



Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft



---

Schlussbericht zum Thema

00. Monat 2024

---

# Entwicklung praktikabler Maßnahmen zur Schließung der Verschleppungswege von Kartoffel- und Zuckerrübenzystennematoden

FKZ:  
2815NA120

Projektnehmer/Projektnehmerin:  
Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

**Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:**

[www.bundesprogramm.de](http://www.bundesprogramm.de)  
[www.oekolandbau.de/forschung](http://www.oekolandbau.de/forschung)

**Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:**

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung  
Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
Deichmanns Aue 29  
53179 Bonn  
Tel.: 0228-6845-3280  
E-Mail: [boel-forschung@ble.de](mailto:boel-forschung@ble.de)

# Schlussbericht zum Vorhaben

Titel des Forschungsvorhabens:

**Entwicklung praktikabler Maßnahmen zur Schließung der Verschleppungswege von Kartoffelzysten- und Rübenzystennematoden (GlobRISK)**

Zuwendungsempfänger:

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Ausführende Stelle:

Julius Kühn-Institut - Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit

Förderkennzeichen:

2815NA120

Laufzeit:

01.09.2018-31.08.2021

Verlängert bis 31.12.2021

Verlängert bis 31.12.2022

Verlängert bis 31.08.2023

Kooperationspartner:

Julius Kühn-Institut – Institut für Pflanzenschutz im Ackerbau und Grünland (Standorte Elsdorf und Braunschweig)

Gefördert durch



Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

## **Kurzfassung**

Entwicklung praktikabler Maßnahmen zur Schließung der Verschleppungswege von Kartoffelzysten- und Rübenzystennematoden (GlobRISK)

Autor(en): Dr. Stephan König<sup>1</sup>, Dr. Beatrice Berger<sup>2</sup>, Dr. Matthias Daub<sup>3</sup>, Lisa Schumann<sup>1+</sup>, Dr. Ahmed Elhady<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig; [stephan.koenig@julius-kuehn.de](mailto:stephan.koenig@julius-kuehn.de)

<sup>2</sup>Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig; [beatrice.berger@julius-kuehn.de](mailto:beatrice.berger@julius-kuehn.de)

<sup>3</sup>Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Dürener Straße 71, 50189 Elsdorf/Rhld; [matthias.daub@julius-kuehn.de](mailto:matthias.daub@julius-kuehn.de)

<sup>4</sup>DARWIN21, Center for Desert Agriculture, King Abdullah University of Science and Technology, 10 Thuwal 23955-6900, Saudi Arabia

<sup>1+</sup>Frau Schumann ist gegenwärtig nicht im wissenschaftlichen Bereich tätig

Resterden, überwiegend Anhangserden aber auch Verarbeitungsrückstände der Kartoffelpflanze, stellen einen der wichtigsten Verbreitungswege für Quarantäneschadorganismen im Kartoffelanbau dar. Unter dem Aspekt der Pflanzenquarantäne zur Tilgung bzw. Verhinderung einer weiteren Ausbreitung von noch nicht weit verbreiteten Organismen mit hohem Schadpotential müssen Reststoffe frei von Quarantäneschadorganismen sein, wenn sie auf landwirtschaftlich genutzte Habitate zurückgeführt werden sollen. Vor allem Organismen mit langen Ruheperioden und hoher Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse wie Kartoffelzystennematoden aus der Gattung *Globodera* stellen dabei eine besondere Bedrohung dar.

Im Projekt GlobRISK erfolgte die Erprobung, Optimierung und wissenschaftliche Bewertung der phytosanitären Verfahren Inundation, thermische Behandlung, ionisierende Strahlung, Ozonierung, Kompostierung und anaerobe Bodenbehandlung hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen Zystennematoden in Resterden. Es wurde eine definierte Anzahl von Referenzzysten behandelt, um anschließend die Schlupffähigkeit juveniler Nematoden und die Fähigkeit zur Reproduktion an anfälligen Kartoffelpflanzen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu untersuchen. Genutzt wurden internationale Standardmethoden (Schlupftest, Biotest) zur Ermittlung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit der Nematoden. Weitere im Projekt untersuchte Verfahren zur Vitalitätskontrolle, wie Lebendfärbung, Trehalosegehaltsbestimmung sowie molekularbiologische Assays ausgehend von RNA oder DNA erwiesen sich für die Quantifizierung lebender Nematoden als ungeeignet. Es zeigte sich, dass die Behandlungsverfahren, mit Ausnahme des Einsatzes reaktiver Detergenzien in der Ozonierung, unter verschieden hohem technischem Aufwand und Ressourcenverbrauch das Potential zur sicheren Abtötung von Kartoffelzystennematoden in Resterden besitzen. Die vielfältigen Untersuchungen sowohl im Labor- als auch im Praxismaßstab sind im Bericht dargestellt.

Soil tare, predominantly soil residuals but also processing residues of the potato plant, represent one of the most important pathways for the spread of quarantine pests in potato cultivation. Under the aspect of plant health to eradicate or prevent further spread of organisms with high pest potential that have not yet distributed widely, tare soils must be free of quarantine pest organisms if they shall be transferred back to agriculturally used habitats. Organisms with long dormancy periods and high resistance to environmental impacts, such as potato cyst nematodes from the genus *Globodera*, pose a particular threat in this respect. In the GlobRISK project, the testing, optimisation and scientific evaluation of the phytosanitary treatments inundation, thermal treatment, ionising radiation, ozonisation, composting and anaerobic soil disinfestation was carried out with regard to their effectiveness against cyst nematodes in residual soil. A defined number of reference cysts was treated to subsequently investigate the hatchability of juvenile nematodes and the ability to reproduce on susceptible potato plants compared to untreated controls. International standard methods (hatching test, bioassay) were used to determine the viability and reproduction of the nematodes. Other viability control methods investigated in the project, such as vital staining, trehalose content determination and molecular biological assays based on RNA or DNA, had been proved to be unsuitable for quantifying living nematodes. It was shown that the treatment methods, with the exception of the use of reactive detergents in ozonisation, have the potential to reliably inactivate potato cyst nematodes in tare soils with varying degrees of technical effort and resource consumption. The diverse investigations, both in the laboratory and on a practical scale, are presented in the report.

## Inhalt

1	Einführung.....	5
1.1	Gegenstand des Vorhabens.....	5
1.2	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts.....	6
1.3	Planung und Ablauf des Projektes.....	8
2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	13
3	Material und Methoden.....	22
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse .....	44
5	Diskussion der Ergebnisse .....	75
6	Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	89
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen .....	92
8	Zusammenfassung.....	94
9	Literaturverzeichnis .....	97
10	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse.....	102

## 1 Einführung

### 1.1 Gegenstand des Vorhabens

Zystennematoden an Kartoffel (*Globodera pallida* und *G. rostochiensis*) und Zuckerrübe (*Heterodera schachtii*) stellen als schwer bekämpfbare Schadorganismen eine akute Bedrohung der hochwertigen und nachhaltigen Pflanzenproduktion in Deutschland dar, da sie erhebliche Ertragsverluste bewirken können.

Bei der Verarbeitung von Kartoffeln und Zuckerrüben fallen jährlich mehrere Hunderttausend Tonnen an Resterde und Verarbeitungsrückständen (Schalen, schadhafte Kartoffeln/ Zuckerrübenbruchstücke, Waschwasser) an, da die Feldfrüchte i.d.R. nicht rückstandsfrei von anhaftender Erde geerntet werden können. Während die Verbreitung von Kartoffelzystennematoden mit Pflanzgut durch strenge Regelungen in den letzten Jahren stark reduziert werden konnte, stellt die Einbringung unbehandelter Resterden aus der Kartoffel- und Zuckerrübenverarbeitung derzeit einen der potentiellen Hauptverschleppungswege von Nematoden dar. Dieser trägt maßgeblich zu der nach wie vor kritischen Befallssituation in Deutschland von Speise-Wirtschaftskartoffeln bei<sup>1</sup>.  
Verarbeitungsreste aus der Kartoffelproduktion enthalten neben anderen Pathogenen auch

---

<sup>1</sup> bis zu 20% der im jährlichen sogenannten Monitoring Survey untersuchten Flächen im Umfang von 0,5% der Gesamtanbaufläche European Commission (2022)

lebensfähige Kartoffelzystennematoden, die nach der EU-Durchführungsverordnung 2022/1192 EU nicht mehr auf ackerbaulich genutzte Flächen rückübertragen werden können. Daraus resultiert die Verhinderung der Einbringung von mit Zystennematoden belasteter Erde, die mit Nematodenpopulationen von unterschiedlichem genetischen Potential hinsichtlich ihrer Virulenz- bzw. Pathogenitätseigenschaften versehen sind, auf Flächen, die bis dahin nicht oder von weniger virulenten Populationen besiedelt waren. Dies ist von hohem wirtschaftlichen Interesse im Sinne einer nachhaltigen Verfügbarkeit unbelasteter Anbauflächen für die zukünftige Kartoffelproduktion in Deutschland. Die enormen Mengen an jährlich anfallender, zumindest partiell mit Schaderregern befallener Resterden, die größtenteils aus landwirtschaftlich nutzbaren, nährstoffreichen Oberböden der jeweiligen Erzeugerregionen bestehen, können jedoch nur zum Teil dauerhaft aus dem Kreislauf einer landwirtschaftlichen Nutzung entzogen werden, indem sie beispielsweise zur Deponie- oder Straßenrandbegrünung Verwendung finden. Wirtschaftlich und ökologisch von hohem Interesse ist es deshalb, dekontaminierte, von Schaderregern befreite Erden, wieder in den Nutzungskreislauf zurückzuführen.

## 1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten eine Reihe von Verfahren erprobt wurden, um Zystennematoden im Feld gezielt zu bekämpfen, besteht ungebrochen hoher Forschungsbedarf, um den Kartoffel- und Zuckerrüben verarbeitenden Betrieben eine einfach umsetzbare Methode zur fachgerechten Resterdebehandlung zur Verfügung zu stellen.

Das vorliegende Projekt dient dem weiteren Erkenntnisgewinn und der Praxiserprobung der erforderlichen Maßnahmen zur Dekontamination von Resterden.

Das Vorhaben zielt hierbei auf die Optimierung aktuell angewendeter phytosanitärer Verfahren bei der Kartoffelverarbeitung und Zuckerproduktion ab. Die Rückführung Zystennematoden-freier Resterde trägt zur Erhaltung der Nachhaltigkeit der Kartoffelproduktion, sowie der Ertragserhaltung im Zuckerrübenanbau in der deutschen Landwirtschaft bei. Ergebnisse des Vorhabens sollen einen essentiellen Bestandteil für die Weiterentwicklung der Leitlinie zur Bekämpfung der Kartoffelzystennematoden und Anpassung der Kartoffelkrebs-/Kartoffelzystenverordnung liefern. Es wird erwartet, dass auf Grundlage der Projektergebnisse die Eintragung von Kartoffelzystennematoden in landwirtschaftlich genutzte Flächen deutlich eingeschränkt und damit das Befallsniveau begrenzt oder sogar verringert werden kann.



#### Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

- Möglichst zeitnaher Transfer wirksamer und kosteneffizienter Lösungen zur Zystennematoden-Entseuchung großer Resterdemengen in Verarbeitungsbetrieben
- Minimierung des Verschleppungsrisikos von Zystennematoden durch Optimierung phytosanitärer Verfahren in der Verarbeitung von Kartoffeln und Zuckerrüben
- Stärkung der nachhaltigen Zuckerrüben-, Kartoffel- und Pflanzkartoffelproduktion und somit der Wettbewerbsfähigkeit
- Verminderung der Anzahl der durch Quarantänemaßnahmen für den Kartoffelanbau gesperrten bzw. nur mit einem begrenzten Sortenspektrum im Rahmen des Bekämpfungsprogrammes kultivierbaren Flächen
- Schutz der Ressource Boden durch Wiederaufbereitung großer Mengen dekontaminierter Böden in den landwirtschaftlichen Nutzungskreislauf

#### Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele des Vorhabens

- Vergleich verschiedener Bodenbehandlungsverfahren im Labormaßstab (Mesokosmenversuche), dabei Erhebung von Daten relevanter metabolischer und chemischer Prozesszustände im Behandlungsverlauf und deren Korrelation auf Überlebensfähigkeit und den Entwicklungszyklus von Zystennematoden
- Untersuchung repräsentativer Bodenarten mit unterschiedlichen physikochemischen Bodeneigenschaften aus den im amtlichen Monitoring von Kartoffelzystennematoden erkannten Befallsschwerpunkten in Deutschland
- Versuch der Adaption und Etablierung wirksamer Verfahren im Praxismaßstab
- Vergleich und Weiterentwicklung von Verfahren zur Bestimmung der Lebensfähigkeit und Entwicklungs- bzw. Fortpflanzungsfähigkeit (viability) der Nematoden anhand biochemischer und molekularbiologischer Zielmoleküle (marker) für die Erfolgskontrolle der Wirksamkeit der getesteten Verfahren

### 1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Meilenstein	Thema	Untersuchungszeitraum																																					
		2018				2019												2020												2021									
		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8		
	<b>Allgemeine Versuchsvorbereitung</b>																																						
	Vermehrung von Referenzzysten																																						
	Herstellung von Gazesäckchen mit jeweils 50 Zysten pro Nematodenart/ Lagerungszustand (feucht oder trocken)																																						
M1	<b>Bestimmung der letalen Dosis zur Bekämpfung von Zysten nematoden</b>																																						
	Nematizid (Kontrolle)																																						
	Anaerobe Behandlung																																						
	Thermische Behandlung																																						
	Elektromagnetische Strahlenbehandlung																																						
	Ozonwasserbehandlung																																						
	Ionisierende Strahlenbehandlung																																						
M2	<b>Testung verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Lebens- und/oder Entwicklungsfähigkeit der Nematoden an behandelten Tieren und unbehandelten Kontrollen</b>																																						
	Biotest (beinhaltet Anzucht Kartoffel, Versuchsansatz, Bodenextraktion von Zysten und Juvenilen J2)																																						
	Schlupftest (beinhaltet Herstellung von frischem potato root extract; Inkubationszeit 10 d und mikroskopische Auswertung)																																						
	Mikroskopische Untersuchung der Tiere																																						
	Lebendfärbung und mikroskopische Auswertung der angefärbten Larven und Eier (beinhaltet 7 d Anfärbung in New Blue R stain bzw. Meldola's Blue, sowie anschließende Auswertung)																																						
	Trehalosegehaltsuntersuchung von Zysten, Eiern und Larven																																						
	Extraktion der m-RNA und Reverse Transkriptase Real-Time PCR																																						
	Blocken der extrazellulären DNA, Extraktion der Gesamt-DNA und Real-Time PCR Auswertung																																						
M3	<b>Mesokosmenversuche zur Bewertung der Wirksamkeit verschiedener Behandlungsverfahren</b>																																						
	Versuchsansatz und Durchführung der anaeroben/aeroben Behandlungsverfahren (Mesokosmenversuche)																																						
	Versuchsansatz und Durchführung der thermisch/physikalischen Behandlungsverfahren																																						
	Bewertung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit der Nematoden (mittels Biotest und einem weiteren in M2 erprobten und bewährten Verfahren)																																						
	Ergebnisauswertung																																						
M4	<b>Freilandversuche zur Bewertung der Anwendbarkeit und Wirksamkeit der Resterdebehandlungsverfahren unter Praxisbedingungen</b>																																						
	Einbringen von Referenzzysten in Stapelteiche und monatliche Entnahme von Referenzzysten und ursprünglich in der Resterde vorhandenen Zysten																																						
	Beschaffung von Materialien zur Durchführung von Kompostierung, Anaerober Inundation und Biofumigation																																						
	Witterungsabhängige Errichtung von Mieten zur Kompostierung bzw. Abdeckung und Einbringung von organischen Materialien und Folienabdeckung zur Durchführung von ASD und Biofumigation																																						
	Monatliche Probenahme der Mieten																																						
	Bewertung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit der künstlich eingebrachten Referenzzysten und ursprünglich in der Resterde enthaltener Zysten																																						
	Ergebnisauswertung																																						
M5	<b>Erarbeitung von Informationsmaterial</b>																																						
	Ergebnispublikation in Fachzeitschriften																																						
	Erstellung von Merkblättern, Broschüren und Vortragspräsentation der Ergebnisse in einer Veranstaltung vor Vertretern der Verarbeitungsindustrie und Pflanzenschutzdiensten																																						

Meilensteine	Aufgaben/Ziele	Zeitraum
M1	Verfahrensspezifische Ermittlung der Dosisparameter (Temperatur, ozoniertes Wasser, Mikrowellen- und ionisierende Strahlung, Gaskonzentrationen). zur Erreichung der LD50/90 Raten in Abhängigkeit von der Behandlungszeit bekannt.	09/2018 – 03/2019
M2	Verfahren zur Ermittlung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit aufgestellt. Effizienz der Verfahren im Verhältnis zur etablierten Methode bekannt.	02/2019 – 06/2019
M3	Ergebnisse zur Mortalität von Nematoden und prozesssteuernder Begleitparameter der verschiedenen Behandlungsverfahren aus den Mesokosmenversuchen liegen vor und sind reproduzierbar.	01/2019 – 10/2020
M4	Untersuchungsergebnisse zur Mortalität von Nematoden aus Praxisversuchen in bestehenden Anlagen (z.B. Stapelteiche, Silos) sowie Prozessbegleitparameter liegen vor. Ableitung zur Modifizierung von Verfahren und Identifikation möglicher Restrisiken sind vorhanden.	11/2018 – 06/2021
M5	Informationsmaterial mit Empfehlungen zu den Einsatzmöglichkeiten der verschiedenen Verfahren, den einzuhaltenden Behandlungsdosen und den Methoden zur Überwachung und Erfolgskontrolle der Verfahren sind erstellt	03/2021 – 08/2021

Die ursprünglich vorgesehene schrittweise Bearbeitung der Verfahren zur Behandlung der Resterde vom labor- zum praxisnahen Maßstab (**Arbeitspaket 2**) mit (i) Ermittlung der Dosisparameter, (ii) Untersuchung der Verfahrenswirksamkeit im Labormaßstab (Mesokosmenansätze; <1,0 l) und (iii) der Umsetzung in der Praxis oder in praxisnahen Größenordnungen erfolgte im Einzelfall parallel zueinander und nur bedingt wie im Antrag vorgesehen sukzessive aufeinander aufbauend. Parallel wurden ausgehend von den bereits im Labor der Quarantänenematologie (JKI, Standort Braunschweig) genutzten Untersuchungsmethoden zur Bewertung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit (**Arbeitspaket 1**) der Nematoden durch mikroskopische Bewertung des Zustandes der Zysten, Eier und Juvenilen der Nematoden bzw. des zur Populationsvermehrung genutzten Biotestes, auch die übrigen Bewertungsverfahren untersucht. Diese waren im Einzelnen: (i) Schlupftest mit Wurzelextrakten (Diffusaten) gewonnen aus der vollanfälligen Kartoffelsorte cv. 'Desiree' (sowie ergänzend dazu auf Anregung der Kollegen der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Bayern die Testung des schlupfauslösenden Toxins Pikrolonsäure); (ii) Lebendfärbung mit folgender mikroskopischer Bewertung; (iii)

Trehalosegehaltsbestimmung; (iv) Amplifikation zellulärer DNA nach Abbindung (Blocking) freier DNA mittels Propidium-Monoazid (PMA).

**2019** erfolgte in **Arbeitspaket 1** die Testung der Methoden (i) Schlupftest (folgend EPPO PM 7/40(4)) mit Wurzelextrakten der Kartoffel im Vergleich zum (ii) weniger aufwendigen Hinzufügen des künstlichen Schlupfauslösers Pikrolonsäure für Kartoffelzystennematoden; (iii) Lebendfärbung mit MELDOLA'S BLUE und zusätzlich NILE BLUE A im Verhältnis zum (iv) Biotest an vollanfälligen Knollen von cv. ‚Desiree‘ für unbehandelte Nematodenzysten der weiter im Projekt genutzten Frühjahrsvermehrung 2016 und Herbstvermehrung 2016/2017 von *G. pallida* und *G. rostochiensis*. Untersuchungen von DNA nach Blocking mittels PMA wurden gestartet. Für *H. schachtii* erfolgte die Sensitivitätstestung im Biotest mit verschiedenen Nematodenabundanzen ( $P_i$ -Werte) im Boden. In **Arbeitspaket 2** wurde bereits im Praxismaßstab (Bruknerbecken/Stapelteiche) die Wirksamkeitsuntersuchung des Verfahrens der anaeroben Überflutung (Inundation) in Kooperation mit der Nordzucker AG am Standort Uelzen in einer ersten Kampagne 2018/2019 (jeweils September-März im Folgejahr) durchgeführt und mittels der zu diesem Zeitpunkt bereits etablierten Verfahren Schlupftest und Biotest ausgewertet sowie die Wiederholungsuntersuchung des Verfahrens in der Rübenverarbeitungs-Kampagne 2019/2020 initiiert. Die Bestimmung der Dosisparameter für eine wirksame Nematodenbehandlung mittels thermischer Verfahren (Mikrowelle) wurde abgeschlossen und in Schlupf- bzw. Biotests geprüft. Die Behandlung mit ozoniertem Wasser, bearbeitet in Kooperation mit dem Unterauftragnehmer Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnik IST (Braunschweig), im Labormaßstab wurde als unwirksam erkannt. Weitere Untersuchungen mit chlorierten Verbindungen (Fokus Chlordioxid und Natrium-Hypochlorid) nach Aufspaltung einer Kochsalzlösung durch die Diamantelektrode wurden im Folgejahr durchgeführt.

**2020** wurden in **Arbeitspaket 1** Untersuchungen zu DNA-Blocking und Trehalosegehaltsbestimmung im Vergleich zum Schlupf- und Biotest als arbeitsintensiv, störanfällig und unpräzise in der Quantifizierung abgeschlossen (siehe Abschnitt 4). Die Lebendfärbung wurde in der Bewertung ebenfalls abschließend erprobt und als problematisch eingestuft. Der Schlupftest ausschließlich mit Kartoffelwurzelextrakten und Biotest für Kartoffelzystennematoden sowie Biotest mit *Brassica* spp.-Zwischenwirten und Schlupftest nach Induktion durch  $ZnCl_2$ -Lösung für *H. schachtii* wurden als zuverlässigste Methoden zur Wirksamkeitsbewertung (Lebens- und Entwicklungsfähigkeitsbestimmung) identifiziert. In **Arbeitspaket 2** konnten die Praxisversuche zur Inundation abgeschlossen werden – einschließlich der Auswertung der behandelten Zysten im Schlupf- und Biotest. Eine Bewertung der Wirksamkeit von Kompostierung, thermischer Behandlung durch Hitze und Wasserdampf sowie der anaeroben Bodendesinfektion ist nur in der Umgebung von zu behandelnder Bodenmatrix sinnvoll und wurde daher beginnend 2020 und in den

Folgejahren direkt in den praxisrelevanten Geräten/Umgebungsbedingungen untersucht. Die Behandlung mit Chlorverbindungen als Spaltprodukte verschieden konzentrierter Kochsalzlösungen wurde als wirkungslos identifiziert. Ein Inundationsversuch in 0,5 Liter-Behältern mit Nematodenzysten in Parabraunerde nach Wasserüberflutung und Zugabe verschiedener abbaubarer Substrate (Saccharose, Lactose, Kartoffelreste) sowie mit Kalkmilch ( $\text{CaOH}_2$ ) mit verschiedener Behandlungsdauer wurden erfolgreich abgeschlossen. Die anaerobe Bodendesinfektion in 0,5 Liter Mesokosmen versetzt mit Substrat Herbie® (Hersteller Thatchtec bzw. Soilwise, NL) verblieb ohne Behandlungserfolg. Hier wurde als Problem ein zu kleines Behandlungsvolumen in Rücksprache mit dem Hersteller identifiziert. In diesem Jahr erfolgte auch der Beginn der Praxisversuche zur Kompostierung im Kompostwerk Bützberg. Der Abschluss der Untersuchungen zur Behandlung mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlen verschiedener Stärke wurden im Unterauftrag durch die Firma STERIS Synergy Health Radeberg GmbH durchgeführt. Der ursprünglich im Antrag benannte Unterauftragnehmer BGS (Wiehl, DE) erwies sich im Auftragsvergabeverfahren als zu teuer.

**2021** erfolgten ausschließlich Arbeiten in **Arbeitspaket 2** zur Wirksamkeitsbewertung verschiedener Verfahren zur Resterdebehandlung Abgeschlossen wurden die Untersuchungen zur thermischen Behandlung (i) im Mikrowellentunnel (Magnetron), durchgeführt im Unterauftrag bei Fricke & Mallah (Peine, DE), (ii) im Dämpfungsgerät der Fa. Gebhardt Anlagentechnik (Herbholzheim, DE, Fassungsvermögen ca. 0,5 m<sup>3</sup> Boden) und (iii) im Plattenerhitzer der Fa. Sterilo (Harter Elektrotechnik, Schenkenzell, DE; Fassungsvermögen ebenfalls ca. 0,5 m<sup>3</sup> Boden). Ebenfalls wurden die Versuche zur Kompostierung 2021 erfolgreich abgeschlossen. Die im Freiland in der Mikroplot-Anlage des JKI unter Quarantänebedingungen durchgeführten Versuche zur anaeroben Bodenbehandlung (anaerobic soil disinfestation =ASD) waren aufgrund des fehlenden Luftabschlusses der Mikroplots und der zu geringen Bodenfeuchte nicht erfolgreich (siehe Abschnitt 4).

**2022** wurden im Rahmen der ersten Verlängerungsphase des Projektes die Versuche zur anaeroben Bodendesinfektion unter kontrollierten Bedingungen in luftdicht abgeschlossenen Eimern ( $V = 17$  Liter Boden) und im miniaturisierten Versuchsansatz mit Falcon-Tubes ( $V = 25$  ml Boden + 25 ml Luftraum = Headspace) im 8x replizierten Ansatz durchgeführt. Mit einer Bodendurchfeuchtung von 10% (v/v) Wasseranteil, 8 g·l<sup>-1</sup> der beiden untersuchten Substrate Herbie® und Senfsaatmehl aus *Brassica juncea* (bereitgestellt durch P.H. Petersen Saatzucht, DE) konnte die Wirksamkeit des Verfahrens im 17 Liter-Mesokosmenansatz erfolgreich nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit der ASD im miniaturisierten Versuchsansatz mit Falcon-Tubes konnte nur partiell für eine Behandlung mit dem Substrat Senfsaatmehl nachgewiesen werden (nähere Informationen unter Abschnitt 4). Es erfolgte zudem die Veröffentlichung einer Publikation der Ergebnisse zu den

Bestrahlungsversuchen und die Untersuchung der im miniaturisierten Versuchsansatz behandelten Zysten mittels Illumina-Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS) durch Fa. Novogene (Cambridge, UK).

