem in einem reifen Stadium der Trauben, die Hefepopulation stark dezimiert wird (MINARIK und RAGALA, 1969).

Im Zuge der aktuellen Diskussion über die Typizität eines Weinbaugesbietes wird auch argumentiert, dass durch den Zusatz von Reinzuchthefe die Typizität verloren geht und die Weine keinen eigenen Charakter mehr haben. Aus diesen Gründen geht man in manchen Gebieten in den letzten Jahren teilweise wieder zurück zur Spontangärung. Infolgedessen wird die Problematik von Fungizidrückständen und deren Auswirkung auf die Hefepopulation und den Gärverlauf wieder thematisiert und soll daher in dieser Arbeit untersucht werden.

Material und Methoden

Hefen

Kriterium für die Auswahl der Hefen war ihr natürliches Vorkommen im unbehandelten Most. Die Hefestämme wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig) und der Universität für Bodenkultur Wien bezogen (Tab.1).

Die Hefen wurden im Spatelverfahren auf Platten aus Malzextrakt aufgebracht, anschließend wurden die Wirkstoffe mit einer Sprühflasche appliziert. Es wurde 1,4 ml verdünnter Wirkstoff pro Platte aufgetragen. Die bestrichenen und besprühten Platten wurden zwei Tage im Brutschrank bei 28 °C bebrütet.

Wirkstoffe

Es wurden ausschließlich fungizide Wirkstoffe ausgewählt, deren Anwendung im Weinbau kurz vor der Ernte möglich ist, und zwar Pyrimethanil (1), Folpet (2), Fenhexamid (3), Boscalid (4) und Kupfer (5).

Es wurden 20 verschiedene Hefestämme und fünf verschiedene Wirkstoffe zu je sieben Konzentrationen mit einmaliger Wiederholung verwendet.

Die Untersuchung der Hefetoxizität wurde nach dem Spatelverfahren vollzogen.

Die in den Mitteln vorhandenen Wirkstoffmengen wur-

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Hefestämme

DSM-Nr.	Name
5784	<i>Candida parapsilosis</i>
1334	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6425	<i>Candida glabrata</i>
70090	<i>Pichia fermentans</i>
70184	<i>Candida vini</i>
70244	<i>Debaryomyces hansenii</i>
70255	<i>Pichia anomala</i>
70274	<i>Pichia minuta</i>
70321	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
70398	<i>Rhodotorula glutinis</i>
70483	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
70492	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
70506	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>
70535	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
70550	<i>Sacharomyces ludwigii</i>
70576	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
70732	<i>Dekkera anomala</i>
70788	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
70789	<i>Hanseniaspora osmophila</i>
HA 158	<i>Candida nemodendra</i>

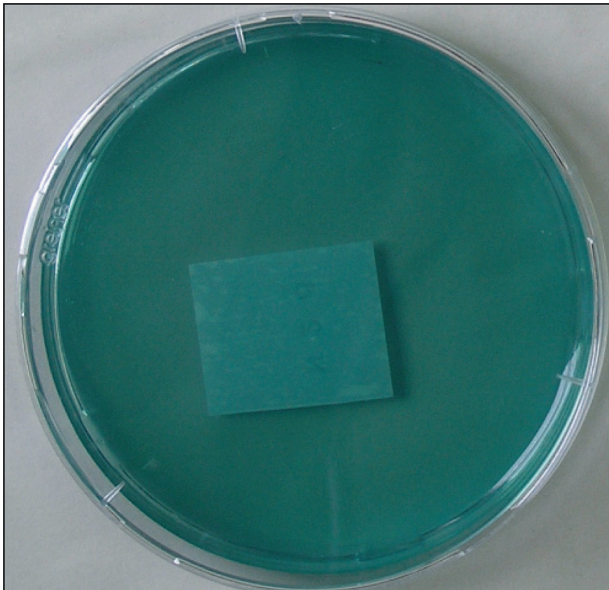


Abb. 1: Nullwachstum bei *Zygosaccharomyces rouxii*



Abb. 2: Starkes Wachstum bei *Candida glabrata*

den mit destilliertem Wasser auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die Konzentration des jeweiligen Wirkstoffes orientierte sich an den in Österreich zugelassenen Höchstmengen von Wirkstoffen im Most. So ergaben sich sieben verschiedene Konzentrationen für jeden Wirkstoff, wobei die geringste mit „Konzentration a“, die höchste mit „Konzentration g“ bezeichnet wurde, „c“ stellte die zugelassene Höchstmenge dar.