**2023** wurden in der zweiten Verlängerungsphase des Projektes (ohne geförderten Wissenschaftler/Wissenschaftlerin) (i) die Wirksamkeitsbewertung des Verfahren zur anaeroben Bodendesinfektion mit Schlupf- und Biotests aller ASD-behandelten Nematodenzysten und die (ii) die Auswertung der Sequenzierdaten abgeschlossen sowie (iii) die Publikation der Ergebnisse zur Inundation und Kompostierung in Fachzeitschriften veröffentlicht. Ein Interview zur Thematik der Behandlungsverfahren mit Frau Elena Koene, freie Journalistin, zur Veröffentlichung in einer deutschsprachigen Zeitschrift wurde durchgeführt, eine Veröffentlichung steht noch aus.

## 2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

### Arbeitspaket (AP) 1 Nachweismethoden für Vitalität und Entwicklungsfähigkeit von Zystennematoden

Für eine Bewertung der Behandlungswirkung verschiedener Verfahren zur Abtötung lebender Nematodenzysten in Resterde ist ein zuverlässig anzuwendender und zudem reproduzierbarer Nachweis der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit der im Ruhezustand vorliegenden Nematodenzysten unabdingbar. Neben dem bereits im Labor etablierten Verfahren des Biotests zum gleichzeitigen Nachweis der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit von Zystennematoden wurde mit dem Schlupftest eine weitere Standardmethode aus dem Diagnoseprotokoll der EPPO PM 7/40(4) (EPPO 2017) im Labor getestet. Mit diesen beiden Methoden im Vergleich wurden die in der Literatur beschriebenen Quantifizierungstests einer Schlupfinduktion mit dem Detergens Pikrolonsäure erprobt. Hierbei wurden im Labor die bereits etablierte lichtmikroskopische Bewertung des Zustandes von Eiern und Zysten der Nematoden bei 250x bzw. 400x Vergrößerung vor und nach Anfärbung mit MELDOLA'S BLUE und NILE BLUE A mit der Trehalosegehaltsbestimmung lebender Eier und Juvenile sowie mit molekularbiologischen Untersuchungen der DNA nach vorangegangener Blockierung zellfreier DNA, hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit verglichen.

Der **Biotest** als Quantifizierungsmethode an den Wirtspflanzen Kartoffel für die beiden Arten *G. pallida* und *G. rostochiensis* sowie *Brassica napus* für *H. schachtii* ist als sehr zuverlässig jedoch mit bis zu 100 Tagen Testdauer für eine Wirtspassage auch als äußerst zeitaufwendig bekannt (Kaemmerer 2012; Meinecke *et al.* 2014). Zudem ist nicht *per se* aus dem Test heraus ersichtlich, ob für *Globodera* sp. die Dormanz bzw. die Diapause, der vertiefte Ruhezustand der Nematoden, in jedem Fall im Verlauf des Biotests gebrochen worden ist (Ouden 1960). Durch Mitführen unbehandelter Kontrollen von Nematodenzysten aus demselben Vermehrungszyklus ist jedoch eine relative Vermehrungsrate im Vergleich zu behandelten Zysten zu erwarten. Mit bis zu 7 Wochen Behandlungsdauer ebenfalls zeitaufwendig ist die Schlupfinduktion (**Schlupftest**) in wässrigen Filtraten vollanfälliger Kartoffelknollen. Hingegen kann eine Auswertung bei Rübenzystennematoden bereits nach einer Inkubation von 14 Tagen in 5 mmol ZnCl<sub>2</sub>-Lösung (Clarke & Shepherd 1964) erfolgen. Um die kontinuierliche Gewinnung der Wurzeldiffusate (*potato root diffusates*, PRD) aus frischen Kartoffelpflanzen zu vermeiden und zudem die Reproduzierbarkeit des Schlupftests zu erhöhen, haben Clarke & Shepherd (1964; Clarke & Shepherd 1968) in vergleichenden Untersuchungen aus 400 chemischen Verbindungen Pikrolonsäure (4-Nitro-3-Methyl-1-p-Nitrophenylpyrazolon) in Konzentrationen vergleichbar zu ZnCl<sub>2</sub> (0,4 - 4 mM) als zuverlässiges künstliches Schlupfinduktionsmittel für Kartoffelzystennematoden beschrieben.

Eine vorläufige Einschätzung der Lebensfähigkeit von Eiern und Juvenilen kann auch ohne vorangehende biologische Testung **direkt mikroskopisch** vorgenommen werden. Typische Symptome absterbender Nematoden sind dabei Läsionen der Kutikula, Vakuolenbildung in der Leibeshöhle und scharfe Knickungen des ausschlüpfenden Juvenilenstadiums 2 (J2), sowie Schwärzung der Eier in der Zyste (Lücke 1964; EPPO 2017 Appendix 9). Allerdings findet eine Bewertung der Lebensfähigkeit von Eiern und Juvenilen subjektiv statt und ist in den meisten Fällen mikroskopisch nicht zu beurteilen (Shepherd 1962).

Aus diesem Grund wurden in den 1960'er Jahren eine Reihe von Nematodenlebensfarbstoffen entwickelt, die bisher nicht Teil des EPPO-Protokolls 7/40 sind. Das Prinzip einer **Färbung** mit gängigen Farbstoffen aus der Mikrobiologie wie Malachitgrün bzw. Textilfarbstoffen wie NILE BLUE A (Ogiga & Estey 1974) oder MELDOLA'S BLUE (Shepherd 1986) beruht auf der Wasserlöslichkeit der Farbstoffe, die die äußere Körperhülle (Kutikula) der abgetöteten Nematoden durchdringen. Dabei bewirken sie eine verschieden starke Grün- bzw. Blaufärbung (malvenfarbig – schwarzblau). Die Kutikula lebender Tiere können diese Farbstoffe nicht durchdringen, lebende Tiere sollten daher hyalin bis weißgrau in ihrer Färbung bleiben. Als nachteilig beschrieben werden (i) die zeitaufwendige Auswertung jeder einzelnen Zyste und der darin enthaltenen Eier, sowie (ii) die Tendenz zur Überschätzung der als lebend gezählten Eier im Vergleich zum Schlupftest (Back et al. 2004 Final project report DEFRA HP0143 zitiert in Kaemmerer 2012) bzw. (iii) eine Überschätzung der Zahl abgetöteter Tiere durch Aufnahme und Anreicherung des Farbstoffes im Verdauungstrakt (intestinal granules, Meyer *et al.* 1988). Ein weiterer Nachteil der verwendeten Reagenzien ist, insbesondere für MELDOLA'S BLUE, dessen Toxizität bei Exposition mit Haut und Atemwegen (letzteres bei Lösung des Farbpulvers) bzw. Umwelttoxizität und die damit verbundene fehlende Verfügbarkeit dieses Farbstoffes in Europa. Die **Bestimmung des Trehalosegehaltes** aus dem lebenden Zysteninhalt (Eier und Juvenile) ist eine als sehr sensitiv beschriebene Lebendnachweismethode (Beniers *et al.* 2014). Trehalose ist ein Zweifach-Zucker (Di-Saccharid), der hoch konzentriert in die Kutikula lebender J2 Juvenilen und Eier von Zystennematoden integriert ist und bereits kurz nach dem Tod der Tiere im Boden abgebaut wird. Bekannte Nachteile sind, dass bei Messung von mehr als einer Zyste (mit ca. 262 Eiern) Verdünnungen durchgeführt werden müssen, um eine Saturierung und damit das Erreichen des oberen messbaren Grenzwertes im Photometer durch einen zu hohen Trehalose-Gehalt in der Lösung zu vermeiden (Beniers *et al.* 2014). Es besteht ebenfalls die Möglichkeit einer Überschätzung lebender Tiere nach chemischer Behandlung, wenn nach der Abtötung die Trehalose noch nicht abgebaut worden ist (Beniers *et al.* 2014). Demgegenüber stehen die Vorteile einer hohen Genauigkeit (Nachweisgrenze 1 lebendes Ei! – siehe Beniers *et al.* 2014) verglichen mit dem Schlupftest, sowie der Durchführung des



Nachweises innerhalb weniger Stunden und damit verbundenen geringen Kosten von 0,13 € pro Probe.

Ein molekularbiologischer Ansatz zur Quantifizierung lebender Nematoden beruht auf der **Untersuchung von DNA**. Doppelsträngige DNA kann aufgrund ihrer relativ hohen chemischen Stabilität mehrere Wochen in der Umwelt überdauern, ohne von DNA-abbauenden Enzymen (DNasen) zerstört zu werden (u.a. Josephson *et al.* 1993). In Untersuchungen von bakteriellen Lebensgemeinschaften konnten bis zu 74% der anhand ihrer DNA mittels PCR untersuchten Organismen als nicht mehr lebend identifiziert werden (Luna *et al.* 2002). Mittels des DNA-bindenden Moleküls Propidium-Mono-Azid (PMA), das nicht in der Lage ist, Zellmembranen lebender Zellen zu durchdringen, ist es möglich, die DNA toter und lebender Organismen selektiv voneinander zu unterscheiden, wobei zellfreie Nematoden-DNA durch PMA bereits vor dem Aufschluss lebender Zellen gebunden und inaktiviert wird (Nocker *et al.* 2007). Nach der Extraktion der Gesamt-DNA der Zysten können die im EPPO-Protokoll bzw. der Durchführungsverordnung (EU) 2022/1192 beschriebenen PCR und Real-Time PCR Assays zum Nachweis verwendet werden. Eine positive Reaktion ist dabei nur für die DNA extrahiert, aus lebenden Zellen, die nicht mit PMA in Kontakt gekommen ist, zu erwarten.

## **Arbeitspaket (AP) 2**

Zur Behandlung von mit Kartoffel- und Rübenzystennematoden verseuchten Resterden mit Verarbeitungsrückständen der angebauten Kulturpflanzen wurde eine Reihe **bewährter Verfahren**, die bereits Bestandteile der nationalen und europäischen Bekämpfungsvorschriften sind, wie anaerobe Überstauung (Inundation), industrielle Kompostierung und verschiedene thermische Behandlungsverfahren (auf Basis von Mikrowellenstrahlung, Dämpfung und Trockensterilisation) neben **alternativen Verfahren** wie  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung (angewandt in der Verpackungsholzbehandlung gegen Asiatischen Laubholzbockkäfer nach ISPM15 (FAO 2018)), anaerobe Bodenbehandlung (ASD) sowie energiesparend produziertem ozoniertem Wasser auf ihre Wirksamkeit hin erprobt.

### **Arbeitspaket (AP) 2 - Inundation**

In der Rübenverarbeitung hat sich in vielen Betrieben die Deponierung der Resterde in Stapelteichen etabliert. Hierbei wird die im Waschgang anfallende Erde in verschiedenen Schritten dispergiert und in Teichanlagen mit je nach räumlichen Gegebenheiten variierenden Flächen- und Tiefenausdehnungen gespült. Anschließend lagert die mit Wasser überstaute Erde unter anaeroben Bedingungen für mehr als 90 Tage und wird nach Trockenlegung wieder zurück in für den Kartoffelanbau gesperrte Ackerflächen verbracht. Die Lagerung in Stapelteichen wird als anaerobe Überstauung (Inundation) bezeichnet und

findet parallel zur laufenden Verarbeitungskampagne der Zuckerrüben von Ende September bis Mitte Februar statt. Da die Resterde natürlich hohe Gehalte an leicht zersetzbarer organischer Substanz besitzt (Rübenbruchstücke mit bis zu 20% Zuckergehalt) wirken unter anaeroben Bedingungen besondere Abbauprozesse (Oka 2010). Hervorzuheben sind dabei Schwankungen im pH-Wert, Denitrifikationsprozesse (durch Mikroorganismen bewirkte Reduktion von Nitrat zu  $N_2$ ) Ammonium-Akkumulation, Sulphatreduktion und die Entstehung einer Vielzahl organischer Säuren, die auch für das Verfahren der anaeroben Fermentierung von Bedeutung sind (siehe entsprechenden Abschnitt sowie Schumann *et al.* 2023). Die anaeroben Bedingungen während der Überflutung der Resterde werden für Zystennematoden als zu 100% letal beschrieben, sie sind allerdings abhängig von der Lagerzeit (Stelter 1981; Heinicke 1989) und Temperatur (Spaull & McCormack 1988). Dies gilt jedoch nicht für die meisten bakteriellen (z.B. *Ralstonia solanacearum*, Allen 2005) und viele pilzliche Schaderreger (z.B. Kartoffelkrebs). Mesophil-anaerobe Bedingungen (35°C, anaerob) bewirken bereits nach 6 – 9 Wochen die Abtötung aller lebensfähiger Eier, wobei *G. pallida* anscheinend widerstandsfähiger ist als *G. rostochiensis* (Spaull & McCormack 1988). Unabhängig von der Art ist der Zustand feuchter bzw. getrockneter Zysten im Boden entscheidend für die Mindestverweildauer unter anaeroben Bedingungen. So können trockene, teilweise mit Luft gefüllte Zysten über viele Tage an der Oberfläche von Stapelteichen treiben und so den anaeroben Bedingungen im Sediment entgehen (u.a. Heinicke 1989). Die Verweildauer in diesen Teichen beträgt 120 Tage bei einer Abnahme der Lebensfähigkeit um 90% und 6 Monate bis zu einer Abnahme um 99% (Heinicke 1989). Auch Stelter (1981) konnte, nach einer schnellen Abnahme der Lebensfähigkeit in den ersten 4 Wochen (annähernd 90%), noch nach 5 Monaten Verweildauer unter kalt-mesophilen (15°C) Bedingungen vereinzelt lebensfähige Eier nachweisen. Auch hier war die Widerstandsfähigkeit von *G. pallida* (nicht signifikant) höher als die von *G. rostochiensis* und *H. schachtii*. Da alle Resterden durch Rückstände aus der Zuckerrübenverarbeitung stark mit organischem Material angereichert waren, war die Aufrechterhaltung anaerober Bedingungen durch Fäulnis- und Gärungsprozesse unabhängig von der Bodenart der Resterde kontinuierlich gegeben (Stelter 1981). Aufgrund der spezifischen Unterschiede im Verarbeitungsprozess (feuchte vs. trockene Resterdeabscheidung bei Zucker- bzw. Kartoffelverarbeitung) ist die Überflutung der Resterde bisher überwiegend in der zuckerverarbeitenden Industrie angewendet worden, kann aber mit hoher Sicherheit auch in der Kartoffelverarbeitung angewendet werden.

## **AP2 - Kompostierung**

Da Mikroorganismen beim oxidativen Abbau von organischer Substanz relativ ineffektiv arbeiten, geben sie einen großen Teil ihrer gewonnenen Energie als Wärme an die Umwelt ab (Zibilske 1998). Zum aeroben Abbau befähigte Mikroorganismen sind primär vorhanden

bzw. können künstlich in das zu behandelnde Substrat eingearbeitet werden (u.a. CMC-Controlled Microbial Composting<sup>®</sup>, Luebke, Peuerbach, Austria) und werden anschließend in offenen oder Folien-bedeckten Kompostmieten (windrows) über mehrere Monate gelagert. Die Kompostierung verläuft in mehreren Phasen, wobei in der mesophilen Phase ( $T < 40^{\circ}\text{C}$ ) andere Organismengemeinschaften vorherrschen als in der thermophilen Phase ( $T 40-70^{\circ}\text{C}$ ). Bei Temperaturen über  $70^{\circ}\text{C}$  werden neben Nematoden auch andere Mikroorganismen und Unkrautsamen zerstört, sodass die Resterde vom phytosanitären Standpunkt her als unbelastet gelten kann. Eine Temperaturbehandlung von bereits  $55^{\circ}\text{C}$  über 3 Tage wird in den meisten Protokollen als ausreichend empfohlen, um Schadorganismen wirksam abzutöten (LaMondia & Brodie 1984; Evans 1991). Bei Versuchen, die trockene Rüttelerde, die während der Zuckerrübenverarbeitung ebenfalls anfällt, zu kompostieren, wurde an unbehandelter Resterde eine Selbsterwärmungsphase von einer Woche mit einem Anstieg der Temperatur auf von ursprünglich  $25^{\circ}\text{C}$  auf  $45-65^{\circ}\text{C}$  beobachtet. Die darauffolgende Hochtemperaturphase erreichte über  $65^{\circ}\text{C}$  (lokal im Kern der Miete auch über  $70^{\circ}\text{C}$ ) für etwa 8-10 Wochen und endete mit einer mehrwöchigen Reifungsphase der dann stabilen Komposterde bei  $45^{\circ}\text{C}$  (Quelle: Betrieb von Kompostierungsanlagen, Bundesgütegemeinschaft e.V. in Hessler (2016)). Unter diesen Bedingungen konnte *H. schachtii* komplett abgetötet werden. Während eine Temperatur von  $60^{\circ}\text{C}$  für 2 d hohe Überlebensraten dieser Nematoden zeigte, wobei *G. rostochiensis* parallel dazu komplett abgetötet wurde (Noble & Roberts 2004). Feuchtigkeit ist für die Wirkung der Hitzebehandlung maßgeblich. Es wird berichtet, dass trockene Zysten bis zu 1 h einer Temperatur von  $100^{\circ}\text{C}$  widerstehen können und auch eine Lagerung für 16 h bei  $80^{\circ}\text{C}$  mit einer Überlebensrate von 34% überdauern können (Heinicke 1989). Feuchte Zysten werden demgegenüber bereits bei Temperaturen von  $70^{\circ}\text{C}$  bzw. 3 d bei  $50^{\circ}\text{C}$  komplett abgetötet. Stallmist wirkt bei der Kompostierung gemeinsam mit Resterde wesentlich effizienter als reine Komposterde. Dabei wird die höhere Wirkung des Stallmistes stärker auf die beim Abbau des organischen Materials entstehenden Gase als auf die Temperatur selbst zurückgeführt (Heinicke 1989). Endo (1962) konnte zudem zeigen, dass es zwischen Eiern in Zysten, zystenfreien Eiern und Juvenilen von *H. schachtii* keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Temperatursensitivität gab. Nachteile der Methode sind inkonsistente Temperaturbedingungen der Miete durch v.a. kältere Bereiche am Rand, was nur durch eine Störung des Prozesses mittels nochmaliger Vermischung nach 6-7 Wochen abzustellen wäre.

## **AP2 - Thermische Behandlungsverfahren**

Thermische Behandlungsverfahren wie die Dämpfung und Mikrowellenerhitzung schadereger belasteter Böden werden als hochwirksam angesehen, sind jedoch zumeist sehr kostenintensiv und mit hohem Energieverbrauch verbunden (van Loenen *et al.* 2003).

Andererseits weisen thermische Verfahren eine hohe Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl von Schaderregern mit Wirkraten von annähernd 99% auf (Falciglia *et al.* 2016). Eine Standardmethode zur Schaderregerentseuchung in landwirtschaftlich und gartenbaulich genutzten Böden ist die physikalische Bodenbehandlung mittels Einleitung von heißem Wasserdampf (**Dämpfung**; u.a. Crüger 1983). Dabei werden innerhalb kurzer Zeit durch Dämpfungsgeräte wie dem Dampfflug, die auf der Basis von Niederdruckdampf (0,5 bar) bzw. Hochdruckdampf (1,5 bar) arbeiten, Temperaturen von über 70°C erreicht, die in der gartenbaulichen Praxis als ausreichend angesehen werden, um Nematoden abzutöten (Crüger 1983). Demgegenüber werden andere bodenbürtige Schadorganismen an Kartoffel und Zuckerrübe wie Bakterien und Viren nur bei Temperaturen von 80-90°C wirksam bekämpft. Ziel der in Bezug auf die Dämpfung durchgeführten Untersuchungen war herauszufinden, ob durch die Einleitung heißen Wasserdampfes bzw. eine Trockenerhitzung des Bodens Unterschiede zwischen trockenen und feuchten Zysten zu beobachten sind, die bei den meisten thermischen Behandlungsverfahren einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit der Behandlung hinsichtlich der Nematodenüberlebensrate aufwiesen (Heinicke 1989).

Die Anwendung von **Mikrowellen** wird bereits seit den 1950er Jahren in vereinzelten Versuchen zur physikalischen Bodenentseuchung beschrieben (siehe Review Nelson 1996). Während frühe Versuche noch mittels relativ ineffizienter dielektrischer Hochfrequenz von 27 MHz arbeiteten (Eglitis *et al.* 1956), haben Versuche in den 1970er Jahren mittels Haushaltsmikrowellen (Frequenz 2450 MHz) bei allerdings sehr kleinen Bodenvolumina (90 bis 400 cm<sup>3</sup>) und niedriger Eindringtiefe (1,7 cm) der magnetischen Strahlungswellen bereits nach 30 sec eine völlige Entseuchung von Eiern und Juvenilen der freilebenden Nematodenart *Meloidogyne incognita* erzielt (O'Bannon and Good 1971), wobei auch die Behandlung von Zystennematoden (*Heterodera glycines* an Soja, Barker *et al.* 1972 zitiert in Rahi & Rich 2008) erfolgreich demonstriert werden konnte. Die Behandlungswirkung wurde bereits damals ausschließlich auf die Erhitzung des Bodens und nicht auf eine negative Wirkung der Mikrowellenstrahlung zurückgeführt (O'Bannon & Good 1971; Nelson 1996). Demgegenüber stehen allerdings eine Reihe praxisnaher Untersuchungen, die abhängig von der Eindringtiefe bei bis zu 5 cm gute Behandlungserfolge gegen Nematoden erzielten, jedoch bereits ab 10 cm Tiefe keine entseuchende Wirkung mehr feststellen konnten (Heald *et al.* 1974 wie zitiert in Nelson 1996). Die Mikrowellen-Bestrahlung muss v.a. hinsichtlich der Behandlungsdauer an Bodenart, Bodenmenge und Bodenwassergehalt angepasst werden, um eine wirksame Entseuchung der Resterde von Zystennematoden zu gewährleisten (van Wambeke *et al.* 1983). Eine signifikante Abschwächung der Strahlungsübertragung in den Boden (*attenuation*) tritt v.a. bei hohem Feuchtegehalt des Bodens auf, da feuchter Boden im Gegensatz zu trockenem Boden einen hohen Teil der elektromagnetischen Energie

absorbiert (van Assche & Uytebroek 1983). Neuere Studien aus den Jahren 2007 und 2011 belegen, dass es mittels fortgeschrittener Mikrowellenanlagen und einer gezielten Schichtung der zu behandelnden Erde mit einer oberen Schicht aus 6 cm trockener Erde und einer unteren Schicht mit ca. 10 cm feuchter Erde zu einer schnelleren Temperaturerhöhung und höheren Effizienz der Behandlung von Nematoden (*Rotylenchus reniformis*) kommt und damit auch energieeffizienter gearbeitet werden kann (Rahi & Rich 2008, 2011). Da der Boden zumindest kurzzeitig (30 sec bis 180 sec) auf 100°C erhitzt werden muss, werden erhebliche Mengen von Energie verbraucht (1256 J/(kg°K) – siehe Nelson 1996). In praxisnahen Hochdurchsatz-Behandlungsverfahren (z.B. Lebensmittelindustrie) kommen Hochleistungs-Magnetronen für die Erzeugung der elektromagnetischen Energie bereits zum Einsatz.

### **AP2 - Ionisierende Strahlung (β- und γ-Bestrahlung der Resterde)**

Der Einsatz von ionisierender Strahlung ist neben seiner breiten Anwendung in der Sterilisation von Verpackungen u.a. zur Aufbewahrung von Lebensmitteln, auch ein international anerkanntes physikalisches Verfahren zur Bekämpfung phytopathogener Schaderreger wie Bakterien, Pilze, Nematoden und Insekten in verschiedenen Materialien (FAO 2003/2016). Das Verfahren wird wegen der umweltschonenden und rückstandslosen Behandlung des Materials als Alternative zu chemischen Begasungsmitteln eingesetzt (Schröder 1999; McNamara *et al.* 2003; FAO 2003/2016). Ionisierende Strahlung kann dabei entweder durch radioaktiven Zerfall (γ-Strahlung) von Cobalt 60 (Co60) oder Caesium 137 (Cs137) oder durch Beschleunigung von Elektronen in einer Hochenergiebeschleunigungsanlage von 10 MeV (Mega-Elektronen-Volt) bei maximaler Leistung von 150 KW erzeugt werden. Die Behandlung von mit Schaderregern belastetem Material ist über beide Verfahren mit keiner radioaktiven Belastung des Materials verbunden. Das Material wird also nach der Behandlung nicht selbst zur Strahlungsquelle (McNamara *et al.* 2003; siehe auch u.a. <http://de.bgs.eu/>; ISPM 18, FAO 2003/2016). Die Wirkung der Bestrahlung beruht auf (i) direkten Mechanismen durch Schädigung der zellulären DNA (Strangbrüche und mutative Basenveränderung) und (ii) indirekten Prozessen einer Radiolyse des Wassers im Zytoplasma bei gleichzeitiger Freisetzung oxidativ wirksamer Radikale in der Zelle (Jackson *et al.* 1967 wie zitiert in McNamara *et al.* 2003). Breite Anwendung findet eine Behandlung mit ionisierender Strahlung in der Behandlung von Verpackungsholz (siehe ISPM 15) zur Bekämpfung darin enthaltener Insekten (z.B. Asiatischer Laubholzbockkäfer) und Nematoden (Kiefernholznematode) sowie zur Behandlung von Saatgut für die Bekämpfung der darin enthaltenen Pilze (u.a. Schröder 1999). Unter dem Aspekt der Behandlung von Resterde wurde es bisher noch nicht eingesetzt. Es liegen eine Reihe von Studien vor, die eine erfolgreiche Behandlung von in Boden enthaltenen Bakterien, Pilzen und Nematoden mittels ionisierender Strahlung im

Boden belegen (u.a. Evans 1970; Chinnasri *et al.* 1997; McNamara *et al.* 2003). Die Anfälligkeit richtet sich dabei nach der Komplexität des Organismus. Je einfacher dieser strukturiert ist, umso widerstandsfähiger erweist er sich gegen eine Strahlenbehandlung (Chinnasri *et al.* 1997, McNamara *et al.* 2003). Zur Sterilisation von Bakterien wird daher nach McNamara *et al.* (2003) mit 20-25 KGy (Kilogray) die höchste Dosis veranschlagt, gefolgt von Pilzen (10-15 kGy) und Nematoden (5-15 kGy, nach ISPM 18 empfohlene Dosis: 4 kGy). Ein Gray (Gy), entspricht dabei der absorbierten Energiedichte, um in einem Feld ionisierender Strahlung mit konstanter Energieflussdichte die Energie von 1 Joule auf die Masse von 1 kg Energie zu übertragen. Nematodenarten zeigen eine hohe Variation in ihrer Sensitivität gegenüber einer Bestrahlung, so war *G. rostochiensis* wesentlich anfälliger als *H. schachtii* (Townshend 1967). Chinnasri *et al.* (1997) konnten nachweisen, dass eine Dosis von 7,5 kGy den Tod freilebender Juvenilen und adulter Nematoden der Art *Meloidogyne incognita* innerhalb eines Tages bewirkte, während 6,25 kGy den Schlupf der Eier verhinderte und eine Dosis von 4,25 kGy nicht letal war, jedoch die weitere Infektion von Pflanzen durch die behandelten Nematoden herabsetzte. Auch bei der Strahlenbehandlung scheinen zudem feuchte Zysten stärker sensitiv zu reagieren als trockene Zysten (Evans 1970). Die Nematoden sind dabei zumeist auch noch über Tage und Wochen lebensfähig (~40 d; siehe dazu den umfangreichen Review von McNamara *et al.* 2003), können sich aber nur noch vermindert fortpflanzen (Evans *et al.* 1970, Chinnasri *et al.* 1997) und sind damit in ihrer Entwicklungsfähigkeit bis hin zum Abschluss ihres Entwicklungszyklus eingeschränkt (Evans 1970).

## **AP2 - Behandlung mit angereicherten Ozonlösungen/Spaltprodukten aus Kochsalz**

Die Ozonbehandlung wird bereits seit längerer Zeit für Hygienemaßnahmen im Gartenbau und zur Behandlung von Abwasser eingesetzt (Prof. emerit. Wohanka, pers. Mitteilung). Ozon (O<sub>3</sub>) gehört zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS), die in der Lage sind, Schadorganismen ab einer zu bestimmenden, organismenspezifischen Konzentration in deren Umwelt abzutöten. Ozon kann zur Bekämpfung von Pathogenen im Boden als gasförmige Phase (Ebihara *et al.* 2006) oder in Wasser gelöst (u.a. Veronico *et al.* 2017) angewendet werden. Da eine toxische Belastung durch Ozonbegasung auch im abgedeckten Boden hoch ist, empfiehlt sich eine Anwendung von O<sub>3</sub> in wässrigen Lösungen (Fujiwara and Fuji 2002 wie zitiert in Veronico *et al.* 2017). In einer Reihe von Untersuchungen konnte in Böden mit niedrigem Anteil organischer Substanz eine Letalität von Pilzen und freilebenden Nematoden bei einer Ozondosis von 10 ppm nachgewiesen werden (Veronico *et al.* 2017). Für die Behandlung von Resterden mit hohem Anteil organischer Substanz ist allerdings die Absorption großer Teile des Ozons bei der Oxidation des organischen Materials ein erhebliches Problem für die Einstellung der notwendigen Dosis (Dr. Höfer, Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnik, Braunschweig,

pers. Mitteilung). Zudem spielen auch die Temperatur und Bodenart, v.a. der Anteil metallischer, oxidierbarer Verbindungen im Boden eine große Rolle für die Bestimmung der für Zystennematoden aufzuwendenden letalen Dosis. Einer der größten Nachteile der Nutzung von wässrigen Ozonlösungen ist dessen hohe Instabilität und die schnelle Ausgasung des Ozons beim Kontakt mit der Außenluft, dies geschieht innerhalb weniger Minuten. Daher wurde zusätzlich auch die Wirkung von Spaltprodukten von Kochsalz in verschiedenen stark konzentrierten Lösungen im Labormaßstab untersucht. Vor allem Chlordioxid ( $\text{ClO}_2$ ) und Natriumhypochlorit ( $\text{NaClO}$ ) sind dabei als desinfizierend wirkende Verbindungen von Bedeutung. Wirksam sind hier stark oxidativ wirkende Prozesse, die als Freisetzung von reaktiven Cl-Radikalen messbar sind. Chlordioxid bedarf im Gegensatz zu molekularem Chlor einer wesentlich geringeren Wirkkonzentration und Einwirkzeit. Es ist weniger stark korrosiv in Metalltanks und ist verglichen mit Ozon, das eine stärkere oxidative Wirkung als Chlordioxid aufweist, tiefenwirksam, d.h. es wird nicht an der Oberfläche von Partikeln (z. B. Nematodenzysten oder organischen Bodenpartikeln) reduktiv verbraucht. Verglichen mit Ozonlösungen sind Chlordioxidlösungen für bis zu 3 Monate stabil lagerfähig. Als wirksame Konzentrationen zur Desinfektion in wässrigen Lösungen werden 0,5 – 4,0 g/l  $\text{ClO}_2$  in der Praxis genutzt. Natriumhypochlorit ist wesentlich reaktiver als Chlordioxid jedoch äußerst instabil und damit schlecht lagerfähig. Die Verbindung liegt meistens im alkalischen Milieu (pH 11,5 – 12) gemeinsam mit Natronlauge (12 g/l), Natriumchlorid (ca. 140 g/l) und ca. 5 g/l Natriumchlorat sowie geringen Mengen an Bromat vor (gemäß der Anwendungsnorm DIN ISO EN 909) und besitzt damit trotz hohen Wirkungsgrades bedingt durch bis zu 170 g/l reaktiv wirksamen Chlor ein extrem hohes Abwassergefährdungspotential.

## **AP2 – Anaerobe Bodendesinfektion (ASD)**

Aktuelle Studien belegen, dass die Schaffung anaerober Bedingungen in Böden (*anaerobic soil disinfestation*, ASD; Blok *et al.* 2000; van Overbeek *et al.* 2014; Stremińska *et al.* 2014), die daraus resultierende Biofumigation (Lord *et al.* 2011; Matthiessen & Kirkegaard 2006) sowie die Bodenbegasung (Potocek 1991) ein geeignetes Mittel zur Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden und anderen Phytopathogenen darstellt. Die Schaffung anaerober Bedingungen im Rahmen der ASD erfolgt dabei durch die Einarbeitung organischer Substanz (z.B. Senfsaatmehl, Grasschnitt oder standardisierte, kommerziell verfügbare Produkte) und deren mikrobiellen Abbau unter luftdichter Abdeckung des Bodenmaterials. Ursächlich für die phytosanitäre Wirkung des Verfahrens ist die Bildung biotoxischer und nematizid wirkender Stoffe u.a. Cyanate, der  $\text{CO}_2$ -Anstieg und die  $\text{NH}_3$ -Akkumulation als Nebenprodukte des anaeroben Metabolismus zahlreicher Bakterien (Runia *et al.* 2012), sowie eine Reihe von volatilen Fettsäuren (Davis *et al.* 1997), die durch die eingesetzten Mikroorganismen bei gleichzeitiger pH-Wertabsenkung der Resterde freigesetzt werden

(Streminska *et al.* 2014). Für *G. pallida* wurden durch Anwendung dieser Methode Rückgänge der Individuendichten um 99,4 % in Mesokosmen erreicht (van Overbeek *et al.* 2014). Bei dem von der ASD abgeleiteten Verfahren der Biofumigation wird zerkleinertes Material von Zwischenfrüchten im Zuckerrübenanbau vornehmlich aus der Gattung *Brassica* ssp. in den Boden eingearbeitet. Das Prinzip basiert identisch zur ASD ebenfalls auf der Freisetzung biologisch aktiver Stoffe. Durch hydrolytische Spaltung von Glucosinolaten unter Einwirkung des Enzyms Myrosinase aus dem pflanzlichen Substrat selbst entstehen Isothiocyanate, die toxisch auf bodenbürtige Pflanzenpathogene wirken können (Angus *et al.* 1994; Buskov *et al.* 2002; Lazzeri *et al.* 2004) aber leicht flüchtig sind. Der mikrobielle Abbau der organischen Masse wirkt hier natürlich ebenfalls. So wurden in einem Gewächshausversuch durch die Einarbeitung von Blattmaterial dreier *B. juncea* (brauner Senf) *cultivars* (Nemfix, Fumus und ISCI99) über 95 % der *G. pallida* Zysten abgetötet (Lord *et al.* 2011). Die Wirksamkeit dieses Verfahrens erhöht sich ebenfalls bei Abdeckung des Bodens mit Polyethylenfolie (Lord *et al.* 2011).

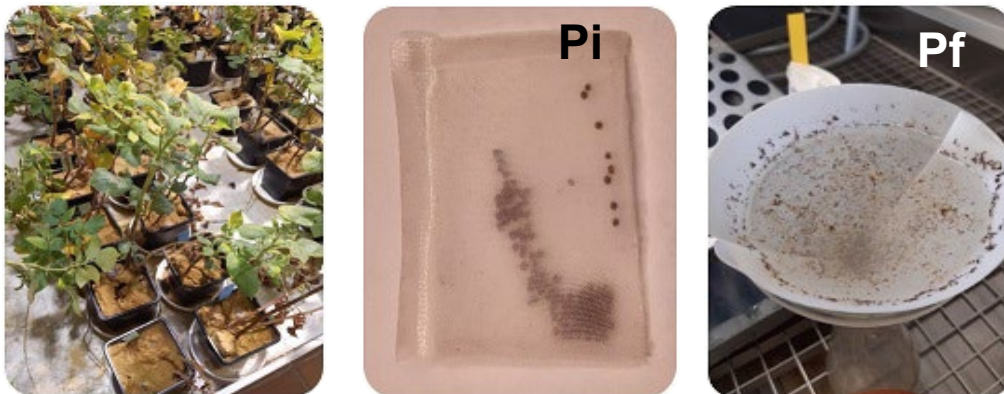
### 3 Material und Methoden

#### AP1 – Biotest

Zur Prüfung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit wurden in allen Behandlungsversuchen als Standardverfahren Biotests mit anschließender Auswertung der Reproduktionsrate ( $P_f/P_i$ ) adulter Weibchen durchgeführt. Die Testung erfolgte in der Quarantänestation GWH15 am Standort des JKI Braunschweig (Kartoffelzystennematoden, *potato cyst nematodes*, PCN) bzw. im Gewächshaus des JKI am externen Standort Elsdorf (Rübenzystennematoden, *H. schachtii*). Der Biotest für PCN wurde wie in EPPO PM 7/40 (5) (EPPO 2022) beschrieben nach der Methode von Kort *et al.* (1977) durchgeführt, jedoch wurden an Stelle bereits geschlüpfter Juvenile (J2-Stadium) komplette Zysten verwendet. Zur Anwendung kamen Zysten aus den Populationen *G. pallida* Pathotyp 2 „Kalle“ und *G. rostochiensis* Pathotyp 5 „Hamerz“. Die Vermehrung beider Arten wurde in Einzeltöpfen an der gegen alle *Globodera*-Populationen vollanfälligen Kartoffelsorte cv. 'Desiree' (Agropa GmbH, Brunnen, DE) über einen kompletten Entwicklungszeitraum der Kartoffel (~100 Tage) durchgeführt. Die Knollen wurden vorgekeimt unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur (RT) und wurden teils geteilt anschließend in 9\*9,5 cm große Plastiktöpfe gepflanzt, die mit nematoden- und Rohlöß gefüllt waren. Der Lehm wurde mittels 1,5 g/kg Langzeitdünger (Osmocote®, Scott's Miracle Gro, Marysville, OH/US) vorbereitet. Nematodenzysten wurden in 1x1cm großen Gazebeuteln mit einer Maschenweite von 100 µm nahe der Knolle eingesetzt (**Abb. 1**). Die Pflanzen im Biotest wurden in klimatisierten Gewächshauskabinen bei 16 h Licht und 21° C sowie 8 h Dunkelheit bei einer Temperatur von 16° C kultiviert. Die Pflanzen wurden nach Bedarf gegossen und die Töpfe wurden in separate Untersetzter 15 cm voneinander entfernt



platziert, um einen Transfer der beweglichen Juvenilenstadien und adulten Männchen zwischen den Töpfen auszuschließen. Nach Erreichen einer mittleren Tagestemperatursumme von 1.800 K wurden die Tests beendet, die Sprosstiele der Kartoffel bodennah abgeschnitten und die Töpfe für 2 Wochen abgetrocknet, um ein Ausreifen der adulten Weibchen zu gewährleisten. Die außerhalb des Gazebeutels neu gebildeten Zysten (=adulten Weibchen) der PCN wurden anschließend mittels Ausspülen über ein Sieb (Maschenweite 200 µm; Seinhorst 1964) vom Rohlöß getrennt. Die Auszählung der neu gebildeten Zysten erfolgte am Stereomikroskop (M8, Wild Heerbrugg, DE).



**Abbildung 1:** Biotest angesetzt in Einzelpflanzentöpfen (**links**); Gazebeutel mit 50 (=P<sub>i</sub>) unbehandelten Nematodenzysten als Kontrolle (**Mitte**) und über Siebtrichter vom Rohlößboden befreite Zysten (=P<sub>f</sub>) nach Abschluss des Biotests (**rechts**).

Der Biotest zur Prüfung der Vitalität von *H. schachtii* Pathotyp Schach0 „MS“ beruht auf dem Nachweis der Neubildung von Zysten. Da als Inokulum für den Biotest Zysten aus den laufenden Versuchen verwendet werden sollten, wurde die Sensitivität in Vorversuchen dieses Verfahrens bei Zugabe von 1, 2, 4, 10 und 20 Zysten pro Topf (400 ml) mit 10 Wiederholungen getestet. Hochanfällige Sorten von Raps (*Brassica napus*) und z.T. parallel Ölrettich (*Raphanus sativus* cv. „Siletina“) wurden als Testpflanzen verwendet. Der Versuch lief vollständig randomisiert im Gewächshaus bei 20±5°C und 12 h Licht und wurde bei Erreichen von 390 Tagesgraden (>10°C) nach 6 Wochen abgebrochen. Als Substrat wurde Rohlöß (identisch zum in Braunschweig verwendeten Rohlöß) mit Zugabe von Dünger (Osmocote® 3-4M 3g/kg) eingesetzt. Alle Töpfe wurden vor der Zugabe der Nematodenzysten mit dem Fungizid Previcur® (1,5 ml/l, bestehend aus 530 g/l Propamocarb und 310 g/l Fosetyl) behandelt. Für die Behandlungsversuche wurden zumeist erhöhte Zahlen von 80 Zysten ebenfalls eingeschweißt in Gazebeuteln analog zum PCN-Biotest verwendet. Um den korrekten Abbruchzeitpunkt des Biotests zu bestimmen, wurden separate Töpfe mit Raps mit 80 unbehandelten Zysten belegt und ab Erreichen der 390 Tagesgrade die Neubildung von Zysten (absterbende Weibchen) in Relation zur initialen Dichte von 80 Zysten gesetzt. Als Richtwert musste hierbei ein P<sub>f</sub>/P<sub>i</sub>-Wert von > 2 erreicht sein, um den Biotest abzubrechen. Analog zum Biotest mit beiden *Globodera*-Arten wurde

der Test durch Abschneiden der Sprosssteile und lichtdichtes Abdecken der Töpfe beendet. Im Anschluss hieran wurden die Töpfe mit den möglicherweise neu gebildeten Zysten 14 Tage gelagert, um ein Ausreifen von Eiern zu ermöglichen. Zur Auswertung wurden Gazebeutel aus dem Substrat entfernt und die Zysten vom Rohlöß über ein kombiniertes Siebverfahren (1000 µm + 100 µm) und anschließende Zentrifugation extrahiert (Hallmann *et al.* 2021). Eier und Juvenile wurden aus den Zysten mittels eines Zystenhomogenisators befreit und gezählt. Juvenile und Eier auf 100 g Boden bezogen wurden am Stereomikroskop (50x Vergrößerung) ausgezählt. Reproduktionsraten, dargestellt als  $P_f$  zu  $P_i$ -Verhältnis, wurden berechnet auf Grundlage der Untersuchung des Zysteninhalts (Juvenile + Eier) von 50 unbehandelten Zysten ( $P_i$  Eingangswert) vor Beginn des Biotests.

### **AP1 – Schlupftest**

Der Schlupftest wurde für PCN nach der in Norwegen angewandten Methode (PM 7/40 (5), Appendix 11 (A) EPPO 2022b) durchgeführt, wobei 1.000 ml Leitungswasser über eine 3 Wochen in Sand kultivierte vollanfällige Kartoffelpflanze cv. 'Desiree' (Topfvolumen 500 ml) gegeben werden. Nach Abfiltrierung der organischen Grobbestandteile wird das aus dem Wurzelraum der Pflanze über Nacht herausgelöste Wasser, mit den darin enthaltenen Kartoffel-Wurzeldiffusaten (PRD) in Plastikschraubflaschen (500 ml) abgefüllt und bei -20°C bis zur Verwendung im Schlupftest gelagert. 20 zufällig dem Gazebeutel entnommene, behandelte Zysten (bzw. unbehandelte Kontrollen) werden in 1 ml PRD bei Raumtemperatur in einem 10 ml-Schnappdeckelglas mit perforiertem Deckel inkubiert. Die Anzahl beweglicher geschlüpfter Juvenile J2 wird im Wochenturnus unter einem Stereomikroskop bei 50x Vergrößerung gezählt und anschließend wird das PRD mit den geschlüpften Tieren durch frisches Diffusat ersetzt. Alternativ zu PRD wurde Pikrolonsäure in Konzentrationen zwischen 0,03125 mmol – 0,5 mmol zur Schlupfinduktion genutzt – ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auszählung erfolgte im Wochenturnus über einen Gesamtzeitraum von 7 Wochen. Der Schlupftest für Rübenzystennematoden erfolgte ebenfalls für 20 zufällig entnommene Zysten nach Inkubation in 5 mmol ZnCl<sub>2</sub>-Lösung. Diese künstliche Schlupfinduktionsreagenz wird standardmäßig seit den 1960er Jahren verwendet (Clark & Shepherd 1964). Juvenile werden über ein 20 µm Sieb aus dem Schlupfansatz separiert und unter dem Stereomikroskop (Leica MZ APO, Wetzlar, DE) bei 50x Vergrößerung gezählt. Zum Abschluss der Untersuchungen werden die verbleibenden Zysten homogenisiert und deren inaktiver Inhalt an Eiern und J2 ebenfalls gezählt und visuell auf ihren Zustand bewertet.

## AP1 – Färbemethoden

Nach Lösen der Farbstoffe gemäß Herstellerangabe (MELDOLA'S BLUE, Carbosynth, Compton, Berkshire, UK) bzw. unter Nutzung bereits fertiger Lösungen von Nile Blue A (Appllichem, DE) wurden die homogenisierten PCN-Zysten direkt für 24 h und im Vergleich dazu für 48 h bei Raumtemperatur auf dem Mikroskop-Objektträger in den 0,025% v/v Farbstofflösungen inkubiert. Nach Ablauf der Zeitspanne wurden die Farbstoffe mit klarem Leitungswasser und Filterpapier entfernt und die Nematoden unter 250x Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop bewertet. Es wurden hitzebehandelte (80°C, 2 h im Trockenschrank) und unbehandelte Zysten untersucht.

## AP1 – Bestimmung Trehalosegehalt

Eine Messung des Trehalosegehalts erfolgt indirekt durch Messung des Reduktionsäquivalenten NADPH/H<sup>+</sup>. Nach Inkubation der PCN-Zysten für 2 Tage in 200 µl MilliQ-Wasser bis zum Vollsaugen, wurden sie anschließend für 30 min auf 99°C erhitzt, um die Trehalose aus den Zellmembranen freizusetzen. Die dabei aus der Kuticula bzw. Eihülle freigesetzte Trehalose wurde im Anschluss mittels Reagenzien eines Analyse-Kits (K-Treh, Megazyme Ltd., Wicklow, IE) durch das Enzym Trehalase in zwei Glucosemoleküle gespalten. Diese Mono-Saccharide werden nach Aktivierung mittels ATP zu Glucose-6-Phosphat oxidiert und damit in der Lage versetzt, das Reduktionsäquivalent Nikotinamidphosphat (NADP<sup>+</sup>) durch Protonenübertragung in NADPH/H<sup>+</sup> zu reduzieren. Das entstehende NADPH/H<sup>+</sup> kann photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  gemessen werden (Photometer: Multiskan Ascent®, Thermo Electron Corporation, Vantaa, FI) und die Messwerte können anhand einer Standardkurve basierend auf Messungen definierter Zystenzahlen zur absoluten Quantifizierung genutzt werden (u.a. Beniers et al. 2014, komprimiert beschrieben in PM 7/40(4) Appendix 11, EPPO 2017). Für die Gehaltsbestimmung der PCN wurden 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Nematodenzysten von *G. pallida* verwendet. Die gleiche Anzahl von Zysten desselben Vermehrungszyklus' wurde bei 80° C für 2 Stunden im Wasserbad vorbehandelt und für zwei Wochen abgetötet bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Die behandelten Zysten dienten als Negativkontrollen in den Versuchen zur Lebensfähigkeitsbewertung und sollten daher nahezu keine Trehalose besitzen. Nicht im EPPO-Standard beschrieben, jedoch in der Arbeit von Beniers et al. als Voraussetzung zur quantitativen Unterscheidung der extrahierten Trehalose-Extrakte notwendig, wurden zum einen die Standardlösungen des K-Treh Kits im Verhältnis 1:3 (2 Teile Verdünnungspuffer zu einem Teil Trehalose Stamm-Lösung) und alle Zystenextrakte 1:10 verdünnt. Damit wird erreicht, dass eine Übersättigung des Reaktionsansatzes vermieden wird und messbare Unterschiede zwischen den Extrakten aus 1-10 Zysten zu verzeichnen sein sollten.

## AP1 – DNA-Blocking mittels Propidium-Monoazid (PMA) und anschließende RealTime-PCR Quantifizierung

Die Publikation von Christoforou et al. (2014) beschreibt den Einsatz von PMA zur Bindung zellfreier DNA ausschließlich für einen kleinen Untersuchungsansatz von 1 – 600 Nematodeneiern, was dem Inhalt von 1 – 2 Zysten entspricht. In unserem Ansatz wurden 20 Nematodenzysten von *G. pallida* zur Extraktion der enthaltenen Eier 2 Tage in Leitungswasser eingeweicht. Anschließend wurden die Zysten mittels Skalpell geöffnet und definierte Mengen von Eiern bzw. von im Schlupf befindlichen J2 (1, 10, 25, 50, 150, 300 und 600) für die Versuchsdurchführung separiert. 1 mg PMA wurde in 1,96 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst um eine 1 mmol PMA-Arbeitslösung herzustellen. Die Lösung wurde in einem lichtundurchlässigen Eppendorf-Gefäß bei -20°C gelagert. Zur DNA-Bindung wurden 10 µl der PMA-Arbeitslösung pro Ei-Ansatz zugegeben, für 30 min im Dunklen inkubiert und anschließend 30 min einer Lichtintensität >650 W im PMA Lite LED Photolysis Device (Biotium, Inc., Fremont, CA/US; **Abb. 2**) zur Fixierung der DNA-PMA-Bindung unterzogen. Aus den behandelten Eiszuspensionen wurde nach Entfernen der PMA-Lösung mittels QIAamp Micro-Kit (Qiagen, Hilden, DE) die genomische DNA extrahiert und anschließend mittels *G. pallida*/*G. rostochiensis* spezifischer RealTime-PCR gemäß Protokoll im EPPO-Standard amplifiziert und quantifiziert (Gamel et al. 2017, EPPO PM 7/40(4)) quantifiziert. Als Mastermix wurde der Perfecta Tough Mix (Qanta, Beverly MA/US) genutzt, wobei die Sonden noch mit den Farbstoffen FAM/BHQ1 für die Sonde  $\mu$ satGR-P zur Detektion von *G. rostochiensis* bzw. JOE/BHQ2 für die Sonde  $\mu$ satGP-P zum Nachweis von *G. pallida* markiert waren. Die RealTime-PCR wurde mittels des Cyclers qTower3® (Analytik Jena, AJ, Jena, DE) durchgeführt. Eine Standardkurve zur Messung der sogenannten Threshold cycles wurde durch 3-fach replizierte Amplifikation der verschiedenen Mengen an Eiern/J2 erstellt. Damit ist es möglich, eine absolute Quantifizierung zur direkten Ermittlung des Gehaltes lebender Eier/J2 in jeweils 3-fach replizierten mittels Mikrowellenerhitzung bei 80°C für 5 min vorbehandelten Einzelzysten + PMA, unbehandelten Kontrollen ohne PMA und PMA Kontrollen aus Einzelzysten vorzunehmen.



**Abbildung 2:** Im Projekt beschaffte PMA Lite Photolysis Device als luftgekühltes Gerät für die Fixierung der DNA-PMA-Bindung zur Entfernung zellfreier DNA vor der anschließenden RealTime-PCR Quantifizierung der intrazellulären DNA der Eier/J2.

## **AP2 - Vermehrung von Referenzmaterial für die Prüfung der Wirksamkeit der Behandlungsverfahren**

Die Vermehrung der für alle Wirksamkeitsbewertungen der verschiedenen Behandlungsverfahren genutzten Nematodenpopulationen, *G. pallida* Pathotyp 2 "Kalle" und *G. rostochiensis* Pathotyp 5 "Harmerz" wurde identisch zur oben beschriebenen Methode im Biotest (s.o.) durchgeführt. Die Zysten waren für Behandlungsvorgänge nach Brechung der Diapause (vertieften Ruhephase) durch Trocknung und anschließender Lagerung im Kühlschrank bei 4°C für einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten nutzbar.

Rübenzystennematoden der Art *H. schachtii* wurden nach vorausgegangener Schlupfinduktion mit 5 mmol ZnCl<sub>2</sub>-Lösung als Juvenile im 2. Entwicklungsstadium an vollanfälligen Rapsorten vermehrt. Die gebildeten Zysten wurden nach 2 direkt aufeinanderfolgenden Generationszyklen bei 20°C (etwa 2 Monate) entnommen und wie oben beschrieben von der anhaftenden Erde separiert. In der Regel wurden pro Versuchsreplikat je 50 PCN-Zysten/Nematodenart bzw. 80 Zysten des Rübenzystennematoden, verschweißt in 1x1 cm Gazebeuteln (Maschenweite 100 µm), verwendet.