Es wurde in 10er-Potenzen verdünnt, somit war „a“ eine 1% ige Verdünnung, „b“ eine 10%ige Verdünnung, „d“ eine zehnfache Konzentration der zugelassenen Höchstmenge.

Bewertung der Hefen

Die Bewertung der Platten erfolgte visuell. Es wurde ein Punkteschema angewandt, welches „0 Punkte“ für ein mit dem bloßen Auge nicht sichtbares Wachstum (Abb. 1) vorsah und die maximale Punktezahl „4“ für ein starkes Wachstum (Abb. 2). Die Werte „1“, „2“, „3“ lagen zwischen den Bewertungen.

Ergebnisse

Beispielgebend für andere Hefen wird die Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen von Folpet (Abb. 3) und von Fenhexamid (Abb. 4) auf die Hefe *Zygosaccharomyces bailii* dargestellt. Es ist erkennbar, dass geringe Konzentrationen von Folpet das Wachstum von *Zygosaccharomyces bailii* stark verringern, während beim Wirkstoff Fenhexamid keine Hemmung auftritt. Bei höheren Konzentrationen (e, f und g) findet beim Wirkstoff Folpet kein Wachstum mehr statt, bei Fenhexamid schwankt dieses Wachstum zwischen schwachem und sehr schwachem Wachstum.

Die in Abbildung 5 gezeigten Werte drücken das durchschnittliche Wachstum aller im Versuch eingesetzten Hefen (Tab. 1) bei allen Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffes aus.

Folpet zeigt dabei die stärkste Wachstumsunterdrückung, sie liegt deutlich unter dem Wert der mit anderen Wirkstoffen applizierten Hefen. Das durchschnittliche Bewertung