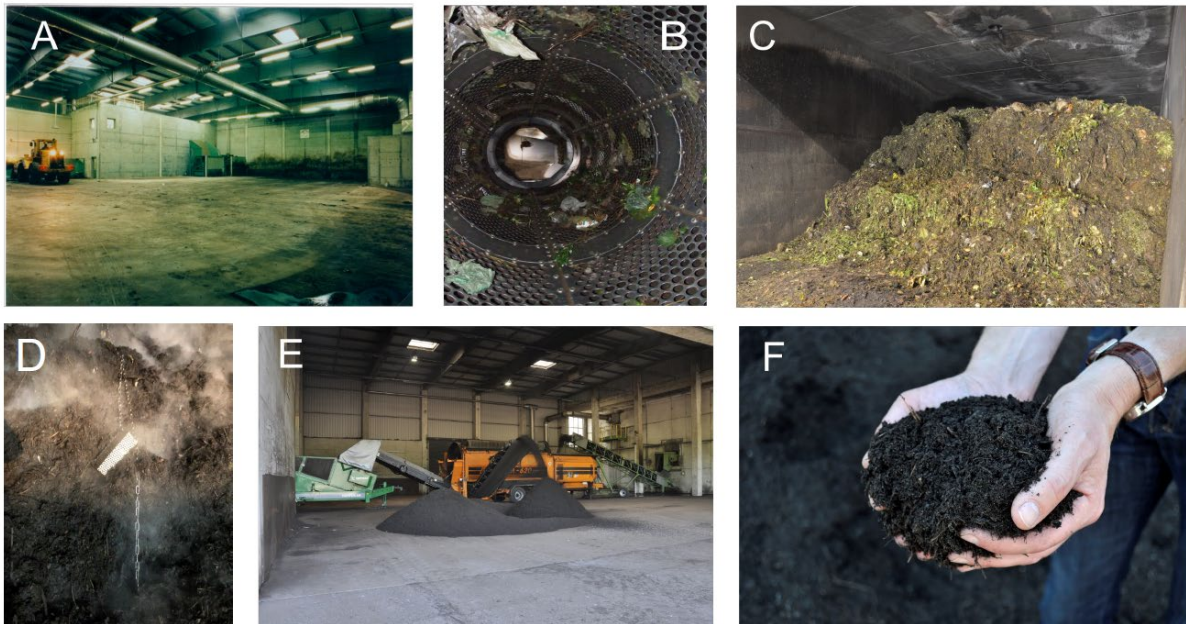
## **AP2 – Inundation, anaerobe Überstauung**

Im 0,5 l Mesokosmen-Ansatz wurden verschiedene Einflussfaktoren zur Bewertung der Wirksamkeit für die Behandlung von Zystennematoden im Labormaßstab untersucht. Jeweils 20 Zysten von *G. pallida* in eingeschweißten Gazebeuteln wurden nach zuvor erfolgter zweitägiger Lagerung in Leitungswasser in die zu behandelnden Böden eingebettet. Dabei wurden die Behandlungseffekte der (i) Bodenart (Sand mit Partikelgrößen > 0,2 mm gegenüber lehmigem Schluff mit Partikelgrößen zwischen 0,6 µm und 2 mm), des (ii) pH-Wertes, sowie (iii) verschiedener organischer Bestandteile der Lösung (Zucker, Kartoffelrückstände, Milchsäure (=Lactat)) und (iv) Luftabschluss auf in der Lösung untergetauchte Zysten unabhängig voneinander untersucht. Zur Testung des pH-Wert-Einflusses wurden verschieden starke Laugen und deren Verdünnungen (KOH, Kalkmilch CaOH<sub>2</sub>) mit durch konzentrierte Schwefelsäure voreingestellten basischem pH-Wert im Bereich von pH 7 bis pH 11,5 verwendet, um den in der Praxis zu beobachtenden Effekt (s.u.) nachzustellen. Die beiden verschiedenen Bodenarten wurden dazu in einem Volumen von 150 ml in eine verschließbare Glasflasche gegeben und mit Leitungswasser bzw. basischen Lösungen für einen Zeitraum von 24 h überstaut. Im gleichen Umfang und Vorgehen wurden den beiden Böden Suspensionen mit verschiedenen organischen

Bestandteilen hinzugefügt bzw. der Effekt des Sauerstoffabschlusses (Untersuchungszeitraum 7 d) mittels luftdicht verschlossener gegenüber unverschlossenen Flaschen getestet. Den größten Untersuchungsumfang zur Inundation machten Praxisversuche in den Stapelteichen mit vorgeschaltetem Bruknerbecken (**Abb. 3**) der Zuckerfabrik in Uelzen (Nordzucker AG) aus. Die wichtigste praktische Versuchsfrage auf Empfehlung der Landwirtschaftskammer Niedersachsen war die Bewertung der Behandlungssicherheit der Anlagen zur wirksamen Bekämpfung von Zystennematoden. Hierbei fanden insbesondere verschiedene Zeitpunkte nach Einleitung des mit Rübenrückständen versehenen und resterdehaltigen Rübenwaschwassers in die Stapelteiche Berücksichtigung. Die Untersuchungen wurden während der Verarbeitungskampagnen 2018/2019 und 2019/2020 durchgeführt. Die Anlage zur phytosanitären Resterdebehandlung in Uelzen besteht aus zwei sogenannten Bruknerbecken, die Resterde und Rübenrückstände von einem großen Teil des Wassers abscheiden, um den verbliebenen Schlamm anschließend in einen der 5 vorhandenen Stapelteiche zu pumpen. In den Stapelteichen verbleibt der Schlamm für mindestens 90 Tage, bevor er nach Abpumpen und Filtrieren des verbliebenen Wassers auf nicht für den Kartoffelanbau genutzte Pachtflächen verbracht wird. Beide Bruknerbecken und drei Stapelteiche mit einem Fassungsvermögen zwischen 10.000 und 33.000 m<sup>3</sup> Resterde wurden im Rahmen der Untersuchungen vor Ort mit von uns gesichert eingebrachten Zysten der Arten *G. pallida* und *H. schachtii* genutzt. Zur Untersuchung des kompletten Durchlaufs der Resterde im Bruknerbecken wurden die nach Art getrennten, 2x2 cm großen verschweißten PE-Gazebeutel (Maschenweite 100 µm) mit Nematodenzysten in einem Stahlkäfig (Maschenweite 1 cm) für 1-3 Tage an einer Kette rotierend mittig in das Bruknerbecken eingeführt (**Abb. 3a**). Der Käfig wurde so angebracht, dass sich der Inhalt für die gesamte Dauer der Exposition unter der Schlammoberfläche befand. Anschließend wurden die somit vorbehandelten Zysten für verschiedene Zeiträume im Stapelteich unter anaeroben Bedingungen (gemessen mittels Sauerstoffsonde) bei ca. 6°C weiter behandelt. Um ein Entweichen der Nematoden in die Umwelt zu vermeiden, wurden die Zysten (i), in verschlossenen Gazebeuteln belassen, diese (ii) in jeweils 5 – 10 Edelstahlbehälter (Schwimmbadfilter, Maschenweite 200 µm) pro Untersuchungszeitpunkt an einem (iii) Stahlseil fest verschraubt in die Teiche eingebracht (**Abb. 3b**). Für eine einheitliche Tiefenführung der Stahlbehälter sorgte eine 1 m lange Stahlkette, mit der die Stahlbehälter an einem Schwimmer (luftgefüllter 10-Liter Kanister) befestigt waren. Die Schwimmer mit den Stahlbehältern waren in gleichmäßigen Abständen an einem Stahlseil fixiert, das quer über den Stapelteich gelegt wurde. Die verschiedenen Zeitpunkte der Probenentnahme mit anschließend im Labor bzw. Gewächshaus erfolgter Lebens- und

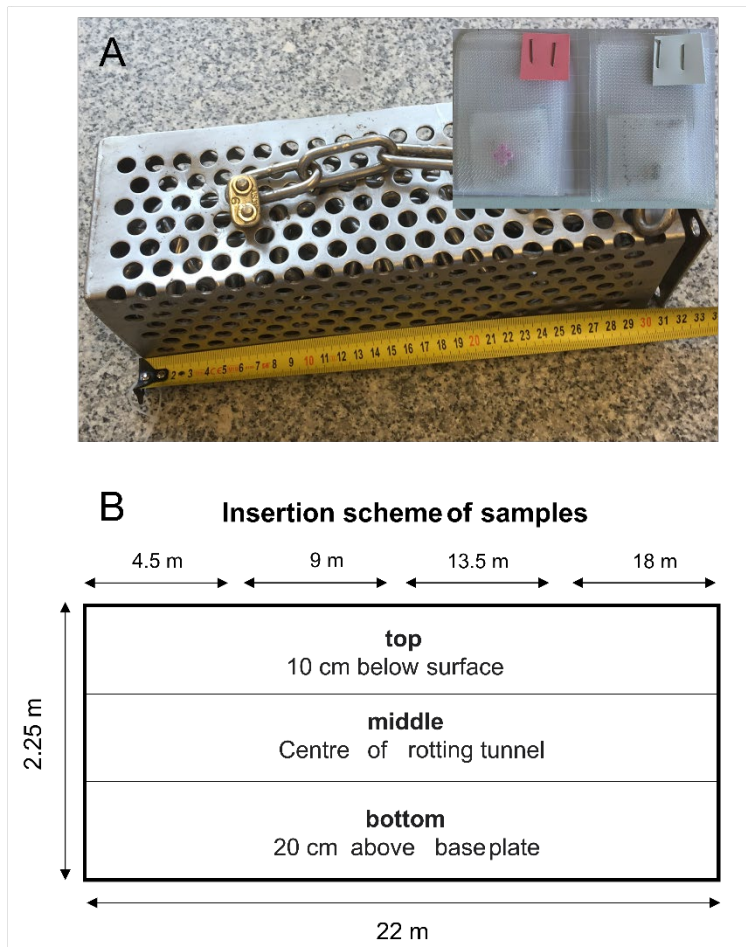


Prozessschritt erfolgt die Abscheidung nicht verwertbarer Bestandteile des Bioabfalls (Plastik, Metall) mit daran anschließender mechanischer Zerkleinerung, darauf folgt die Fermentation mit gekoppelter Verwertung der Kohlenwasserstoffgase (Methan, Propan) als Biogas zur Stromerzeugung. Das sich absetzende Durchsickerungswasser (Perkolat = Pflanzenauszüge und Mikroorganismen) wird mit den Vergärungsrückständen im nächsten Schritt belüftet und in Rottetunnel für die Kompostierung verbracht. Diese werden im Lauf von etwa 10 Tagen zweifach umgewälzt, um eine sichere Durchlüftung ohne anaerobe (blinde) Flecken zu gewährleisten. Abschließend erfolgt eine Siebung des abgebauten Materials (10 mm Siebmaschen) sowie die Endkontrolle auf nicht abbaubare Rückstände. In modernen Anlagen erfolgen Fermentation und Kompostierung gemeinsam in sogenannten Hybridfermentoren (Hersteller Eggersmann Receycling Technology, Bad Oeynhausen, DE). Nach Abschluss des Fermentationsprozesses vor Beginn der aeroben Kompostierung besteht der teilabgebaute Bioabfall aus 75% organischem Festabfall, 5% Grobabfall (verholzte Reste, Äste), 10% Perkolat und 10% zusätzlichem strukturbildenden Material (länger Zweige, Äste). Letzteres wird frisch zugegeben, um eine Durchlüftung der Kompostmieten im Rottetunnel zu ermöglichen. Während im 15 Tage andauernden Fermentationsprozess Außenluft ( $N_2$ ,  $O_2$ ) gezielt entfernt wird und  $CO_2$  in den Fermenter gepresst wird, wird im Kompostierungsprozess gezielt Außenluft in die Anlage gepresst.



**Abbildung 4:** Vorbehandlungs- und Vergärungsprozesse (A-C) mit anschließender Kompostierung (D-F) in der Kompostieranlage Bützberg: **A)** Beschickungshalle, **B)** Siebung und Abtrennung von Fremdstoffen, **C)** Fermentation/ Vergärung, **D)** Kompostierungsprozess im Hybridfermenter, **E)** Siebung, **F)** fertiges Kompostprodukt. (Quelle: Schumann *et al.* 2023)





**Abbildung 5:** (A) Perforierter Edelstahlbehälter zur Einbringung der Referenzsysteme (rechts oben) getrennt nach den verschiedenen Arten *G. pallida*, *G. rostochiensis* und *H. schachtii* (nicht abgebildet). (B) Schematische Darstellung einer Kompostmiete im Rottetunnel bestehend aus drei vertikalen Schichten. Behälter gefüllt mit Bioabfall und Referenzsystemen wurden in alle 3 vertikalen Schichten an 4 horizontalen Punkten in die Miete eingebracht. (Quelle: Schumann *et al.* 2023)

Für die experimentellen Untersuchungen wurden je 50 Referenzsysteme der drei Nematodenarten eingeschweißt in Gazebeutel (Maschenweite 100 µm) bestehend aus Polyethylen (nicht abbaubar) durch einen Mitarbeiter der Fa. Planco-tec Analytic and Consulting (Neu-Eichenberg, DE) gemeinsam mit abzubauenem Substrat in perforierte Metallbehälter gegeben und in die verschiedenen Prozessphasen der Verarbeitung von Bioabfall eingebracht (Übersicht in **Abb. 5**). Insgesamt wurden drei zeitlich getrennte Untersuchungen während verschiedener Prozesse in der Anlage durchgeführt. Zwei Untersuchungen (Herbst 2020 und Winter 2021) wurden ausschließlich in der Kompostierung durchgeführt, wobei im ersten Versuch die Proben mit dem Material gemeinsam rotiert und in Versuch 2 nach Materialrotation im Rottetunnel wieder an der gleichen Position (horizontal x vertikal) eingesetzt wurden. Dabei sollte der Effekt möglicher unbehandelter (blinder) Flecken im Gegensatz zur Materialrotation verglichen werden. Im dritten Versuch (Sommer 2021) wurden Proben jeweils separat in Fermentation und

Kompostierung sowie als Replikat auch im Gesamtprozess durch die Anlagen geleitet. Bei allen Prozessen wurden kontinuierlich Temperaturlaufzeichnungen (mittels Gemini Data-Logger) durchgeführt und anschließend wurden Aliquots der Zysten im Schlupf- und Biotest auf ihre Lebens- und Entwicklungsfähigkeit untersucht.

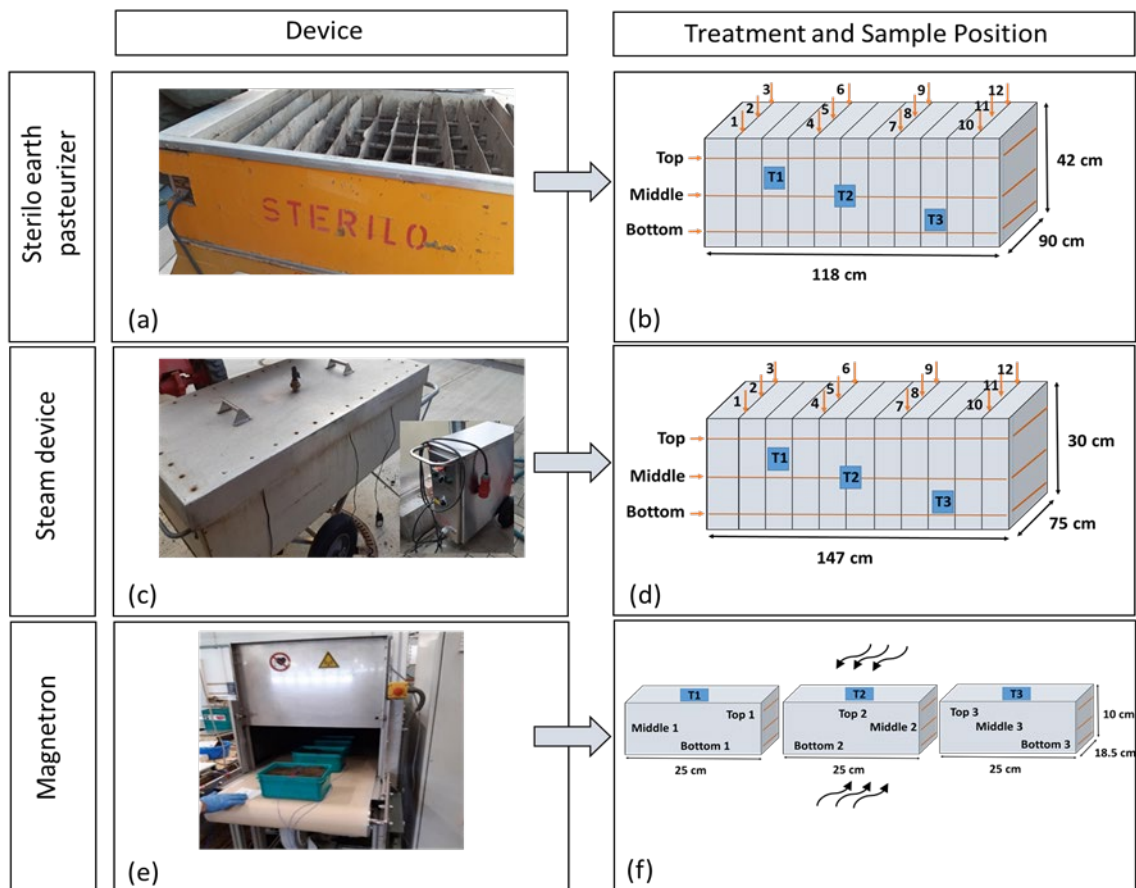
## **AP2 – Thermische Behandlungsverfahren**

Die Behandlungswirkung von **Mikrowellenstrahlung** zur Bekämpfung von Zystennematoden wurde im Labor- und Praxismaßstab untersucht. In Kooperation mit dem Unterauftragnehmer im Projekt, Fa. Fricke und Mallah GmbH (Peine, DE) wurde in einem ersten Versuchsansatz die Minimaldosis (Leistung, Temperatur + Zeitdauer) zur erfolgreichen Nematodenabtötung mittels einer modifizierten Haushaltsmikrowelle (MKO; 1x1,0 kW), die eine konstante Mikrowellenstrahlungsabdeckung über die komplette Bodenplatte ermöglicht, ermittelt. Zudem erlaubte dieser Aufbau den Anschluss eines nicht-metallischen Temperatursensors (TS2, Weidmann Technologies) in Verbindung zu einer Schnittstelle zur Glasfaser-Signalaufbereitung (OEM, Optocon AG, Dresden, DE) für eine Computer-Aufzeichnung des Temperaturverlaufs während der Mikrowellen-Behandlung direkt in der Resterde. Es wurden der Leistungsbereich zwischen 100 und 1000 W, sowie Temperaturen von 60°C-100°C, für Zeitspannen zwischen 30 sec und 20 min nach Erreichen der Soll-Temperatur in ihrer Behandlungswirkung auf Zysten der Zielart *G. pallida* untersucht. Modifiziert wurde zudem die Bodenfeuchte der zusammen mit den Zysten erhitzten Resterde (zweistufig; 16%, 23% Bodenfeuchte), um den Effekt zu erwartender Resterden direkt aus der Trockenreinigung (Bürstung) bzw. mit feuchten Verarbeitungsrückständen der Kartoffel zu simulieren. Die anschließenden praxisnahen Untersuchungen wurden im Mikrowellenbandtunnel (Magnetron) direkt beim Unterauftragnehmer Fricke und Mallah GmbH in Peine durchgeführt. Derartige Anlagen werden bereits zur Hitzesterilisation u.a. in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Die Mikrowellenleistung des Gerätes betrug max. 2450 Mhz bei einer Leistung von 12 kW. Die Magnetronen zur Mikrowellenerzeugung sitzen dabei über einem 1,9 m langen, temperaturbeständigen Laufband (**Abb. 6**) zur Beförderung der mit Resterde und den darin eingebetteten Referenzzysten (Gazebeutel, 80 Zysten *G. pallida*) befüllten Plastikboxen (Fassungsvolumen 3 l, Größe 18,5 cm x 11,5 cm x 25 cm). Die Tunnelanlage ermöglicht über eine versetzte Anordnung der mikrowellenerzeugenden Magnetronen eine kontinuierliche Bestrahlung über die gesamte Bandfläche während der Behandlung. Die Zysten wurden zur Praxissimulation in verschiedenen Tiefen von je 1 cm, 5 cm und 10 cm eingebettet und der Temperaturverlauf wurde mittels jeweils eines Temperatursensors pro Replikat/Box (TS2) vergleichbar zum Labormaßstab überwacht. Als Behandlungstemperatur wurde (resultierend aus den Vorversuchen) 80°C gewählt, wobei nach Erreichen der Soll-Temperatur verschieden lange Behandlungszeiten von 15 sec, 30 sec, 60 sec, 90 sec und 5

min auf die Nematodenzysten einwirkten. Es wurden jeweils 3 Replikate pro Zeitintervall gleichzeitig behandelt.

Eine **Trockenerhitzung** ohne Wasserdampf wurde mittels des Erd-Pasteurierungsgerätes STERILO (Fa. Harter, Schenkenzell, DE) untersucht (**Abb. 6 a/b**). Das Gerät ist mit 0,5 m<sup>3</sup> Fassungsvermögen Boden für den Praxiseinsatz in der Kartoffelverarbeitung nur bedingt geeignet. STERILO arbeitet mittels beheizbarer Platten als Direkterhitzer im Temperaturbereich zwischen 70°C und 100°C. Das Gerät wurde mit 42 cm Erde bis zur Oberkante befüllt und 12 Gazebeutel mit jeweils 80 Zysten wurden wiederum in drei verschiedenen Tiefen (10 cm, 25 cm, 40 cm) entlang der einzelnen Platten verteilt in die Resterde eingebettet. Die Temperaturüberwachung im Minutenabstand war durch Datenlogger (testo® 175-T3) in verschiedenen Tiefen gegeben. Als Behandlungstemperatur wurden ebenfalls 80°C für einen Zeitraum von 3 h zur gleichmäßigen Durchhitzung der Resterde über das Gerät eingestellt. Der Energieverbrauch wurde mittels Stromzähler aufgezeichnet. Nach Abkühlung über Nacht wurden die behandelten Zysten entnommen und im Schlupf-/Biotest auf ihre Lebens- und Entwicklungsfähigkeit untersucht.

Die **Bodendämpfung** durch Einleitung von Wasserdampf mit einem Dampfdruck von 2,5 bar wurde mittels eines Dämpfungsgerätes (Fa. Gebhardt Anlagentechnik, Herbholzheim, DE), wie es üblicherweise im Gartenbau verwendet wird, durchgeführt. Dieses Gerät besitzt ebenfalls ein Fassungsvermögen von ca. 0,5 m<sup>3</sup> und die Untersuchungen wurden im selben Umfang zur beschriebenen Trockenerhitzung am JKI, Standort Braunschweig, durchgeführt.



**Abbildung 6:** Thermische Behandlungsverfahren zur Bekämpfung von Resterden mit Zystennematoden. (a) Erd-Sterilisationsgerät STERILO ungefüllt mit gitterförmig verbauten Heizplatten. Das Gerät wurde mit 0,5m<sup>3</sup> Parabraunerde von Versuchsfeldern des JKI, Standort Braunschweig, aufgefüllt, und Gazebeutel mit Referenzzysten in verschiedenen Tiefen hinzugefügt (b). Dämpfungsgerät (c) und Positionen der Temperatursensoren und Gazebeutel mit Referenzzysten (d); Tunnelbandanlage (Magnetron) (e) mit jeweils 3 gleichzeitig homogen behandelten Boxen mit Resterde mit in verschiedener Tiefe eingebetteten Zystennematoden (f); (Quelle: Berger et al. *in progress*).

Nach Kontaktaufnahme durch das Entsorgungsunternehmen Nehlsen AG (Bremen, DE) wurde im Zuge einer Vorevaluierung das bereits in der Dekontamination von Klinikabfällen genutzte Gerät LOGMED I (Logmed Cooperation Göldner, Fischen i. Allgäu, DE) mit einem kontinuierlichen Durchsatz von mehreren Tonnen zu behandelnden Substrates pro Stunde erprobt. Diese bereits für den Praxiseinsatz anwendbare Anlage basiert auf einem geschlossenen System, das unter Zugabe von Wasser zur Resterde über eine Expositionsschnecke eine Zerkleinerung des zu behandelnden Materials bewirkt. Die daran anschließende thermische Behandlung des nunmehr zerkleinerten Gutes mit bis zu 115°C erfolgt in der sogenannten Förderschnecke (**Abb. 7a**). Die Dekontamination erfolgt dabei mittels Satttdampf (Druck 1,7 bar) aus dem zuvor angefeuchtetem Material. Zur Temperaturerzeugung wurde auf eine indirekte Erwärmung der Resterde mittels Wärmemantel um die Förderschnecke zurückgegriffen. Aus energetischen Gründen erfolgt

die Wärmeerzeugung direkt im Gerät mittels Wärmeträgeröl. Um einer Zerstörung der Gazebeutel mit je 80 Zysten beider PCN-Arten, *G. pallida* und *G. rostochiensis*, durch die Transportschnecke vorzubeugen, wurden diese an Holzprüfkörper fixiert (**Abb. 7b, c**). Die während der Behandlung erreichte Temperatur wurde endpunktbestimmt mittels testo® Temperaturmessstreifen (Bereich 29°C bis 150°C ( $\pm 1,5K$ )). Abschließend wurde die Behandlungswirkung ebenfalls mittels Schlupf- und Biotest bestimmt.



**Abbildung 7:** Geöffnete Anlage LOGMED I mit der diagonal verlaufenden, ummantelten Förderschnecke zur thermischen Behandlung des Transportgutes im Hintergrund und Einfülltrichter in der oberen linken Ecke (**a**). Holzprüfkörper mit seitlichem, durch Draht befestigtem Gazebeutel mit Referenzzysten und aufgeklebtem Temperaturmessstreifen (**b**) sowie diese nochmals vor Verlust geschützt in einem Baumwollsäckchen (**c**). (Quelle: zusammenfassender Bericht Rausch & Bastuck 2020, Nehlsen AG).

## AP2 – $\beta$ - und $\gamma$ Strahlenbehandlung

Mittels  $\gamma$  und-  $\beta$  (Elektronen-) Strahlung wurden Referenzzysten der beiden PCN-Arten unter kontrollierten Bedingungen beim Unterauftragnehmer Steris-Synergy Health GmbH (Radeberg, DE) mit den Dosen 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 4, 8 und 12 Kilo-Gray (kGy) behandelt. Die Behandlung wurde in zur Sterilisation von Medizin- und Lebensmittelprodukt-Umverpackungen genutzten Anlagen durchgeführt. Hierbei wurde das Elektronenbestrahlungsgerät GSE 80 um einen Strahlungsbeschleuniger vom Typ Rhodotron TT 300 (3/10 MeV Leistung) zur Erzeugung von  $\beta$  (Elektronen-) Strahlung bzw. einem  $\gamma$ -Bestrahlungsgerät GS 3000 auf Basis von Co-60 als Strahlenquelle erweitert. Die erfolgte Bestrahlung wurde durch auf dem Deckel der behandelten Boxen angebrachte Alanin-ESR-Dosimeterstreifen, die die empfangene Strahlendosis durch Farbumschlag wiedergeben, belegt. Das zu bestrahlende Gut wird dabei auf Paletten am Strahlungsbeschleuniger (Abb. 8) bzw. in einer eigens entwickelten Kammer der Co 60 Strahlenquelle ausgesetzt. Die notwendige Energiedosis richtet sich nach der Dichte des Produkts, der Größe des Sterilisationsguts, der Dosisrate, der Bestrahlungszeit und nach

dem Layout der Sterilisationsanlage. In einer ersten experimentellen Untersuchung zur Feststellung der letalen Dosis wurden Referenzzysten, verpackt in Gazebeuteln ohne umgebende Resterdematrix, bestrahlt. Pro Dosis und Strahlenart wurden 4 Replikate jeder Art (*G. pallida*, *G. rostochiensis*) behandelt. Im zweiten Ansatz wurden Gazebeutel mit je 100 Zysten in Resterde mit einer maximalen Schichtdicke von 10 cm eingebettet und mit einer Dosis von 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 4, 8 kGy mit beiden Strahlungsarten behandelt. Jede Box enthielt dabei 500 g Resterde (Herkunft Emsland [NI] und mit höherem organischen Anteil, Donaumoos [BY]). Auch hier wurden im Anschluss an die Behandlungen Schlupf- und Biotests zur Bewertung des Behandlungserfolges durchgeführt. Um die Auswirkungen der empfangenen Strahlung auf die Resterdematrix und das darin enthaltene Mikrobiom (indirekt) zu beurteilen und die Verfügbarkeit von Bodennährstoffen zu ermitteln, wurden Topfversuche mit je drei Samen von *Zea mays* pro Topf (Jiffypot®) etabliert. Pro Strahlungsart und Dosis wurden Pflanzen in je 3 Töpfen randomisiert bei 20°C und einer Luftfeuchte von 70% sowie 16h/8h Hell-Dunkel-Rhythmus unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus kultiviert. Nach 4 Wochen Wachstum wurden die Pflanzen geerntet, für 24h bei 80°C getrocknet und Wurzel- und Spross-Biomasse vergleichend zu unbestrahlten Kontrollen der beiden Resterden ermittelt.

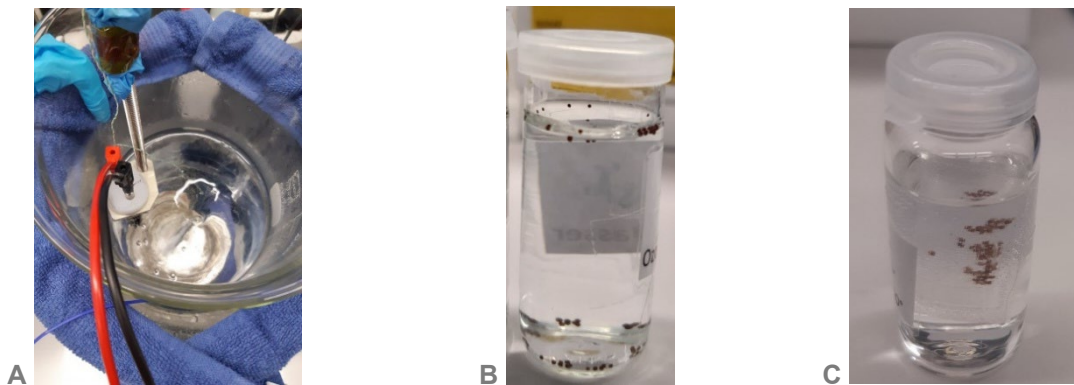


**Abbildung 8:** Ablauf der ionisierenden Bestrahlung: Gazesäckchen mit Zysten werden auf dem Boden einer Pappschachtel festgeklebt, diese wurde von außen für die jeweilige Behandlung/Strahlungsart und -dosis beschriftet, mit Gamma- oder Elektronenbestrahlung behandelt. Mittels der bewährten Methoden Schlupftest und Biotest wurde die Überprüfung der Lebensfähigkeit und Entwicklungsfähigkeit der Referenznematodenzysten durchgeführt (Fotos: Internet-Auftritt Fa. Steris Ast).

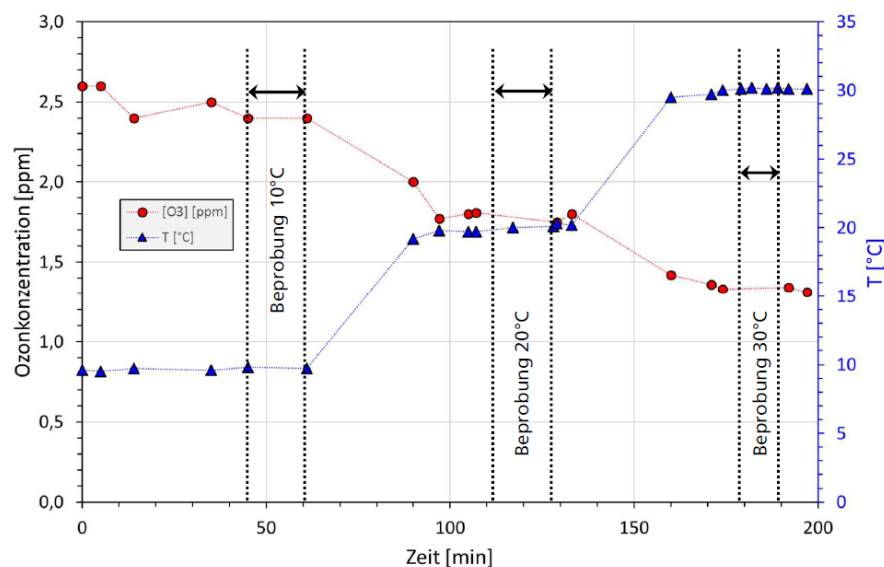
## AP2 – Behandlung mit ozoniertem Wasser und Spaltprodukten von NaCl in wässrigen Lösungen

Im Vorversuch in den Laboren des Unterauftragnehmers Fraunhofer Institutes IST in Braunschweig, wurden Stabilität/ Lagerfähigkeit, Konzentration und Temperaturverhalten des mittels Diamantelektrode erzeugten ozonierten Wassers untersucht. Die Dosiskontrolle der Behandlung erfolgt entweder über eine Indigo-Farbstoff basierte Titration oder über O<sub>3</sub>-potentiometrische Elektroden an Stichproben des behandelten Materials. Es wurde festgestellt, dass ozoniertes Wasser bei Temperaturen um 10°C im Schnappdeckelglas eine Ausgangskonzentration von maximal 2,5 ppm besitzt, die bei steigender Temperatur stetig abnimmt (**Abb. 9**). Zudem konnte gezeigt werden, dass nach einer Zeitspanne von 30-35 min im ungünstigsten Fall lediglich 16% des ursprünglichen Ozongehaltes im Wasser vorhanden waren (**Tab. 1**).

a)



b)



**Abbildung 9:** (a) A Erzeugung von ozoniertem Wasser mittels Diamantelektrode im Becherglas; Freie (B) und in Gaze eingeschweißte (C) *G. pallida* Zysten in jeweils 10 mL ozoniertem Wasser; Ozongehalt in einer Quarzküvette bei verschiedenen Temperaturen (b). Der angezeigte zeitliche Verlauf spiegelt NICHT das Abklingverhalten in **Tab. 1** wider. (Messungen M. Höfer, Fraunhofer IST)

	T [°C]	O3-Konzentration [ppm]		Restkonz. nach 30-35 min [%]
		0 min	30-35 min	
Quartz	10	2,6	1,57	60%
Quartz	20	1,77	0,92	52%
Quartz	30	1,33	0,216	16%
SG	10	2,5	0,76	30%
SG	20	1,81	0,82	45%
SG	30	1,33	0,375	28%
SG_mit Gaze	10	2,5	1,29	52%
SG_mit Gaze	20	1,81	1,23	68%
SG_mit Gaze	30	1,33	0,85	64%

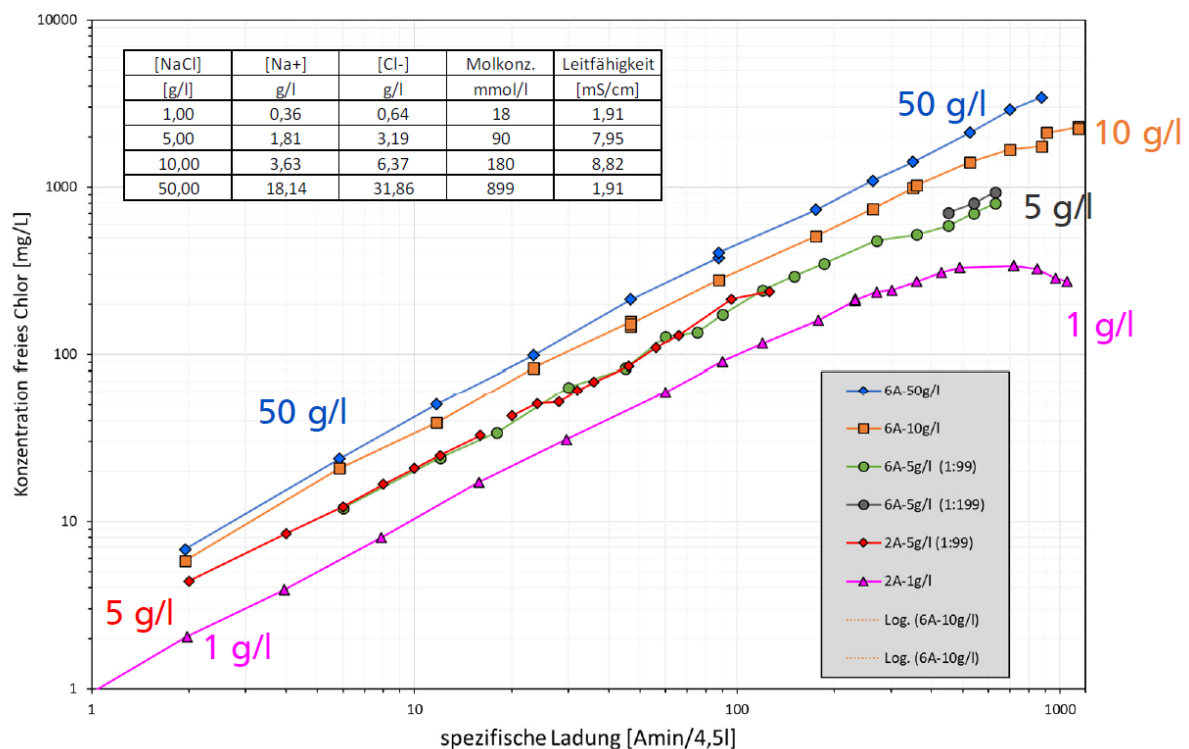
**Tabelle 1:** Anhand freigesetzter Hydroxylradikale (OH<sup>•</sup>) per Testkit bestimmte Ozonkonzentrationen in der Quarzküvette, dem Schnappdeckelglas (SG, 10 ml) ohne und mit Gazebeutel. Ausgangskonzentration und Konzentration nach 30-35 min. (Messungen M. Höfer, Fraunhofer IST)

Das ozonierte Wasser wurde mittels Diamantelektrode in einem Becherglas erzeugt und jeweils 10 mL wurden direkt auf freie bzw. in Gasesäckchen befindliche Zysten von *G. pallida* pipettiert (Abb. 9a). Die Zysten wurden 24h in der Lösung exponiert, rückgetrocknet und anschließend einem Schlupftest unterzogen. Aufgrund der bekannten Probleme aus den Versuchsansätzen zur Inundation (siehe Ergebnisse AP2 – Inundation) bei der Trocknung von Zysten wurden bei *H. schachtii* nur die Behandlungen im feuchten Zustand getestet. Die Messung der Lebensfähigkeit erfolgte wie oben beschrieben per Schlupfinduktion mit ZnCl<sub>2</sub>-Lösung.

Nachdem kein den Ozongehalt mindernder Effekt durch die Nutzung der Gazebeutel festzustellen war, wurden die Ozonausgangslösungen am Fraunhofer-Institut frisch hergestellt, aufgrund der räumlichen Nähe innerhalb von 10-15 min zum JKI gekühlt geliefert und Versuche zur Behandlung mit freien Nematodenzysten, Zysten im Gazebeutel und Zysten in Resterde überstaut mit ozoniertem Wasser direkt in Schnappdeckelgläschen angesetzt und über Nacht inkubiert. Für die Behandlung von Zysten mit Spaltprodukten des Kochsalzes (mit abnehmender Stabilität: molekulares Chlor, Cl<sub>2</sub>; Chlordioxid, ClO<sub>2</sub><sup>•</sup>; Chlorat, ClO<sub>3</sub><sup>•</sup> und Perchlorat, ClO<sub>4</sub><sup>•</sup>) wurde mittels Diamantelektrode bestehend aus einem Plattenelektrodenpaar mit einer effektiven Fläche von 18 cm x 2,5 cm und einem Elektrodenabstand von einem Zentimeter eine Elektrolyse mit deionisiertem Wasser und verschiedenen Kochsalzkonzentrationen durchgeführt (**Abb. 10**). Ebenso wurde die Stromdichte an den Elektroden variiert. Die Konzentration an reaktiv wirksamen freiem Chlor wurde mit dem DPD-Verfahren (Messkit Chematest 30, Hersteller SWAN) als Funktion der Elektrolysedauer bzw. der messbaren spezifischen Ladung der Lösungen ermittelt. Freies Chlor ist weniger stark oxidativ wirksam als Ozon, jedoch wesentlich stabiler in seinen oxidativen Eigenschaften. Zudem erfolgt mit NaCl nur eine sogenannte Katodenreaktion, die



die Bläschenbildung verhindert und damit eine exakte Messung der erzeugten Konzentration des reaktiven Chlors ermöglicht. Zur Überprüfung auf ihre schlupfhemmende Wirkung standen folgende Lösungen im Test: a) 300 mg/L freies Chlor bei 50 g/L NaCl Ausgangskonzentration, b) 300 mg/L freies Chlor bei 1 g/L NaCl Ausgangskonzentration, c) 50g/L NaCL Ausgangskonzentration bei Ladung 240 Amin/L und d) 5g/L NaCL Ausgangskonzentration bei Ladung 240 Amin/L. Zusätzlich wurden die Zysten vor der Behandlung jeweils für 24h in deionisiertes Wasser, 0,1% Triton X-100 oder 0,1% handelsübliches Spülmittel eingeweicht, um den Einfluss der Herabsetzung der Oberflächenspannung auf der Zyste bewerten zu können. Es wurden Nematodenzysten mit und ohne Resterdematrix behandelt und anschließend einer Wirksamkeitsbewertung anhand von Schlupf- und Biotest unterzogen.

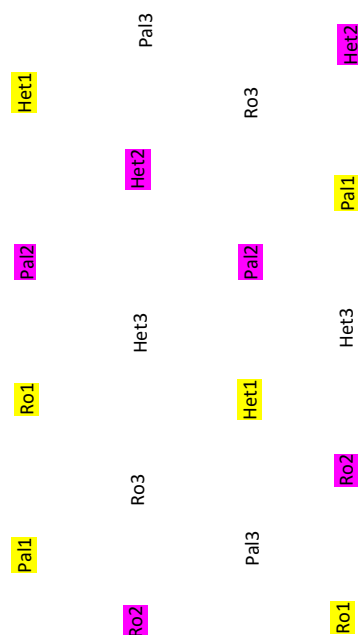


**Abbildung 10:** Darstellung der spezifischen Ladung (A/NaCl Konzentration in einem Ansatzvolumen von 4,5 l) zeigt am logarithmischen Verlauf des resultierenden freien Chlors, dass die Unterschiede zwischen 10 g/l und 50 g/l nicht mehr signifikant verschieden sind, sodass ein Sättigungseffekt zu verzeichnen ist. Auch der Unterschied zur geringsten Konzentration von 1 g/l NaCl ergibt eine faktorielle Verringerung zur höchstkonzentrierten Lösung von lediglich um Faktor 10. (Messungen M. Höfer, Fraunhofer IST)

## AP2 – Anaerobe Bodendesinfektion (ASD) und Biofumigation

Bereits im Jahr 2021 wurden erste Versuche zur anaeroben Bodendesinfektion in den Mikroplots als Teil der Quarantänestation Nematologie am JKI Standort Braunschweig durchgeführt. Ziel der Versuche war es, mit Hilfe des in den Boden eingearbeiteten Substrates anaerobe Bedingungen in den Freilandflächen zu erzeugen sowie verschiedene

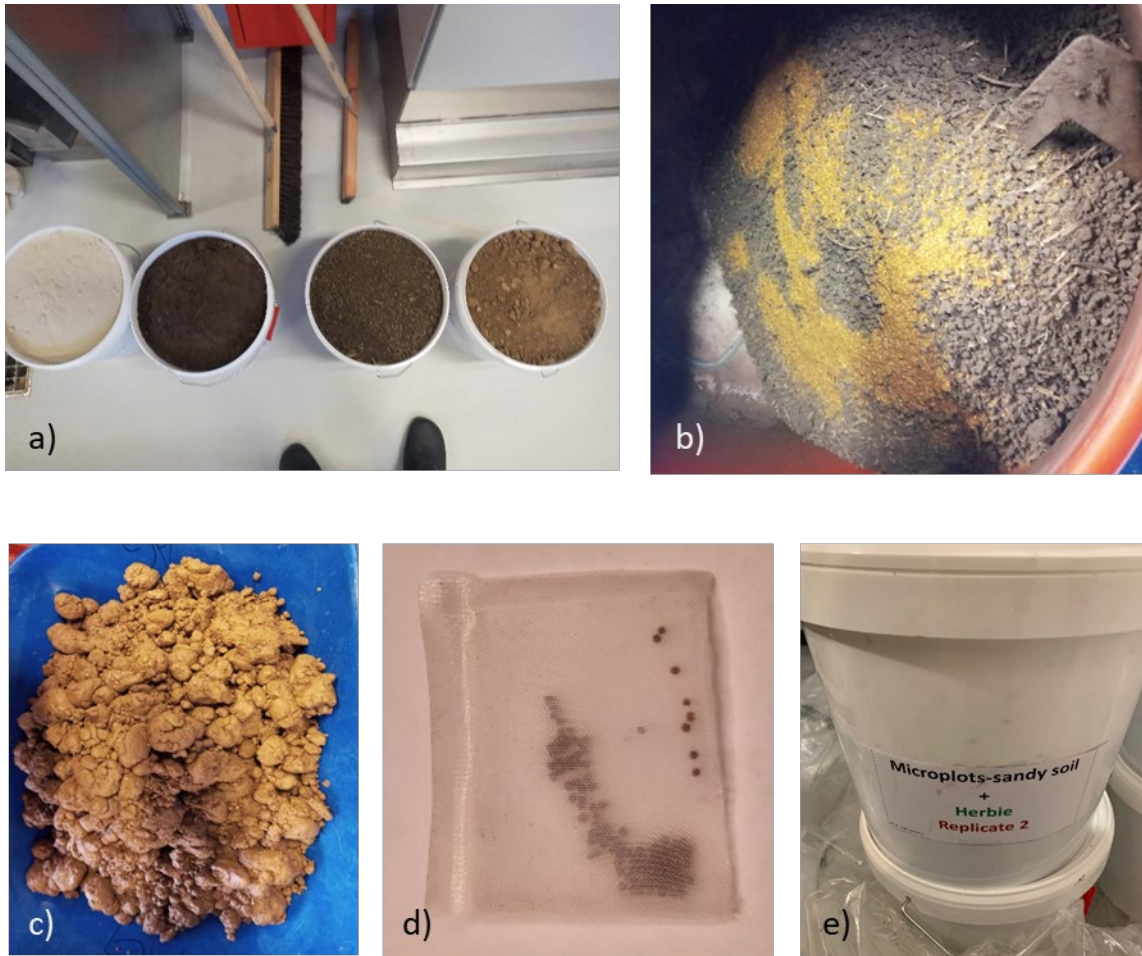
Aufwandmengen des Substrates hinsichtlich der Wirksamkeit zur Bekämpfung von in den Boden eingebrachten Referenzzysten zu erproben. Als Substrat wurde das kommerziell erhältliche Produkt HERBIE® (Fa. thatchtec/Soilwise, Wageningen, NL) verwendet, das bereits in der Praxis zur Bodendesinfektion in Gewächshäusern genutzt wird. Nach Rücksprache mit dem Hersteller von HERBIE® wurden 3 verschiedene Aufwandmengen ( $5 \text{ gl}^{-1}$  Boden – unterhalb der optimalen Aufwandmenge;  $10 \text{ gl}^{-1}$  als optimale Aufwandmenge und  $15 \text{ gl}^{-1}$ ) in die obersten 100 l Boden mittels eines Zementmischers eingebracht. Referenzzysten in Gazebeuteln mit Maschenweite  $< 100 \mu\text{m}$  mit den 3 zu behandelnden Zystennematodenarten wurden in einem definierten Schema in die Plots eingeführt (**Abb. 11**).



**Abbildung 11:** Mikroplots mit verschiedenen Versuchsvarianten (mit Folie abgedeckt/nicht abgedeckt) und den mit Markierungen versehenen verschiedenen plotinternen Replikaten der einzelnen Nematodenarten (Ro, *G. rostochiensis*; Pal, *G. pallida*; Het, *H. schachtii*), sowie deren Verteilungsmuster im Plot mit Nummer der Entnahmereihenfolge.

Die verschiedenen Aufwandmengen wurden zufällig verteilt und jeweils 3-fach repliziert getestet. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen mit und ohne Folienabdeckung zum Vergleich des Behandlungserfolges als Kontrollen genutzt. Der Versuch wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen vom 26.05.2021 – 07.07.2021 durchgeführt. Zur Bewertung der mindestens notwendigen Applikationsdauer wurden alle 2 Wochen einzelne plotinterne Replikate zur Lebensfähigkeitsuntersuchung entnommen. Nachdem die Versuche im Jahr 2021 keine Behandlungswirkung zeigten (s. Ergebnisteil), wurden 2022 unter Mitwirkung von Herrn Henk Meints (thatchtec/Soilwise, Wageningen, NL) Versuche unter stärker kontrollierten Bedingungen in Mesokosmen durchgeführt. Jeweils 4 Replikate mit 15 Liter der

Böden (i) gesiebten sterilen Sand (Dichte 1390 g/l), (ii) tonigen Schluff (Sicke/Lucklum, Dichte 1175 g/l), (iii) sandigen Ton (Mikroplotanlage, Dichte 1225 g/l) und (iv) Lehm (Ahlum, Dichte 1250 g/l) wurden mit Herbie® oder alternativ dazu Senfsaatmehl aus *Brassica juncea* (P.H. Petersen Saatzucht Lundsgaard GmbH, Grundhof, DE), im für beide Substrate gleichen Mischungsverhältnis (8 g/l) im getrockneten Zustand mittels eines handelsüblichen Zementmischers vermengt (**Abb. 12**). Anschließend wurde das Substrat im Mischer mit dem für jede Bodenart angepassten Wasservolumen gebunden, um eine exakte Bodenfeuchte von 20% v/v sicherzustellen, die eine stabile Entwicklung der verschiedenen mikrobiellen Artengemeinschaften ermöglichen soll. Gazebeutel mit Kartoffelzystennematoden beider *Globodera*-Arten wurden im oberen und mittleren Bereich des gleichmäßig in die Eimer verteilten Substrat-Matrix-Wasser-Gemisches (>15 l) eingebracht. Die Eimer wurden in einer Klimakammer bei 15°C gelagert, eine Woche nach Versuchsansatz am 27.04. wurden die Eimerstapel luftdicht mit Folie verpackt und nach ca. 6 Wochen am 08.06. wurden die behandelten Zystennematoden entnommen und anschließend einem Schlupftest unterzogen. Als Versuchskontrollen dienten Proben der Matrix ohne zugegebenes Substrat (jeweils 4 Replikate pro Bodenart), sowie 4 Kontrollen der für die Behandlung genutzten Referenzzyten, letztere gelagert bei 4°C im Kühlschrank. Eine Wiederholung des Mesokosmenansatzes unter gleichen Versuchsparametern erfolgte (einschließlich der Auswertung im Schlupftest) im Zeitraum vom 08.08.2022 bis 18.10.2022. Aliquote aller am Versuch beteiligten Referenzzyten wurden von Ende Februar bis Anfang August 2023 im Biotest geprüft.



**Abbildung 12:** **a)** von Wurzeln und Steinen befreite und durch Siebung homogenisierte Bodenmatrix aus den 4 untersuchten Bodenarten: gesiebter Sand, toniger Schluff, sandiger Ton und Lehm (v.l.n.r.); **b)** Vermischung des Materials mit Herbie® im Zementmischer; **c)** Klumpenbildung im lehmigen Boden nach Zugabe von 5 l Leitungswasser (auf 60 l Matrix+Herbie® bzw. Senfsaatmehl); **d)** Beispiel eines eingebrachten Gazebeutels mit Zysten nematoden; **e)** Lagerung der Versuchsbehälter bei 15°C im Klimaraum.