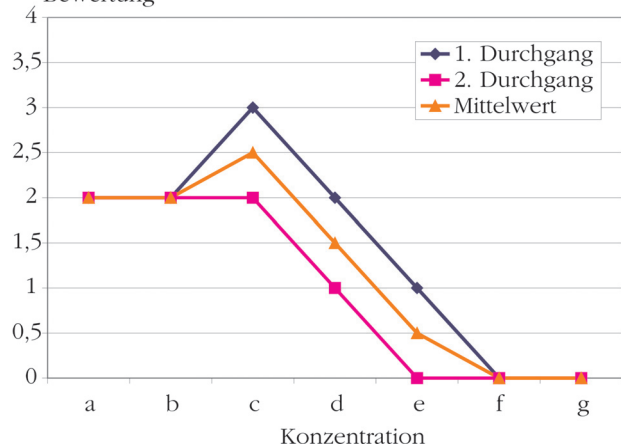


Abb. 3: Bewertung des Wirkstoffes Folpet bei *Zygosaccharomyces bailii*

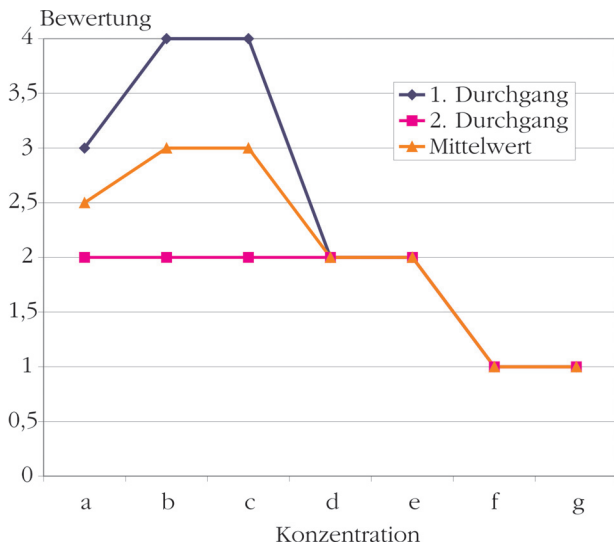


Abb. 4: Bewertung des Wirkstoffes Fenhexamid bei *Zygoclocharomyces bailii*

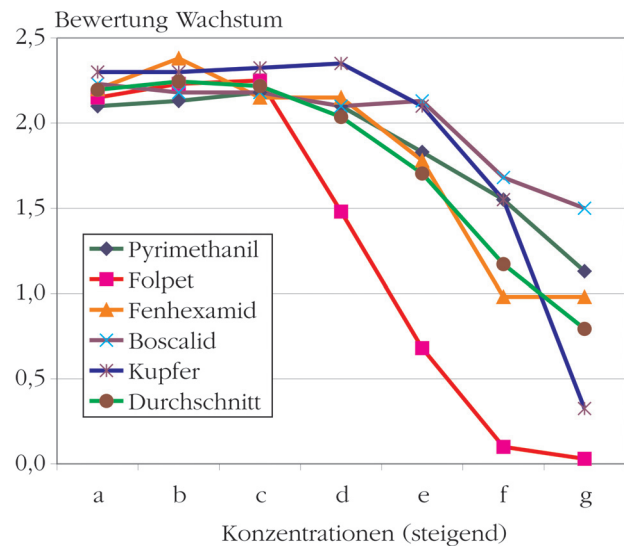


Abb. 6: Bewertung der Wirkstoffe bei verschiedenen Konzentrationen

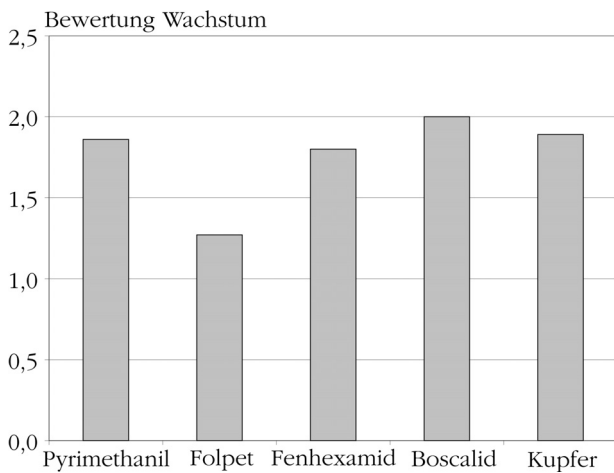


Abb. 5: Bewertung der Wirkstoffe anhand des durchschnittlichen Wachstums aller Hefen bei allen getesteten Konzentrationen

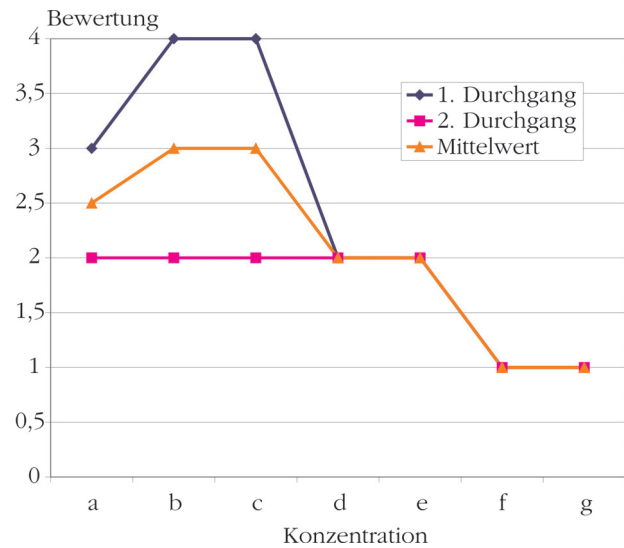


Abb. 7: Vergleich des Wachstums der einzelnen Hefen in Folge Fungizidanwendung

Wachstum der mit Folpet besprühten Hefen beträgt somit 63,5% des Wachstums der Boscalid-behandelten Hefen.

In Abbildung 6 ist das Hefewachstum bei den jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen dargestellt, wobei die getesteten Wirkstoffe sowie ein Durchschnittswert angegeben sind. Bei den drei geringsten Konzentrationsstufen „a bis c“ sind kaum Veränderungen im Wachstum zu beobachten, das Wachstum bewegt sich konstant zwischen den Werten 2,1 und 2,4. Ab Konzentrationsstufe „d“ ist bei jedem Wirkstoff ein stetiger

Wachstumsabfall gegeben, die Ausnahme bildet Kupfer. Eine sehr rapide Wachstumsverringerung ist bei Folpet (ab Konzentrationsstufe „d“) und Kupfer (ab Konzentrationsstufe „f“) ersichtlich. Lediglich der Wirkstoff Folpet fällt bei mehr als einer Konzentration, nämlich bei den Konzentrationsstufen „d bis g“ unter den durchschnittlichen Wert. Kupfer und Fenhexamid unterbieten das durchschnittliche Wachstum jeweils einmal.

In Abbildung 7 wird das Wachstum von neun Hefen,

gemessen als Durchschnitt bei jedem der fünf Wirkstoffe und bei jeder Konzentration, abgebildet. Die elf nicht dargestellten Hefen haben nur eine geringe Abweichung (maximal 0,38 Punkte) vom Durchschnitt. Der gelbe Balken zeigt das durchschnittliche Gesamtwachstum, das alle Hefen, jeden Wirkstoff und jede Konzentration beinhaltet. Die rot dargestellten Balken gehören zu denjenigen Hefen, die dieses durchschnittliche Gesamtwachstum unterschritten haben und daher überdurchschnittlich stark gehemmt wurden, während die blauen Balken für Hefen verwendet wurden, die ein höheres Wachstum aufwiesen und daher unterdurchschnittlich gehemmt wurden. Besonders hohe negative Abweichungen, daher hohe Sensitivität gegenüber den Wirkstoffen, sind bei den Hefen *Candida vini* (Wachstum 1,06), *Dekkera anomala* (Wachstum 1,09), *Zygosaccharomyces rouxii* (Wachstum 1,36) sowie *Hanseniaspora osmophila* (Wachstum 1,40) zu erkennen.

Positive Abweichungen vom Gesamtdurchschnitt, also mehr Wachstum und geringere Empfindlichkeit als der Gesamtdurchschnitt, zeigen besonders die Hefen *Candida parapsilosis* (Wachstum 3,14), *Debaryomyces hansenii* (Wachstum 2,74), *Pichia anomala* (Wachstum 2,69), *Pichia fermentans* (Wachstum 2,60), und *Candida glabrata* (Wachstum 2,54).

Diskussion

Der Vorteil des Spatelverfahrens (Plattenverfahrens) gegenüber Gärversuchen mit Most ist eine bessere Vergleichsmöglichkeit, da anders als bei der Mikrovinifikation keine weiteren Bestandteile des Mostes auf die Ergebnisse Einfluss nehmen können. Auch konnte durch dieses Verfahren das Wachstum der Hefen auf den Beeren nach der Pflanzenschutzmittelapplikation simuliert werden.

Hefen

Bei der Bewertung der wachstumshemmenden Wirkung der Fungizide auf unterschiedliche Hefen wurde herausgefunden, dass die im Weinbau gewünschte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur gering beeinflusst wird. Ein überdurchschnittlich negativer Effekt auf das Wachstum war bei den Hefestämmen *Candida vini*, *Dekkera anomala*, *Zygosaccharomyces rouxii* sowie *Hanseniaspora osmophila* zu erkennen. Der Stamm *Candida vini* ist die auf Beeren und im Most am häufigsten vorkommende Kahmhefe. Sie ist nur eingeschränkt gärfähig und für die Weinbereitung nicht erwünscht,

daher ist ihre Unterdrückung durch die Wirkstoffe von Vorteil (DITTRICH et al., 2005). Auch bei der Hefegattung *Dekkera anomala* bewirkten die Fungizide ein schwächeres Wachstum. Die ebenfalls durch Fungizide gehemmte Hefe *Hanseniaspora osmophila* gehört zu den Apiculatus-Hefen, und ihr Vorkommen ist, neben den Essigsäurebakterien, eine der Hauptursachen für Essigstich im Wein, aber auch verantwortlich für fruchtige Nebengärprodukte (DITTRICH et al., 2005). Die fünf Hefearten (*Pichia anomala*, *Pichia fermentans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* und *Debaryomyces hansenii*), die als Reaktion auf die Fungizidanwendung ein überdurchschnittliches Wachstum aufwiesen, gehörten ebenso zu den ungewollten kahmbildenden Hefen (DITTRICH et al., 2005).