Zur Differenzierung der während der ASD entstehenden volatilen Stoffen und den dadurch hervorgerufenen Wirkeffekten von den direkt im Boden über das darin enthaltene Bodenmikrobiom bedingten Effekten wurden verschließbare Mikrokosmenversuche durchgeführt. Dazu wurden luftdicht verschließbare Falcon-Tubes mit einem Gemisch aus jeweils 25 ml sterilem Sand und der als wirksame ASD-Substrataufwandmenge erkannten Substratmenge von 8 g/l Herbie® oder Senfsaatmehl befüllt. Es wurde jede Variante in 8 technischen Replikaten untersucht. Die mikrobiellen Artengemeinschaften wurden in Form von Sickerwasser/Filtrat (=leachate) aus den Versuchsböden (Ahlum, Sickte/Lucklum, Mikroplotanlage und Kontrolle=Steriles Wasser), die bereits im Mesokosmenansatz verwendet wurden, gewonnen und dem Sand-Subtrat-Gemisch hinzugefügt. Damit sind die für die jeweilige Bodenart typischen Mikrobiome repräsentativ enthalten. Der Feuchtegehalt wurde auf 20% absoluter Bodenfeuchte im Bodenmatrix-Substratgemisch der Tubes eingestellt. Die Tubes waren zur Hälfte (25 ml) befüllt. Gazebeutel mit *G. rostochiensis* als

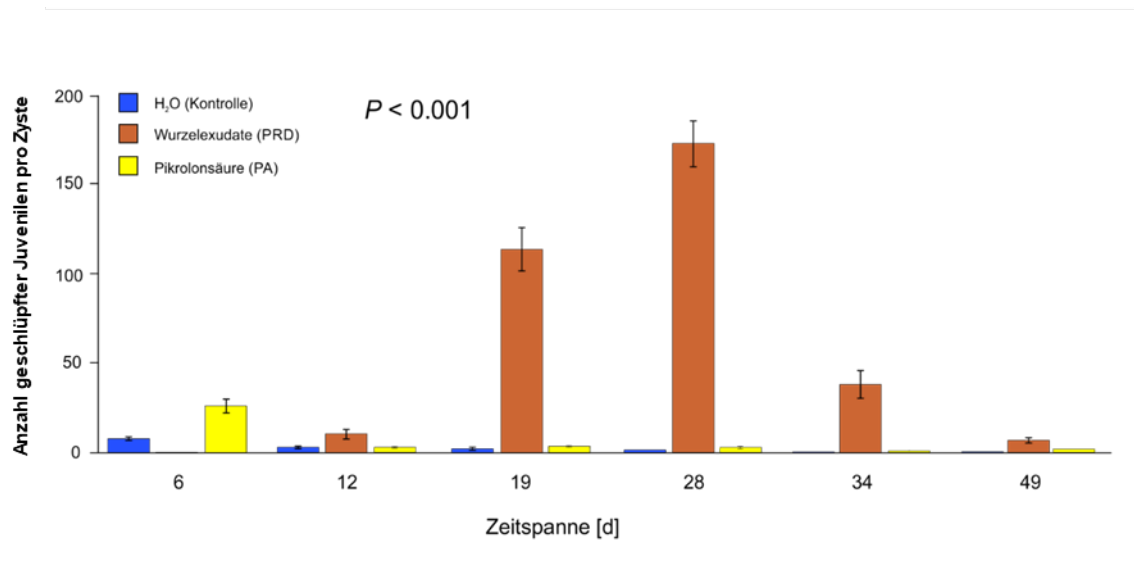
der etwas widerstandsfähigeren Art wurden sowohl in die Sand-Substrat-Bodenbiom-Matrix als auch den darüber verbleibenden Luftraum (head space) eingebracht. Aus den jeweils 20 zurückgewonnenen Nematodenzysten wurden im Anschluss an die anaerobe Behandlung je 10 Zysten für die Ermittlung der Lebensfähigkeit im Schlupftest verwendet. Weitere 5 Zysten wurden für die Durchführung der Biotests und die verbleibenden Zysten zur weiteren Bestimmung der mikrobiellen Artengemeinschaften durch klassische Kultivierungstechniken mit anschließender PCR und Sanger-Sequenzierung sowie im Illumina® Hochdurchsatzverfahren genutzt. Dazu wurden mittels ASD behandelte Zysten und Zysten der unbehandelten Bodenkontrolle (letztere ohne Zugabe der Substrate) oberflächensterilisiert und anschließend deren Ei- und Juvenileninhalt freipräpariert. Aus einem Teil der Zysteninhalte wurden Einzel-Ei-Kultivierungen durch Inkubation auf PDA-Agar (Potato Dextrose-Agar) und anschließende PCR der aus den Eiern herausgewachsenen Bakterien und Pilze durchgeführt. Die PCR-Amplifikation erfolgte mittels genereller 16S-rRNA Primer (Bakterien, Primerpaar 341F/806R zur Amplifikation der V3/V4 Region der bakteriellen ribosomalen Untereinheit SSU) und ITS-Primer (Pilze, Primerpaar gITS/ITS4 zur Amplifikation der nicht-codierenden Regionen zwischen den ribosomalen Untereinheiten; u.a. Kanfra et al. 2021). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Exo-SAP-IT Express Mix wurde die Sanger-Sequenzierung im Unterauftrag durch die Fa. Microsynth (Göttingen, DE) durchgeführt und die resultierenden Sequenzen mittels der Software Sequencher 5.0 (Gene Codes Corp., MI/US) zusammengeführt (*Assemblage*) und editiert. Die Artbestimmung wurde mittels BLAST-search in der Datenbank des National Center for Biotechnology (NCBI) durchgeführt. Die Hochdurchsatzsequenzierung mit den Arbeitsschritten (i) Erstellung einer Amplicon-Library auf Basis einer PCR mit den auch für die Sanger-Sequenzierung genutzten Bakterien- und Pilz-Primern einschließlich DNA-Eingangsqualitätsprüfung, (ii) Illumina MiSeq paired end Sequenzierung >250 bp und (iii) Datenqualitätsprüfung  $Q30 \geq 75\%$  und (iv) bioinformatische Auswertung mit Erstellung von Clustern (OTUs, =operational taxonomic units) und Ermittlung verschiedener Diversitätsindizes in der finalen Auswertung wurde im Unterauftrag durch Novogen Ltd. (Cambridge, UK) ausgeführt und bioinformatisch nochmals auf Grundlage der Rohsequenzierdaten durch Dr. Julia Moll (Helmholtz Zentrum für Umweltforschung, Halle, DE) überprüft.

## 4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

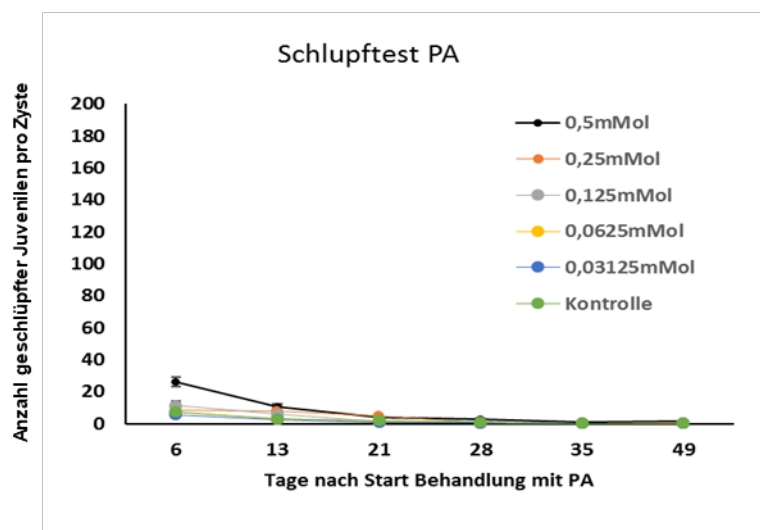
### AP1 – Schlupftest und Biotest

Bei allen Behandlungsverfahren im Projekt wurden Schlupf- und Biotests parallel zueinander durchgeführt. Mit Ausnahme des durch das Verfahren bedingten Unterschiedes in der Bestrahlung von PCN-Zysten mit einer Dosis von 1 kGy (siehe Ergebnisdarstellung Strahlenbehandlung; **Abbildungen 36/37**), mit vorhandenem Schlupf von Juvenilen bei nicht erfolgter Weiterentwicklung zum adulten Weibchen, wurden nahezu parallele Ergebnisse (ersichtlich aus den unbehandelten Kontrollen; u.a. **Abbildung 32**) mit beiden Methoden zur Vitalitätskontrolle erzielt. Der Einsatz von Pikrolonsäure zur gezielten Schlupfinduktion durch chemische Mittel zeigte lediglich eine kurzfristige Wirkung, die bereits nach 6 Tagen erreicht wurde und im Vergleich zu Kartoffelwurzeldiffusaten (PRD) nur einen Bruchteil der Nematodeneier zum Schlupf anregte (**Abb. 13**).

a)

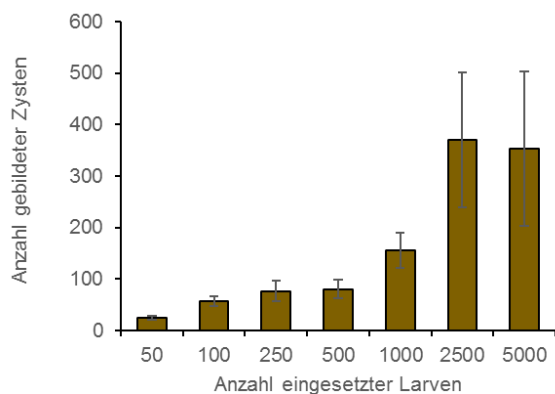


b)



**Abbildung 13:** **a)** Vergleich verschiedener den Schlupf juveniler Nematoden des zweiten Entwicklungsstadiums (J2) anregender Reagenzien an Zysten von *G. rostochiensis* Population ‚Hamerz‘ (Vermehrung 2016) in 3 Replikaten. Deutlich erkennbar ist das Erreichen der höchsten Schlupfraten mit PRD nach etwa 4 Wochen, der stets vorhandene geringfügige Spontanschlupf der Juvenilen nahe der Zystenhülle mit höchster Sauerstoffversorgung in Wasser und die wesentlich niedrigere Schlupfinduktion des künstlichen Schlupfreizes Pikrolonsäure mit Optimum zu Beginn des Testes; **(b)** ein Pikrolonsäuregehalt von 0,5 mmol zeigt verglichen zu niedrigeren Konzentrationen den einzigen gegenüber der Kontrolle verschiedenen Schlupfanreiz bis zu 13 Tage nach Beginn der Inokulation mit durchschnittlich 43 geschlüpften J2 pro Zyste.

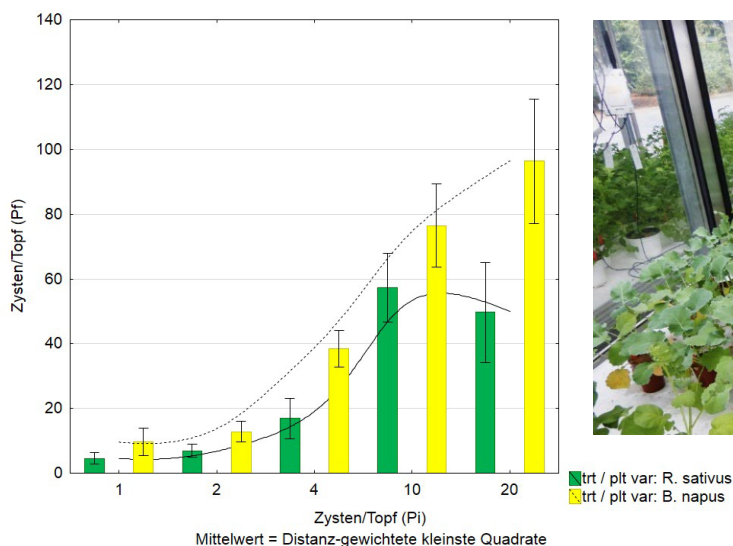
In einem zusätzlichen Ansatz wurde die Sensitivität des Biotestes geprüft. Es wurde überprüft, ob selbst die geringe Anzahl von 50 vitalen Juvenilen (J2) aus unbehandeltem Referenzmaterial ausreichend ist, um eine Vermehrung und Neubildung von Zysten zu generieren. Es wurden Suspensionen vitaler J2 mit verschiedener Anzahl, 50 -5000, hergestellt und jeweils an 3 Wochen alte Kartoffelpflanzen gegeben. Wurden 50 vitale J2 angebracht, bildeten sich daraus im Mittel 25 Zysten (Abbildung 14). Jede dieser Zysten kann potentiell bis zu 400 vitale Eier enthalten. Somit wäre eine Bildung von bis zu 10.000 neuen vitalen Eiern möglich. Bis zu einer Dichte von 2500 vitalen Juvenilen pro Biotest ist eine stetige Zunahme der neu entwickelten Zysten (bis zu 400 Zysten pro Pflanze) zu verzeichnen. Höhere Juvenilenzahlen konnten aufgrund des limitierten Nahrungsangebotes keine zusätzlichen Zysten generieren. Ab dieser Populationsdichte war eine Sättigung in der Populationsentwicklung, jedoch nicht einhergehend mit einem verstärkten Abfall der Zystenanzahlen (vgl. *H. schachtii* unten), zu verzeichnen.



**Abbildung 14:** Vermehrungsfähigkeit von *G. rostochiensis* nachgewiesen für direkt an die vollanfälligen Kartoffeln der Sorte ‚Desiree‘ zugesetzten J2 („Juvenilen“) aus je 5 Wiederholungen im von Kort et al. 1977 beschriebenen Biotest mit Juvenilen an Stelle ganzer Zysten.

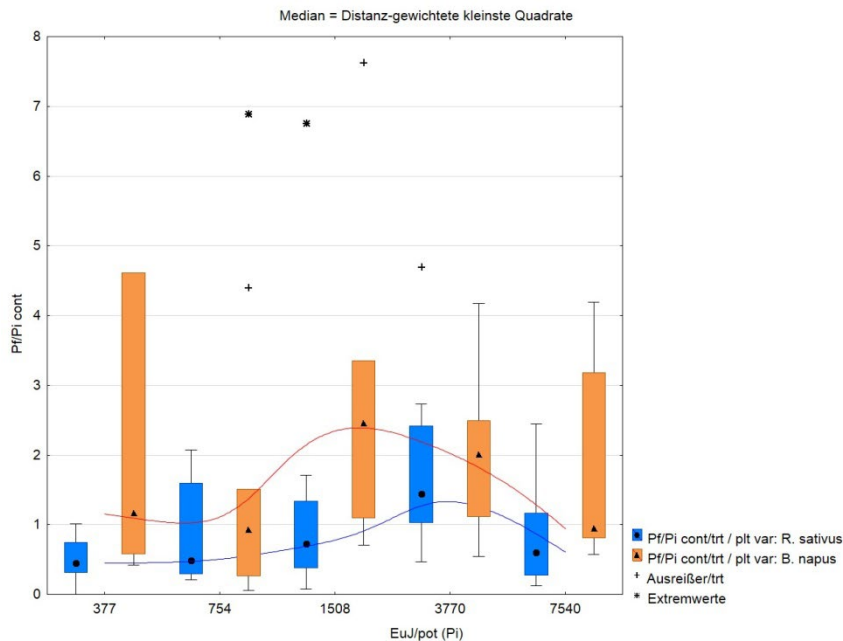
Die Untersuchung der Lebensfähigkeit von Rübenzystennematoden aus den verschiedenen Behandlungsversuchen erfolgte in Kombination einer Schlupfinduktion mit  $ZnCl_2$ -Lösung und einem Biotest. Nach Bestimmung der in den Zysten verbliebenen Eier und Juvenile konnte

die Schlupfrate bestimmt werden. Aus Erfahrung schlüpfen selten mehr als 60-70% der Nematoden und ein lebensfähiger Rest verbleibt in der Zyste. Die Methode wird seit Langem mit Erfolg eingesetzt, funktioniert aber zuverlässig nur bei *H. schachtii*. In allen Stufen konnte die Neubildung von Zysten nachgewiesen werden (**Abb. 15**). Die Neubildung folgt der dichteabhängigen Vermehrung von Nematoden und erreicht bei Raps (*Brassica napus*) bereits nach 4 Zysten/Topf und bei Ölrettich (*Raphanus sativus* cv. „Siletina“) erst bei 10 Zysten/ Topf sein Maximum. Die Sensitivität nimmt bei höheren Zystendichten deutlich ab. Allgemein besitzt Raps ein höheres Vermehrungspotential als Ölrettich, weist aber bei niedrigen Zystendichten deutlich höhere Streuungen auf als Ölrettich. In Bezug auf den Zysteninhalt kann eine Reproduktion nur in der Stufe mit 10 Zysten/ Topf (3770 Eier und Juvenile) (**Abb. 16**) für beide Testpflanzen festgestellt werden. Ein relativer Vergleich zwischen den Behandlungen und Kontrollen ist zuverlässig möglich. Anschließend erfolgte die Erfassung der Entwicklungsfähigkeit anhand eines Biotests, der die Neubildung von Zysten nach Befall einer anfälligen Wirtspflanze nach 12 Wochen Inkubation anzeigt. Da dieser Prozess in Abhängigkeit der Populationsdichte vitaler Juvenile erfolgt, wurde diese Abhängigkeit für zwei anfällige Wirtspflanzen von *H. schachtii* (Ölrettich und Winterraps) zuvor untersucht, um hieraus den optimalen Wirt für diesen Test festzulegen. Während Ölrettich eine deutliche Begrenzung der Vermehrung mit wirtsspezifischer Dichte bei 10 Zysten zeigte, bestand diese Begrenzung nicht bei Winterraps, so dass diese Pflanzen für alle nachfolgenden Biotests verwendet wurden.



**Abbildung 15:** Abhängigkeit zwischen Anzahl Zysten zu Beginn ( $P_i$ ) und zum Ende ( $P_f$ ) des Biotests mit Ölrettich (*Raphanus sativus*) und Winterraps (*Brassica napus*) für vitale Rübenzystennematoden und Inokulation über Zysten.

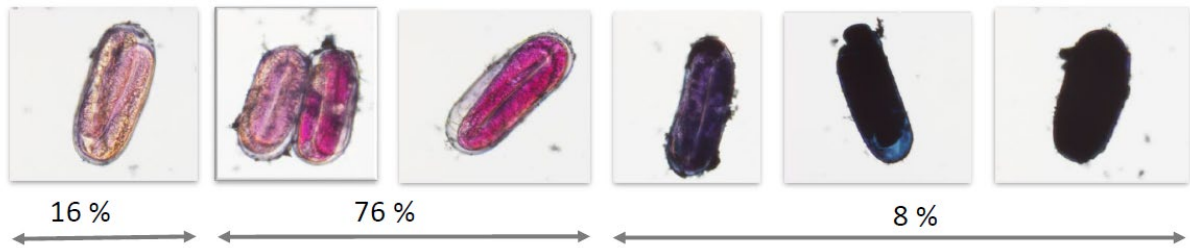




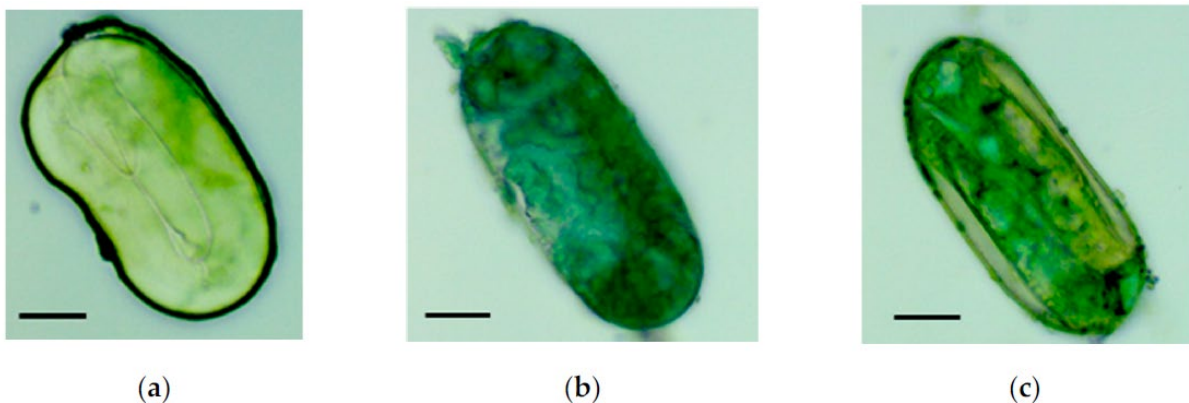
**Abbildung 16:** Vermehrungsraten  $P_f/P_i$  von *H. schachtii* im Biotest mit anfälligem Raps und Ölrettich; Box-Whisker-Plots für  $P_f/P_i$ -Werte in Bezug auf J2 und Eier pro 400 ml Topf. Eine gezielte Zugabe von Juvenilen in den Biotest mit Raps und Ölrettich als Wirtspflanze zeigte im Unterschied zu *G. rostochiensis* ein Optimum zwischen 1500 (Raps) und 3500 (Ölrettich) J2 pro Ansatz, wobei eine Populationsdichte von etwas über 3500 noch keine dichteabhängige Abnahme der gebildeten Zysten pro Ansatz für beide Wirtspflanzen bedeutete.

## AP1 – Färbemethoden

Die Anfärbung von Kartoffelzystennematoden mit MELDOLA'S BLUE und NILE BLUE A ermöglichte für bis zu 76% der Eier keine eindeutige Unterscheidung zwischen vitalen und abgestorbenen Juvenilen (**Abb. 17**). Wie erwartet war in den untersuchten Eiern nach erfolgter Hitzebehandlung verglichen mit unbehandelten Zysten, der Anteil tiefschwarzer Eier höher als in unbehandelten Zysten. Unbehandelte Zysten wiesen überwiegend mittlere Farbintensitäten auf, obwohl z.T. deutliche Läsionen und Zerfallserscheinungen an den durchscheinenden Juvenilen sichtbar waren (**Abb. 17**, 2 von rechts). Die Färbungsintensität war grundsätzlich bei MELDOLA'S BLUE höher als an mit NILE BLUE A gefärbten Eiern und Juvenilen (nicht abgebildet). Zur Illustration der erfolgreichen Behandlungswirkung hat sich der in der Mikrobiologie verwendete weniger stark toxische Farbstoff Malachitgrün als sinnvolle Letalfärbereagenz erwiesen (**Abb. 18**).



**Abbildung 17:** Nachteil der Färbemethode mit MELDOLA'S BLAU zur Bestimmung der Lebensfähigkeit ist zum einen das Risiko eine Beschädigung von Eiern und Juvenilen beim Öffnen der Zyste und das Problem der farblichen Unterscheidung und damit einhergehender subjektiver Zuordnung in der Bewertung der Lebensfähigkeit.

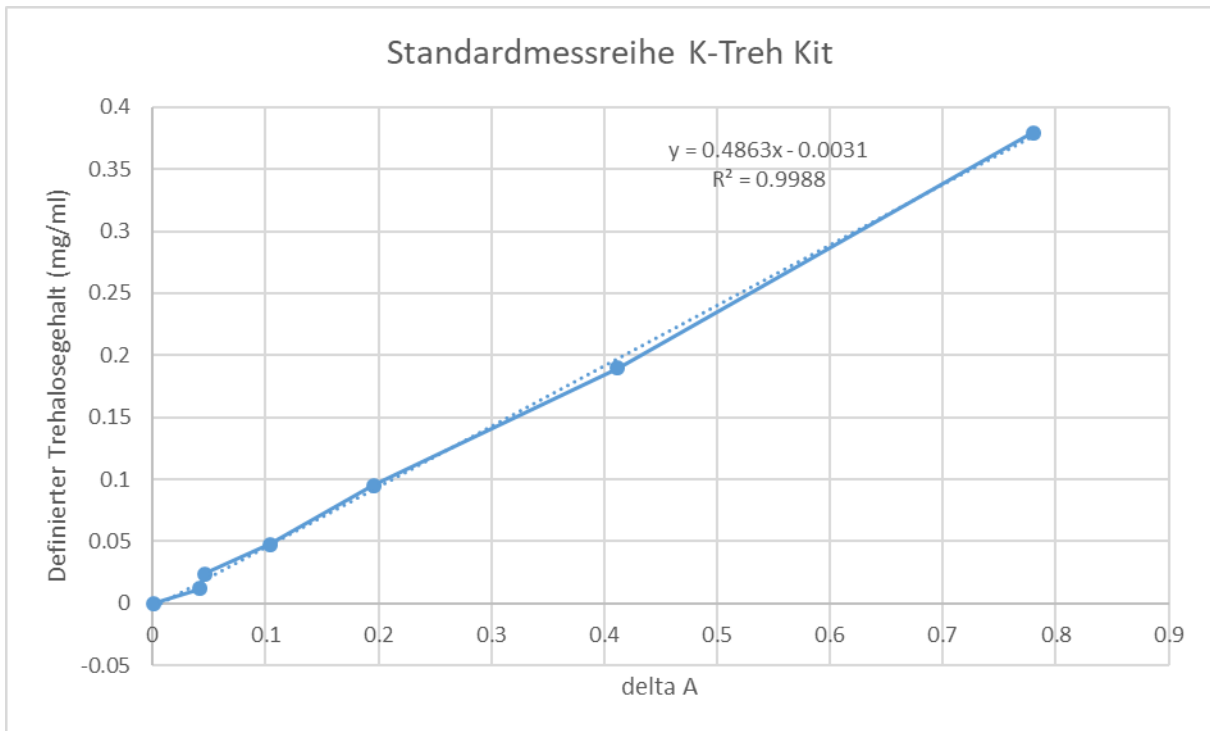


**Abbildung 18:** *G. pallida* Eier angefärbt mit Malachitgrün (a) unbehandelte Referenz; (b, c) nach dreiwöchiger Inundation im Stapelteich. Deutlich zu erkennen ist die wesentlich höhere Farbintensität bei visuell deutlich erkennbarere fortschreitenden Abbau der Körperstrukturen (b>c) der im Ei befindlichen J2 (Quelle: Berger *et al.* 2022).

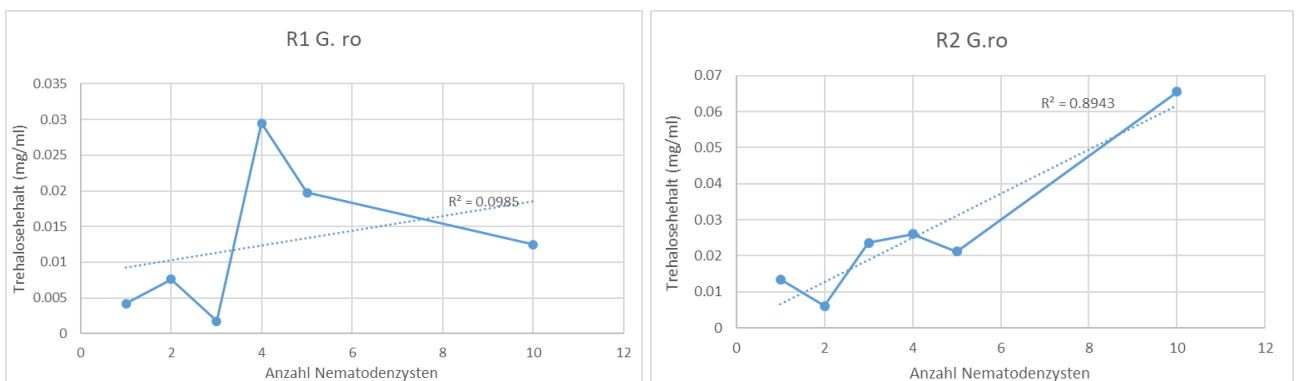
#### AP1 – Bestimmung Trehalosegehalt

Mittels der im K-Treh-Kit mitgelieferten definierten Trehalose-Standardlösungen, die parallel zu der in den untersuchten Zystenproben der beiden PCN-Arten enthaltenen Trehalose mitbearbeitet wurden, um das für den Farbumschlag photometrisch bestimmbare Reduktionsäquivalent NADPH/H<sup>+</sup> zu erzeugen, wurde im ersten Schritt eine Standardkurve erstellt (**Abb. 19**). Diese Standardkurve wies mit einem Bestimmtheitsmaß/ Regressionskoeffizienten R<sup>2</sup> von 0,9988 einen signifikant linearen Verlauf aus photometrisch ermittelter Absorptionsänderung (delta A) und eingesetzter Trehalose-Konzentration auf. Die aus dem Geradenanstieg bestimmte lineare Korrelation lässt sich mit der Funktion  $f(x) = y = 0,4863x - 0,0031$  beschreiben. Dabei entspricht x der gemessenen Absorptionsänderung delta A. Bei Einsetzen der Absorptionsänderungen in diese Funktion ergibt sich eine nur ungenügende Korrelation der aus der Standardkurve abgeleiteten Trehalose-Konzentrationen zur untersuchten Zystenanzahl, wobei einzelne technische Replikate derselben Trehalose-Extrakte keine einheitliche Tendenz bzw. nur bedingt reproduzierbare

Rückschlüsse auf die Anzahl der definiert eingezählten Zysten erlauben (siehe **Abb. 20** am Beispiel von *G. rostochiensis*).



**Abbildung 19:** Standardkurve aus den photometrisch bestimmten Änderungen in der Absorption (delta A) in Abhängigkeit vom eingesetzten Trehalose-Gehalt der Standardlösungen aus dem K-Treh-Kit.



**Abbildung 20:** Technische Replikate des Trehalose-Gehaltes gemessen an den gleichen Extrakten aus 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Zysten. Mit einem Bestimmtheitsmaß von annähernd 0,1 lässt sich keine Korrelation zur eingezählten Zystenanzahl in Replikat 1 herstellen, wobei das Bestimmtheitsmaß in Replikat 2 mit 0,89 ebenfalls nur einen bedingten Rückschluss vor allem im mittleren Bereich zwischen 2 und 5 extrahierten Zysten auf die Quantität vitaler Eier und Juvenilen in den untersuchten Zysten erlaubt.

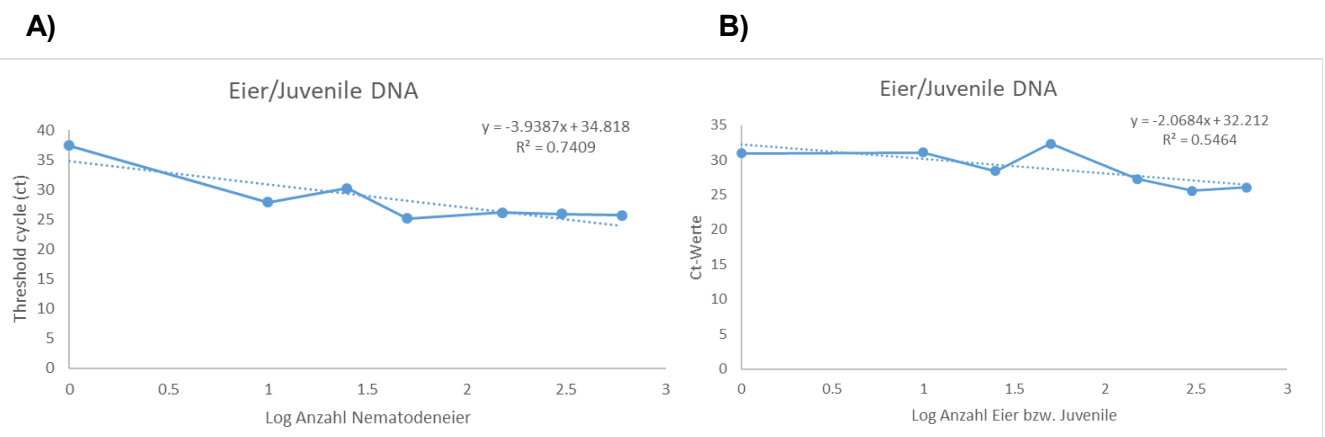
### AP1 – DNA-Blocking mittels Propidium-Monoazid (PMA) und anschließende RealTime-PCR Quantifizierung

Zur Feststellung des Behandlungserfolges der einzelnen Verfahren, muss eine Quantifizierung von stichprobenartig ausgewählten Einzelzysten für einen Ei/Juvenilen-

basierten methodischen Ansatz auf Basis von Einzelzysten mit steigender Anzahl an Eiern/Juvenilen graduell exakt und reproduzierbar erfolgen. Die zur Bestimmung des DNA-Gehaltes erforderliche RealTime-PCR und deren diagnostische Eigenschaften sind dabei entscheidend. Der als Standardverfahren in EPPO und EU-Dokumenten angegebene Assay nach Gamel et al. (2017) wurde daraufhin in seinen Eigenschaften Linearität und Effizienz mit einer Standardkurve von nicht mit PMA vorbehandelten Eiern und Juvenilen erprobt. Die Standardkurven für beide PCN-Arten sind in **Abbildung 21** dargestellt. Deutlich zu erkennen sind nichtlineare mittlere Bereiche, die in Korrelationskoeffizienten/Bestimmtheitsmaßen  $R^2$  von 0,74 (*G. pallida*) und 0,55 (*G. rostochiensis*) ausgedrückt sind. Die Reaktionen verlaufen damit nichtlinear und erlauben dementsprechend keine exakte Wiedergabe der Anzahl lebender Nematoden. Zudem ist bei den 3 genutzten technischen Replikaten der Ausfall niedriger Eizahlen von 1 und 10 Eiern zu über 50 % zu verzeichnen. Die PCR-Effizienz (E) als Indikator für eine zuverlässige und robuste Amplifikation im Assay liegt bei 204 % für die Reaktion mit DNA der Zielart *G. rostochiensis* und 79% für *G. pallida*, wobei der akzeptable Bereich, in dem eine Verdopplung der amplifizierten DNA alle 3,32 Zyklen erreicht wird, zwischen 90 % und 105 % liegen sollte.

Eine Berechnung der PCR-Effizienz erfolgt nach der Formel:  $E = 10 \exp\left(-\frac{1}{\text{Anstieg}}\right)$

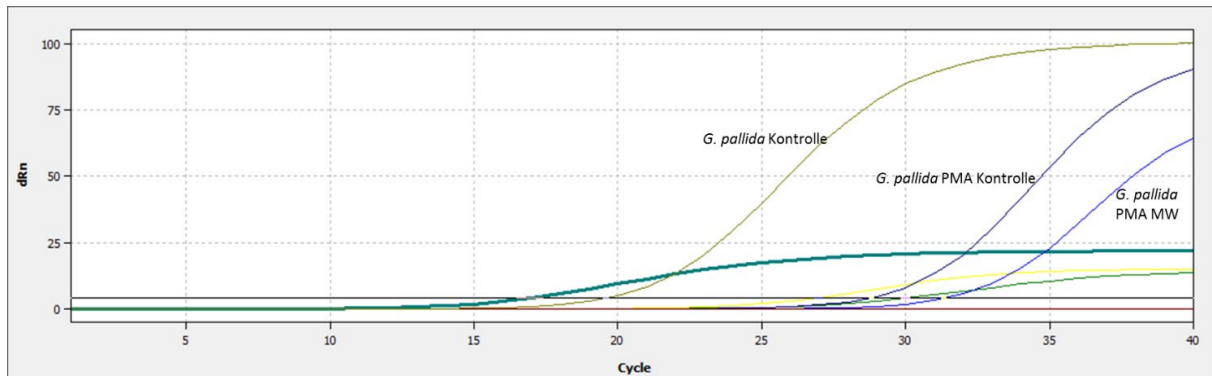
Wobei der prozentuale Effizienzwert (E%) daraus abgeleitet aus  $(E - 1) * 100$  gebildet wird (BioRad 1999).



**Abbildung 21:** Standardkurven des Logarithmus der Ei- bzw. Juvenilenanzahl zum Beginn der exponentiellen Signaldetektion freigesetzter Reportersignale (Threshold cycle) im RealTime PCR TaqMan-Assay nach Gamel et al. 2017 für die PCN-Arten *G. pallida* (A) und *G. rostochiensis* (B). Deutlich erkennbar sind nichtlineare Bereiche der  $C_t$ -Werte bei mittleren Ei- und Juvenilenzahlen zwischen 10 (Verdünnungsschritt 2) und 150 (4) Eiern.

Trotz erkennbar nichtlinearen Verlaufs der PCR wurden Versuche zum Blockieren zellfreier DNA mit nicht vorbehandelten Kontrollen und mit PMA vorbehandelten Kontrollen ohne/mit Behandlung über eine Erhitzung in der Mikrowelle durchgeführt. **Abbildung 22** zeigt exemplarisch für *G. pallida* eine um den Faktor 100 (ca. 7  $C_t$  Unterschied) niedrigere

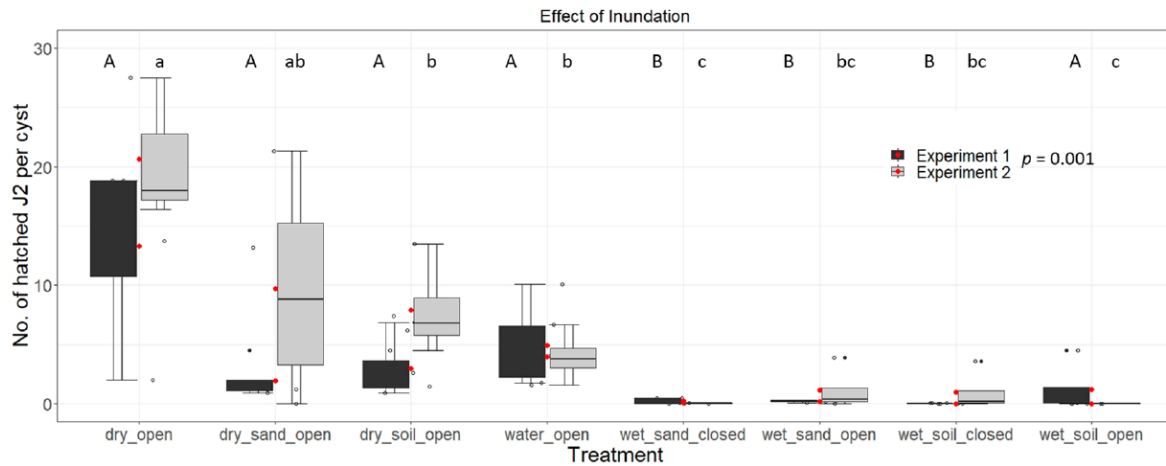
Amplifikation der mit PMA vorbehandelten Einzelzystenreplikate zu den Referenzzyklen ohne PMA-Vorbehandlung sowie eine nochmals um den Faktor 10 geringere Amplifikation der Zystenreplikate nach dem Erhitzen. Letztere liegen damit im Bereich von einzelnen Eiern bzw. Juvenilen, was im Vergleich zum Schlupftest mit keinem vorgefundenen Schlupf der Tiere plausibel erscheint. Damit ist die Methode des DNA-Blockings mittels Propidium Monoazid bei allerdings nicht linearem PCR Verlauf zur Quantifizierung prinzipiell geeignet.



**Abbildung 22:** Real-Time PCR Amplifikation (Gamel et al. 2017) von Einzelzysten von *G. pallida* mit und ohne PMA-Vorbehandlung zur Entfernung zellfreier DNA; Die Zysten nach Erhitzung in der Mikrowelle (MW) zeigten wie erwartet nur geringe Mengen amplifizierbarer DNA nahe der Nachweisgrenze als Indikator für einzelne lebende Eier und Juvenile nach der Behandlung; Die mit unter 25 relativen Fluoreszenzeinheiten unterdrückten Kurven mit  $C_T$ -Werten ähnlich den exponentiell verlaufenden Kurven sind Scheinkurven, die durch die im Multiplex vorhandenen Sonden zum gleichzeitigen Nachweis von *G. pallida* (JOE-Reporter) und *G. rostochiensis* (FAM-Reporter) im selben Reaktionsansatz entstehen können.

## AP2 – Inundation, anaerobe Überstauung

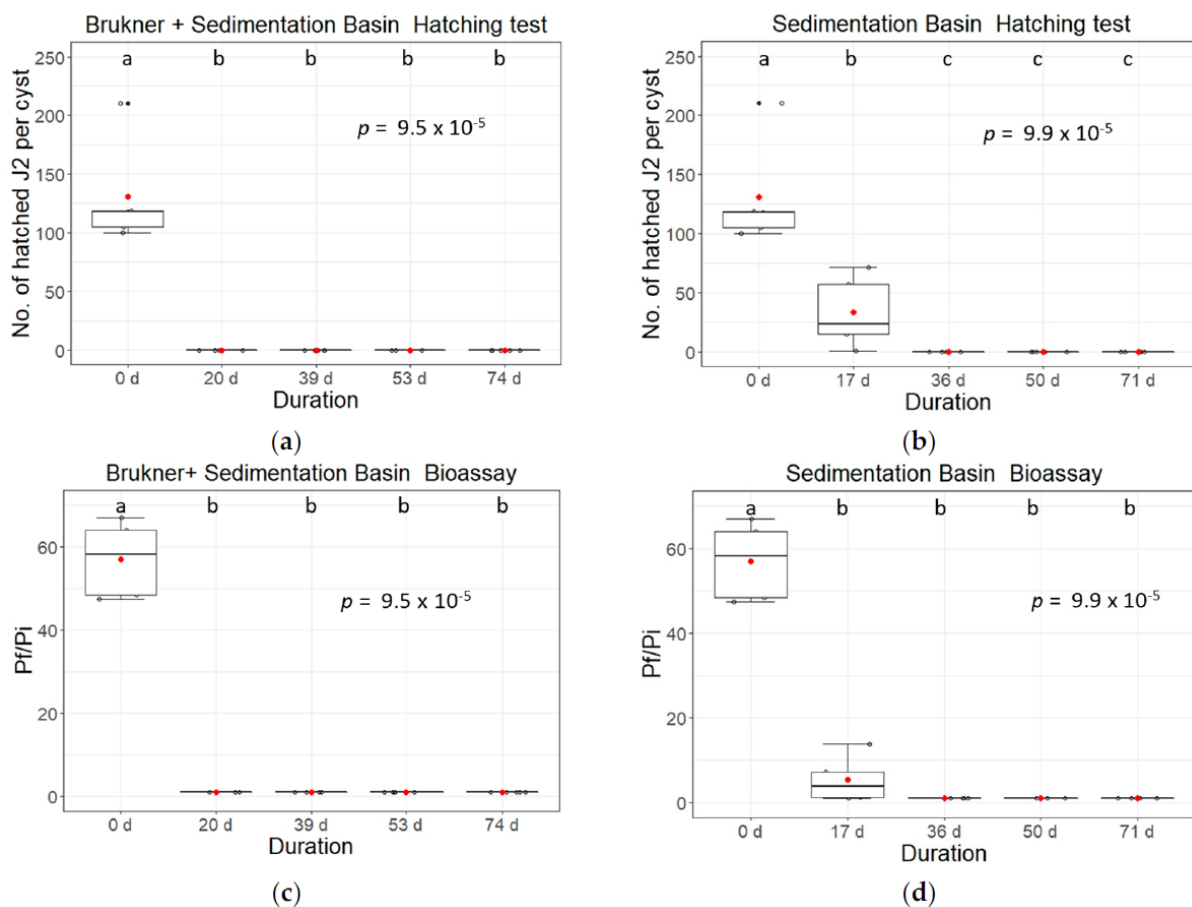
Parallel zu den Praxisversuchen in den Anlagen zur Resterdebehandlung der Zuckerfabrik Uelzen wurden eine Reihe von Versuchen im Labormaßstab zu einzelnen Einflussfaktoren der anaeroben Überstauung durchgeführt. Die Schlupfaktivität von *G. pallida* war bereits in trockenem, nicht überstauten Boden und in Wasser etwas vermindert verglichen zur Kontrolle mit luftexponierten Zysten. Die Überstauung zeigte bereits nach 6 Wochen eine Inaktivierung der Zysten zwischen 97 – 100%. Dies erfolgte unabhängig von Bodenart bzw. Bodentyp (Parabraunerde, Sand) und luftdichtem Gefäßabschluss (**Abb. 23**).



**Abbildung 23:** Effekte der Faktoren Bodenart und künstlicher Luftabschluss des Behandlungsgefäßes ermittelt in zwei unabhängig wiederholten Untersuchungen (Experimente 1 und 2) auf die Schlupffähigkeit von Zysten nematoden am Beispiel von *G. pallida*. Mittels Inundation (Gefäße überstaut und zusätzlich mit Deckel verschlossen; wet\_sand/soil\_closed) konnte eine statistisch belegte hohe Wirksamkeit zur Inaktivierung der Zysten nematoden unabhängig von Bodenart und künstlichem Luftabschluss der Behandlungsgefäße innerhalb von 6 Wochen im Vergleich zu den nicht überstauten Kontrollen (dry\_open, dry\_sand\_open und dry\_soil\_open) erzielt werden, nicht jedoch zu den Gefäßen, die überstaut und unverschlossen (wet\_sand/soil\_open) behandelt wurden, wobei letzteres dafür spricht, dass eine Überstauung *per se* auch unverschlossen als Inundation wirksam ist. (Quelle: Berger *et al.* 2022).

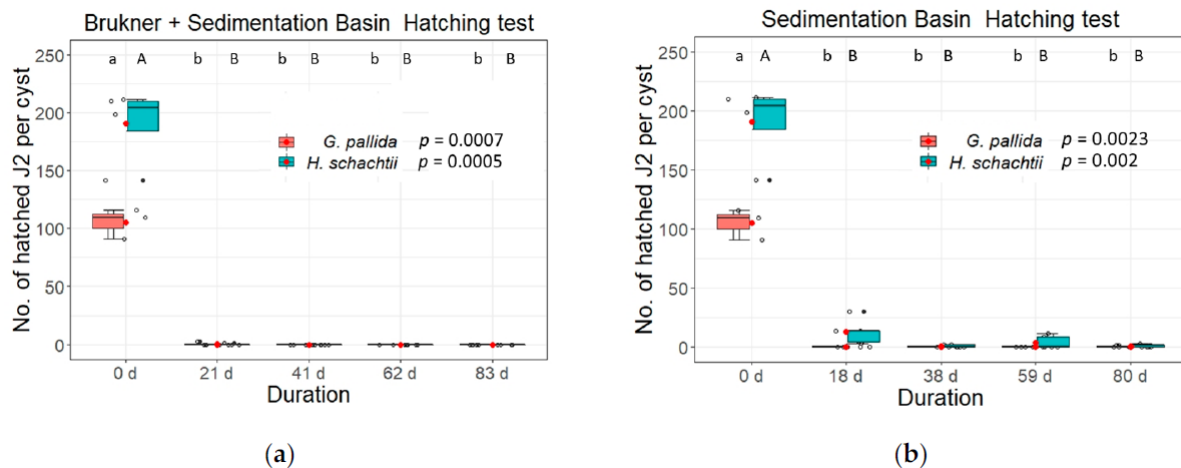
Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss stark basischer pH-Werte allein keinen sicheren Behandlungserfolg erzielte. Während Basen mit einer Äquivalenzzahl von 1 wie KOH für ein eingestelltes Spektrum von pH 7,8 bis 12 eine Erhöhung des Juvenilenschlupfes im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufwiesen, war CaOH<sub>2</sub> (Kalkmilch) mit Äquivalenzzahl (Normalität) von 2 reaktiven Teilen pro Basenkation hochwirksam zur Nematodeninaktivierung (siehe Berger *et al.* 2022). Milchsäure (Lactat) als mikrobielles Abbauprodukt von Kohlenhydraten zeigte ebenfalls eine hohe Wirksamkeit zur Inaktivierung des Nematodenschlupfes. Bei gleicher Behandlungsdauer wurde bereits nach 7 Tagen eine durchschnittlich Schlupfreduktion von 70 % bei in 5-prozentiger Lactatlösung inkubierten Zysten beobachtet, wobei eine Inkubation in praxisferner 10-prozentiger Lactatlösung den Schlupf der Juvenilen auf null reduzierte (detaillierte Ergebnisse dargestellt in Projektdatenpublikation Berger *et al.* 2022). In den Untersuchungen im Praxismaßstab konnte belegt werden, dass eine Überstauung der Resterde im Stapelteich auf die eingebrachten Referenzzysten nach einer Zeitspanne von 36 Tagen eine zu 100% erfolgreiche Inaktivierung der Nematoden hat, die sowohl in Schlupf- als auch Biotest sicher belegt wurden. Dies wurde bereits im ersten Versuch während der Verarbeitungskampagne 2018/2019 nachgewiesen (**Abb. 24**) und konnte im zweiten Versuchsdurchlauf in der Kampagne 2019/2020 für alle drei Zysten nematodenarten bestätigt werden. Während der ersten Kampagne wurden nur PCN berücksichtigt, wobei die Zysten von *H. schachtii* beim

Transport ohne umgebende Bodenmatrix unter Luftinfluss von Elsdorf an das JKI nach Braunschweig und weiter zur Zuckerfabrik Uelzen bereits vor dem Einsetzen in die Stapelteiche in ihrer Lebensfähigkeit irreversibel geschädigt waren, was aus dem kompletten Verlust der Schlupffähigkeit der Kontrollen ersichtlich wurde. Für den zweiten Versuchsdurchlauf wurden Zysten dieser Art daher während des Transportes via Overnight Express in feuchtem Zustand in Rohlöß erhalten (Gazebeutel mit Zysten in verschlossenem, gekühlten Transportgefäß mit feuchten Gewebetücher) und unmittelbar in die Teiche eingesetzt. Aus den Daten der Kampagne 2019/2020 zeigte sich, dass intakte Zysten von *H. schachtii* bei ausschließlicher Behandlung im Stapelteich (Sedimentationsbecken) auch nach 59 Tage noch vereinzelt lebensfähige Nematodeneier enthielten (**Abb. 25**). Über beide Kampagnen/ Versuchsdurchläufe hinweg konnte für alle untersuchten Zystennematodenarten eindeutig gezeigt werden, dass der reguläre Verarbeitungsprozess mit Einengung der mit Kalkmilch angereicherten Resterde aus der Rübenverarbeitung (pH 11,5) im Bruknerbecken und anschließender Überführung des Resterdeschlammes in die Stapelteiche eine Inaktivierung der Schlupfaktivität zu 100% bereits zum Termin der ersten Probenahme nach 3 Wochen bewirkt (**Abb. 24** und **25**).



**Abbildung 24:** Ergebnisse von Schlupftest (**a, c**) und Biotest (**b, d**) behandelter Nematodenzysten von *G. pallida* während der Kampagne 2018/2019 in den Anlagen zur Resterdebehandlung der Zuckerfabrik Uelzen. Es konnte gezeigt werden, dass eine

kombinierte Behandlung in Bruknerbecken und Stapelteich eine komplette Schlupfinaktivierung (**a**) bzw. Unterbindung der Nematodenreproduktion im Biotest (**c**) zu allen Probenahmezeitpunkten aufwies. Eine Behandlung ausschließlich im Stapelteich (**b, d**) mit pH 6,7 unter nachgewiesenen anaeroben Bedingungen, wies lediglich zum Zeitpunkt der ersten Beprobung eine Restaktivität in den Zysten auf und war zu jeder späteren Entnahme zu 100% wirksam. Schlupf und Biotest zeigten annähernd kongruente Bewertungsergebnisse der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit der Nematoden. Wie in allen Behandlungsverfahren wurden aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung der Schlupf- und Biotestergebnisse nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Tests als robustes Testverfahren für diese Form der Werteverteilung zur statistischen Auswertung durchgeführt (Quelle: Berger *et al.* 2022).



**Abbildung 25:** Ergebnisse des Schlupftestes zur Bewertung der Behandlungswirkung von Bruknerbecken und Stapelteich in aufeinanderfolgender Kombination (**a**) und ausschließlich im Stapelteich während der Rübenverarbeitungskampagne 2019/2020. Dabei konnte gezeigt werden, dass in beiden Verfahrensführungen keine Aktivität von *G. pallida* über alle Entnahmezeitpunkte hinweg zu beobachten war. Demgegenüber erwiesen sich die für die unter Luftexposition als anfällig erkannten Rübenzystennematoden als widerstandsfähiger mit Restaktivitäten bei ausschließlicher Behandlung im Stapelteich (**b**) über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg. (Abbildung aus Berger *et al.* 2022)

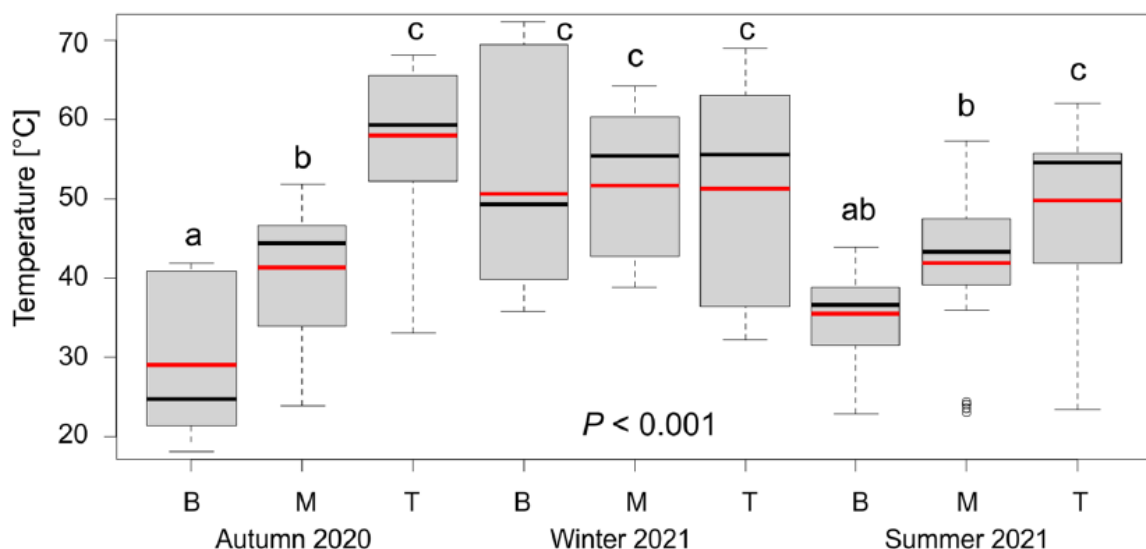
Die höhere Widerstandsfähigkeit der Rübenzystennematoden konnte zudem durch Entnahme zufälliger Schlammproben der Teiche im Zeitraum von 2019 bis 2021 mit regulär im Boden vorhandenen Rübenzystennematoden und vereinzelt gefundenen PCN Zysten (ausschließlich als *G. pallida* bestimmt) belegt werden. Während ein Teil der Zysten von *H. schachtii* noch lebensfähige Eier besaß, waren alle insgesamt 27 aus dem Schlamm extrahierten Zysten von *G. pallida* abgetötet.