Wirkstoffe

Durch Folpet wurde das Wachstum der Hefen am stärksten vermindert, dieses Ergebnis wird auch von LEMPERLE und KERNER (1969) bestätigt. Der Wirkstoff Boscalid zeigte die geringste wachstumshemmende Wirkung, diese hohe Bewertung unterscheidet sich aber nicht signifikant von den Bewertungen für die Wirkstoffe Pyrimethanil, Fenhexamid und Kupferhydroxid. Eine bemerkenswerte Beobachtung war, dass die Wirkstoffe bis zur Konzentration „c“, das die gesetzlich erlaubte Höchstmenge an Rückständen bei der Ernte darstellt, das Wachstum der Hefen kaum beeinflussten. Ab Konzentrationsstufe „d“ (zehnfache Höchstkonzentration) zeigte sich bei Folpet ein starker Rückgang des Hefewachstums. In der Praxis besitzt die applizierte Spritzbrühe eine Wirkstoffkonzentration von 1500 ppm Folpet, in diesem Versuch weist die Konzentration „d“ mit 100 ppm bereits eine Hefetoxizität auf. Wie bereits oben beschrieben, war die Wirkung von Kupfer nicht signifikant verschieden zu den drei anderen Wirkstoffen, aber bei der höchsten Konzentrationsstufe bewirkte Kupfer eine starke Verringerung des Hefewachstums. Für die Ausbringung in der Praxis hat dies aber keine Relevanz, da die applizierte Wirkstoffkonzentration bei Kupferhydroxid etwa 460 ppm beträgt und zwischen den Konzentrationen „d“ und „e“ liegt, bei welchen keine große Hemmung festgestellt wurde.

Bei der Betrachtung der einzelnen Konzentrationen fällt auf, dass die Rückstandsmenge Einfluss auf das weitere Wachstum der Hefen hat, es gibt bei jedem Wirkstoff einen negativen Einfluss auf das Wachstum mit größer werdender Konzentration. Darum ist das Einhalten der Wartezeiten unumgänglich.

Da jedoch die Konzentration bei der Applikation auf die Trauben die gesetzliche Höchstmenge, die ja nur für den Zeitpunkt der Ernte gilt, möglicherweise überschreitet, lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Die Hefeflora auf den Beeren wird durch die getesteten fungiziden Wirkstoffe beeinflusst und die Gesamthezezellzahl dezimiert. Wird jedoch die

vorgeschriebene Karenzzeit bei der Spritzung eingehalten, so ist zumindest keine Hefetoxizität im Most, wohl aber auf den Beeren gegeben. Je früher der Wirkstoff eingesetzt wird, desto geringer sind seine Auswirkungen auf das Hefewachstum, da sich die Hefen erst in einem sehr reifen Beerenzustand stark vermehren.

Literatur

- LEMPERLE, E. 1989a: Fungizidrückstände auf Weintrauben, in Traubenmost und in Wein. *Rebe und Wein* 42: 132-138
- LEMPERLE, E. 1989b: Wirkstoffrückstände nach Fungizidanwendung. *Weinwirtschaft-Technik* (3): 14-26
- LEMPERLE, E. und KERNER, E. 1969: Wirkstoffrückstände und Gärbeeinflussungen nach Anwendung von Basfungin, Euparen und Ortho-Phaltan im Weinbau. *Wein-Wiss.* 24(10): 357-371
- MINARIK, E. und RAGALA, P. 1966: Einfluss einiger Fungizide auf die Hefeflora bei der spontanen Mostgärung. *Mitt. Klosterneuburg* 16: 107-114
- TROMP, A. and DE KLERK, C. A. (1988): Effect of copperoxychloride on the fermentation of must and on wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 9(1): 31-36
- VIVIANI-NAUER, A., HOFFMANN-BOLLER, P. and GAFNER, J. 1997: In vivo detection of Folpet and its metabolite phthalimide in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 48(1): 67-70

Manuskript eingelangt am 21. November 2006