## AP2 – Kompostierung

Kompostierung im Praxismaßstab ist ein zusammengesetzter Prozess, der neben der eigentlichen Kompostierung unter Anwesenheit von Sauerstoff auch immer vorgeschaltete anaerobe Prozesse, die als Fermentierung bezeichnet werden, einschließt. In der von uns im Kompostwerk Bützberg untersuchten „Kompostierung“ war es zudem nicht möglich, im laufenden Prozess Resterden gezielt in die Anlagen einzubringen. Während die anaeroben Prozesse in der Fermentierung relativ konstant bei Temperaturen um 40°C erfolgen, wird die

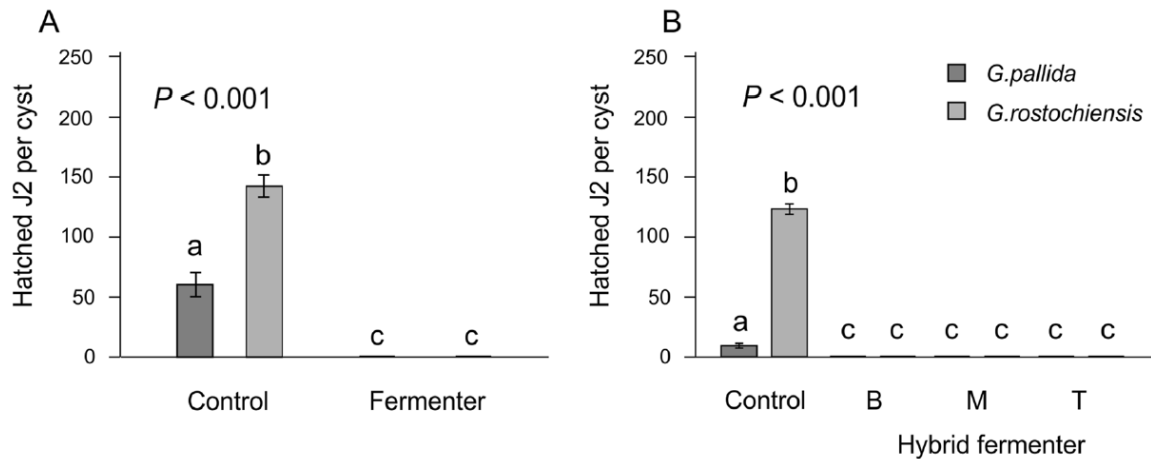


Wärmeentwicklung auf  $>65^{\circ}\text{C}$  während der aeroben Kompostierung als einer der essentiellen Behandlungsfaktoren betrachtet. Bei den 3 durchgeführten Behandlungen wurde die höchste Temperaturentwicklung im Winter 2021 beobachtet, während durchschnittlich über alle Positionen der Kompostmiete hinweg vergleichbare Temperaturen im Sommer- und Herstdurchlauf zu verzeichnen waren. Dies ist vor allem durch die zusätzliche Warmluftzufuhr in die Miete während der Wintermonate bedingt. Vor allem die bodennahen Schichten des Bioabfalls in der Miete waren mit durchschnittlich  $43,8^{\circ}\text{C}$  am kältesten. Durch die Rotation des Materials im regulären Arbeitsprozess der Anlage wird der Abfall in der Regel über einen Zeitraum von mindestens je 3 Tagen in den wärmeren mittleren ( $\sim 57^{\circ}\text{C}$ ) und oberen Schichten ( $63\text{-}68,1^{\circ}\text{C}$ ) gelagert. Über das Versuchsdesign im Herbst 2020 von in der Kompostierung permanent in einer der 3 Schichten gelagerten Proben hat ein Drittel der Referenzzysten keine Temperaturbehandlung von  $>45^{\circ}\text{C}$  erfahren (**Abb. 26**).



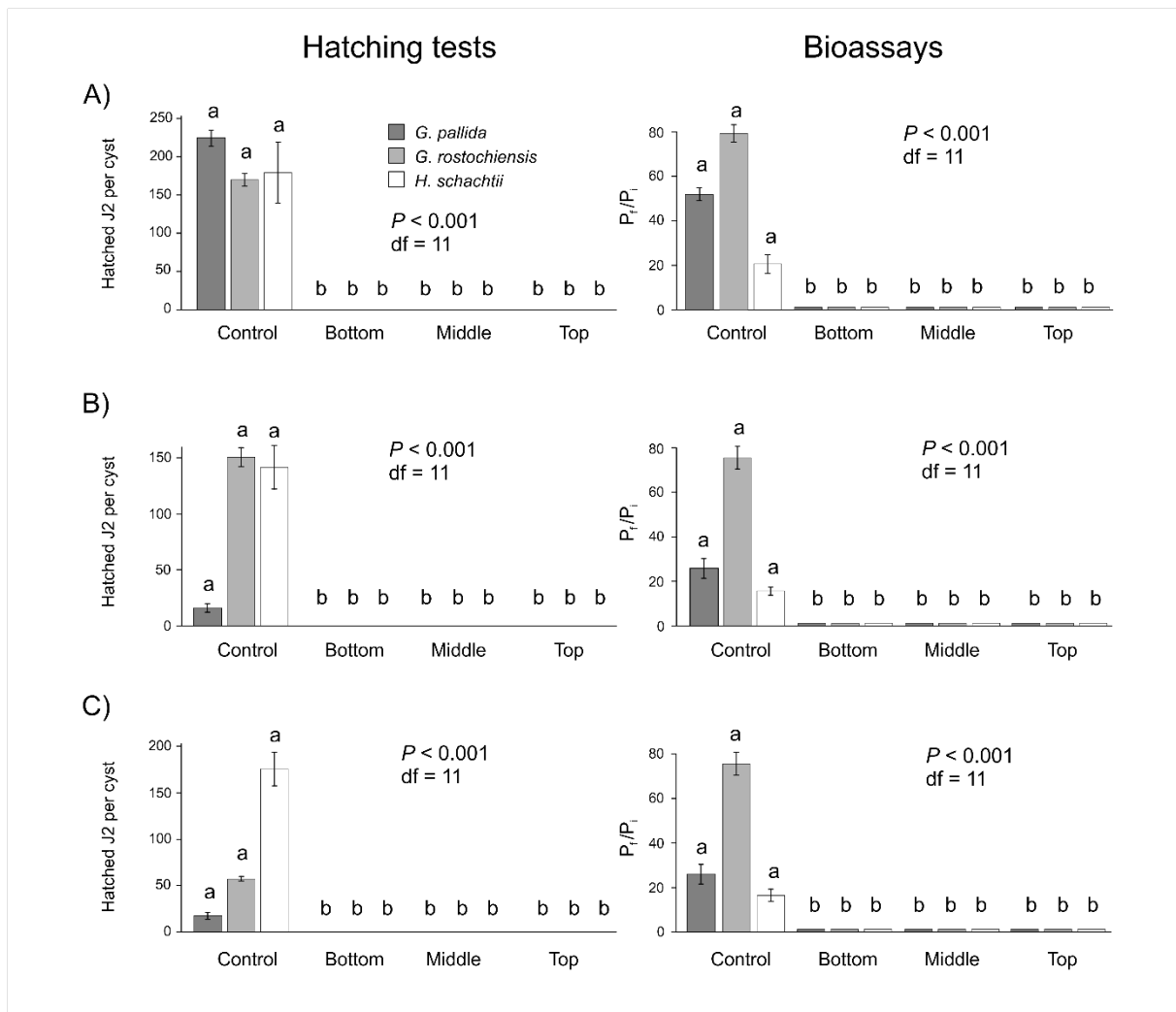
**Abbildung 26:** Mittlerer Temperaturverlauf in den verschiedenen Positionen der Kompostmiete, untere (B), mittlere (M) und obere Schicht (T). Deutlich zu erkennen ist, dass in einzelnen Bereichen/Schichten der Miete eine Temperatur von über  $50^{\circ}\text{C}$  in 75% der Proben aus der jeweiligen Schicht, dargestellt durch die Boxen, nicht erreicht worden ist; Signifikante Unterschiede in der auf normalverteilten Daten beruhenden ANOVA mit anschließendem Tukey's PostHoc Test sind durch verschiedene Buchstaben über den Box-Whisker-Plots dargestellt (Quelle: Schumann *et al.* 2023)

Für die Einzelprozessbetrachtung (Fermentation und Kompostierung) wurde ein Behandlungserfolg in beiden Teilverfahren, separat ermittelt, für Fermentation, Kompostierung und den kompletten Durchlauf der Referenzzysten durch beide Prozesse, mit Inaktivierung der Nematodenzysten von *G. pallida* und *G. rostochiensis*, zu jeweils 100% erreicht (**Abb. 27 und Abb. 28** ausschließlich zu den Ergebnissen der Kompostierung).



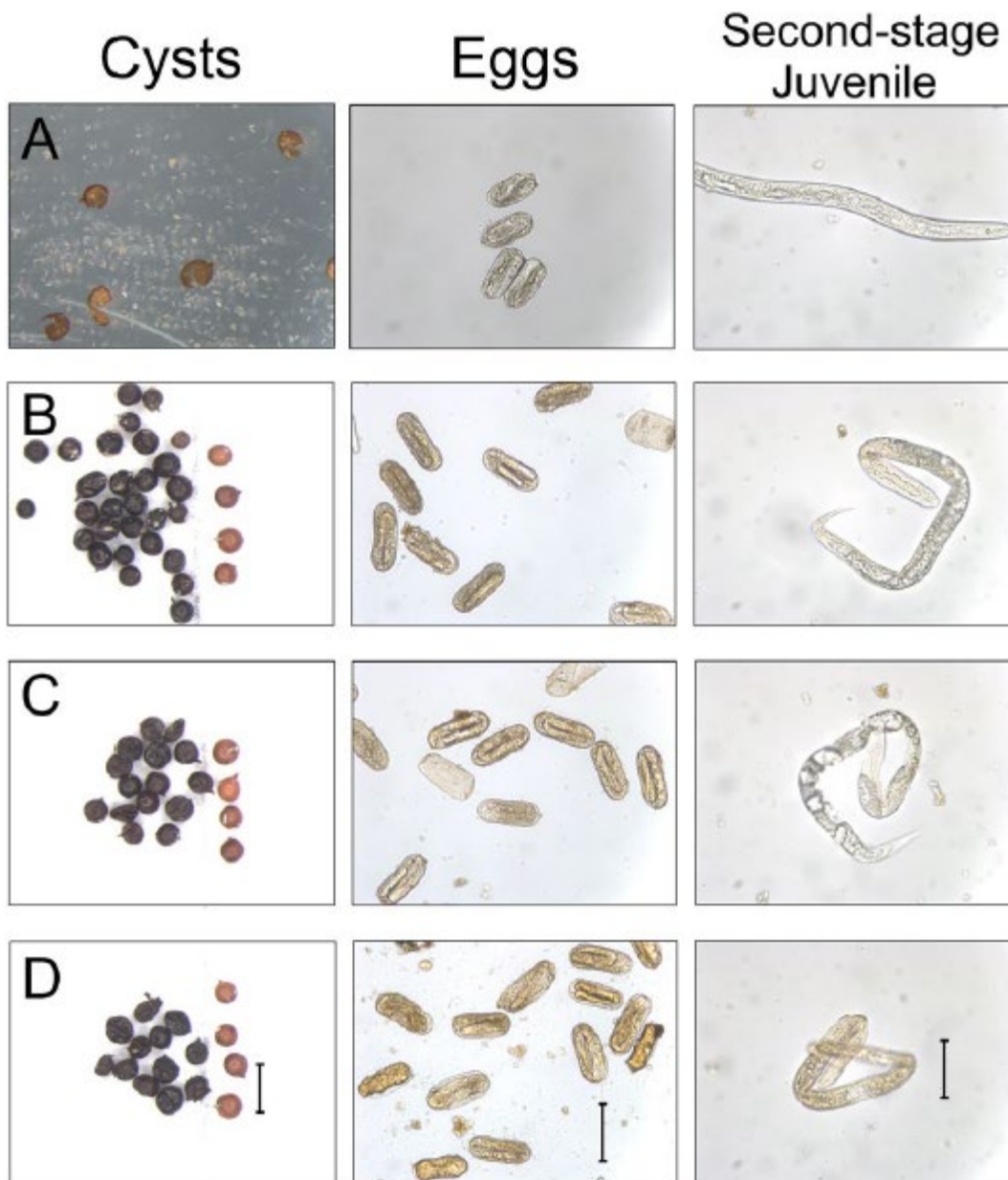
**Abbildung 27: A)** Ergebnisse des Schlupftests für im Fermenter behandelten Nematodenzysten beider PCN-Arten und **B)** nach Passage der Referenzzysten durch den Gesamtprozess der anaeroben Fermentation und aeroben Kompostierung im Hybridfermenter. Für den Einzel- und Gesamtprozess konnte keine Schlupfaktivität nach erfolgter Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Verschiedene Positionen in der Kompostmiete: untere (B), mittlere (M) und obere Schicht (T). (Quelle: Schumann *et al.* 2023)

Eine Behandlung ausschließlich durchgeführt im Prozess der aeroben Kompostierung führte für Referenzzysten aller drei Nematodenarten ebenfalls zu einer vollständigen Inaktivierung der mittels Schlupftest bewerteten Referenzzysten über alle Versuche und Mietenpositionen hinweg (**Abb. 28**). Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass in etwa 20% der Proben von *H. schachtii* ein minimaler Anstieg des  $P_f/P_i$  Quotienten im Biotest von bis zu 4% Reproduktion zu verzeichnen war, während die Biotestergebnisse für beide *Globodera*-Arten keine Reproduktion zeigten.



**Abbildung 28:** Ergebnisse aus Schlupftest (*hatching test*) und Biotest für Referenzzysten von *G. pallida*, *G. rostochiensis* und *H. schachtii* nach Behandlung mittels Kompostierung über drei zeitlich getrennte Versuchsdurchläufe (**A**: Herbst 2020; **B**: Winter 2021 und **C**: Sommer 2021) in drei verschiedenen Positionen innerhalb der Kompostmiete (n = 4 pro Position; Basis (B), Mitte (M), Spitze (T)); Statistische Unterschiede wurden berechnet mittels Kruskal-Wallis-Tests für die Schlupf- und Biotests, wobei Unterschiede zwischen den Untergruppen mittels Dunnett's-PostHoc-Test bestimmt wurden und durch verschiedene Buchstaben über den Säulen dargestellt wurden (Quelle: Schumann *et al.* 2023).

Der Behandlungserfolg in den Einzelprozessen kann auch durch morphologische Veränderungen, die beim Absterben der Nematoden auftreten, belegt werden (**Abb. 29**). Der Inhalt der Zysten war dabei größtenteils zerstört und die meisten der nicht geschlüpften Eier enthielten eine bräunliche Masse (**Abb. 29 D**, Mitte). Nach dem Aufschneiden der Zyste und der Entfernung der Eischale durch leichten Druck zeigten die Jungtiere typische Mortalitätsmerkmale, wie Vakuolenbildung in der Leibeshöhle und Verformungen des Körpers. Über den Untersuchungszeitraum während einiger Minuten verdunkelte sich der Inhalt der Eier und ein Kollabieren der J2, sichtbar in einer stark gewinkelten Körperhaltung, konnte beobachtet werden.

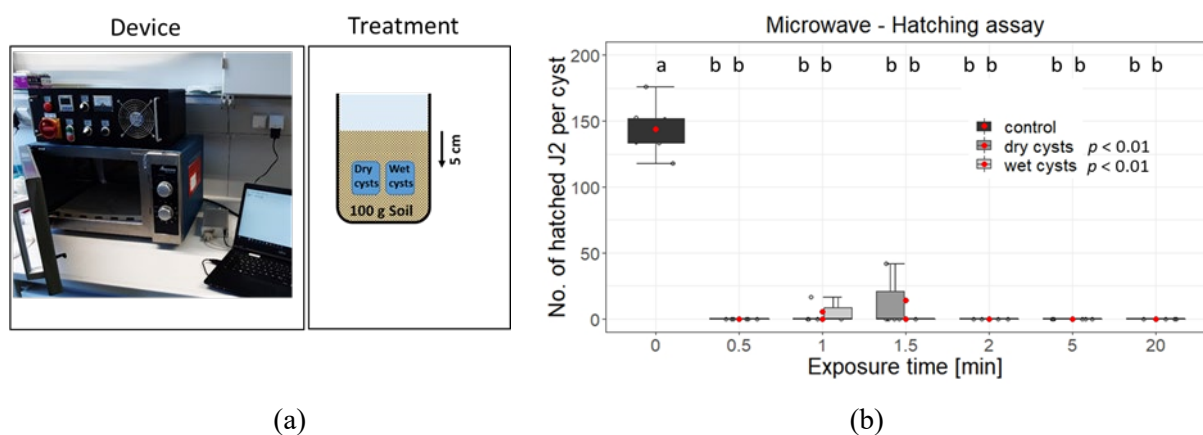


**Abbildung 29:** Unbehandelte Kontrollzysten, Eier und Juvenile (**A**, v.l.n.r.) im Vergleich zu Tieren nach Abschluss der Fermentation (**B**), ausschließlich der Kompostierung ausgesetzten Zysten (**C**) sowie von Zysten, die den kompletten Behandlungsprozess durchlaufen haben (**D**). Der Maßstabsbalken dargestellt unter **D** gibt eine Länge von 1 mm bei 20x Vergrößerung im Stereomikroskop für Zysten (links) sowie von 100 µm bei 400x Vergrößerung im Lichtmikroskop (mittlere und rechte Abbildungsreihe) von Eiern und Juvenilen wieder (Quelle: Schumann *et al.* 2023).

## AP2 – Thermische Behandlungsverfahren

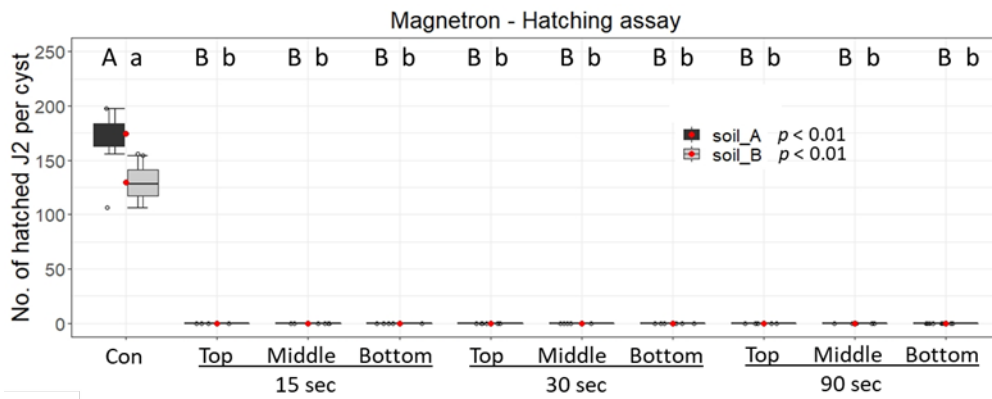
Mikrowellenstrahlung stellt im Vergleich zur Dämpfung und Trockenerhitzung das Verfahren mit der schnellsten Wärmeübertragung auf zu behandelnde Resterde dar. Im ersten Schritt wurden daher die Letalitätsparameter Behandlungstemperatur und –zeit mittels Mikrowellenbestrahlung ermittelt. Im Labormaßstab unter Verwendung von Referenzzysten von *G. pallida* in 100 g Resterde (Schichtdicke im Becherglas 5 cm) wurde mittels einer

modifizierten Haushaltsmikrowelle eine Temperatur von 80°C voreingestellt und das Verfahren hinsichtlich Behandlungszeit und dem damit verbundenen Energieaufwand und die Wirksamkeit ermittelt. Mit dieser Temperatur war es möglich, bereits 30 sec (15 sec, nicht dargestellt) nach Erreichen von 80°C eine vollständige Abtötung der Referenzzysten zu erzielen (**Abb. 30**). Jedoch zeigte sich auch hier, wie in allen anderen Behandlungsverfahren, dass eine homogene Behandlung der Bodenmatrix gemessen am Behandlungserfolg nicht immer erzielt werden kann, was jedoch nicht auf die generell schwerer zu bekämpfenden Referenzzysten im trockenen Zustand allein zurückzuführen ist. Es wurden unabhängig vom Feuchtegehalt der Referenzzysten Überlebensraten von über 5% im Vergleich zur Kontrolle in einzelnen technischen Replikaten beobachtet.

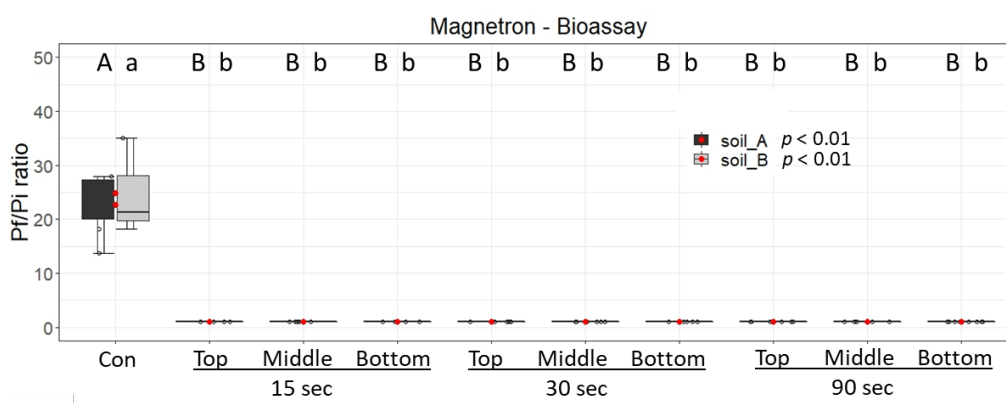


**Abbildung 30:** Versuchsanordnung zur Bestimmung letaler Behandlungsbedingungen im thermischen Verfahren der Mikrowellenbestrahlung (a) und Ergebnisse einer Behandlung bei 80°C für Zeitspannen von 30 sec bis 20 min in einer Haushaltsmikrowelle mit annähernd gleichmäßiger Bestrahlung der Behandlungsfläche (b); Es wurden pro Zeitspanne nach Erreichen der Behandlungstemperatur drei Versuche mit je 20 Zysten von *G. pallida* im trockenem und 2 d vorgeweichem Zustand durchgeführt, wobei alle Behandlungszeiten einen statistisch wirksamen Effekt zur Bekämpfung der Nematoden verglichen zur unbehandelten Kontrolle aufwiesen (Quelle: Berger et al. *in progress*).

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch im Praxismaßstab der Behandlung im Mikrowellentunnel erzielt. Hier konnte bei gleichmäßiger Behandlung der auf dem Förderband im Tunnel platzierten Proben eine vollständige Abtötung der Referenzzysten unabhängig von der voreingestellten Bodenfeuchte (16% und 23%) erreicht werden. Der Behandlungserfolg wurde mittels Schlupf- und Biotest belegt (**Abb. 31**).



(a)

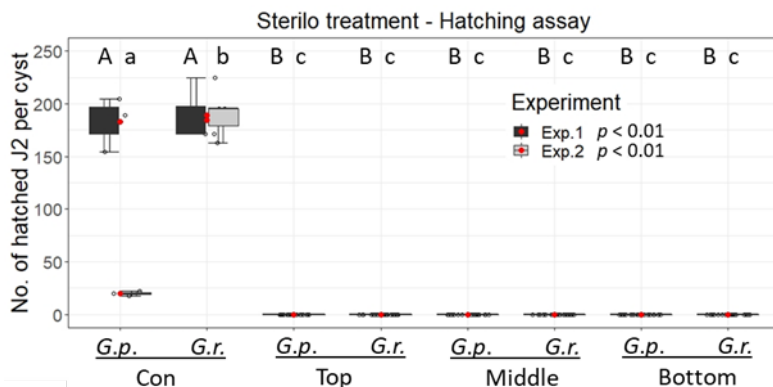


(b)

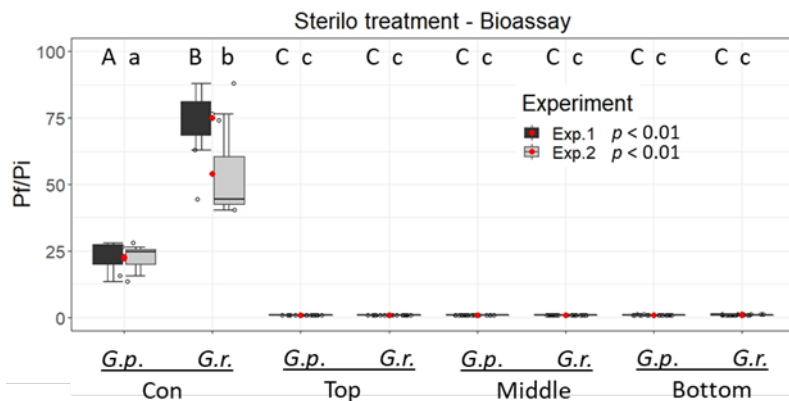
**Abbildung 31:** Anzahl geschlüpfter Juvenile von *G. pallida*, als der am häufigsten in Deutschland vertretene PCN-Art, (a) und Reproduktion der Tiere im Biotest (b) nach einer Behandlung von 15, 30 und 90 sec im Mikrowellentunnel verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Jede Behandlungsdauer wurde dabei dreifach in Böden mit verschiedenem Feuchtegehalt untersucht. Es wurde zu keinem Zeitpunkt eine Schlupf- bzw. Reproduktionsaktivität (letztere dargestellt als  $P_f/P_i$  Quotient) nach erfolgter Behandlung festgestellt (Quelle: Berger et al. *in progress*)

Das Plattenheizgerät STERIL<sup>®</sup> wurde nach Einsetzen der Referenzzysten von *G. pallida* und *G. rostochiensis* in das mit 0,5 m<sup>3</sup> Parabraunerde befüllte Gerät auf eine Temperatur von 80°C eingestellt. Im Temperaturverlauf wurde in zwei Behandlungen zu verschiedenen Zeitpunkten bei Außentemperaturen im frostfreien Bereich (jeweils zwischen 0,5° und 4°C) der Temperaturverlauf im Gerät in verschiedenen Tiefen (8 cm, 15 cm und 33 cm) ermittelt. Dabei wurde eine Erwärmungszeit von etwa 3 h bis zum Erreichen der Maximaltemperatur ( $T_{max}$ ) und eine Abklingzeit bis zum Erreichen von  $T < 50^\circ\text{C}$  von etwa 4,5 h benötigt. Die erreichte  $T_{max}$  im mittleren Bereich war zur am Gerät eingestellten Temperatur mit im Mittel 88,9°C erhöht, im oberen und unteren Bereich jedoch mit Temperaturen unter 80°C (71,3°C, 68,1°C) zu niedrig. Aufgrund der Länge des Behandlungsprozesses wurde trotz der teilweise geringeren Temperaturen, denen die Referenzzysten ausgesetzt waren, eine vollständige Abtötung aller Nematoden, ermittelt im Schlupf- und Biotest, erzielt (**Abb. 32**). Während des

3-stündigen Aufheizungsprozesses wurde ein Energieverbrauch von 17 KWh (Experiment 1, 2020) und 16 KWh (Experiment 2, 2021) ermittelt.



(a)

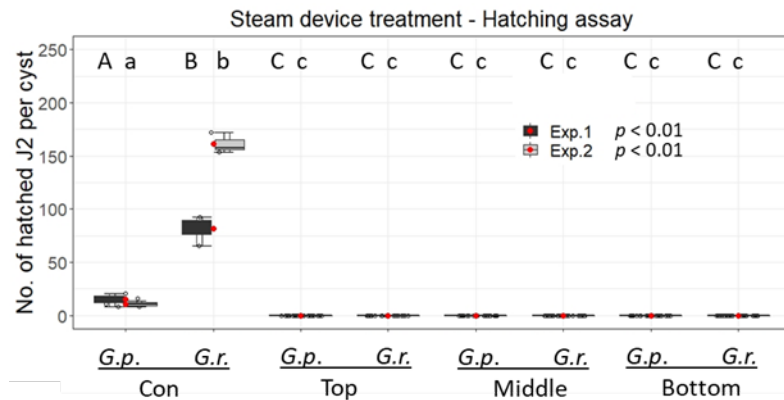


(b)

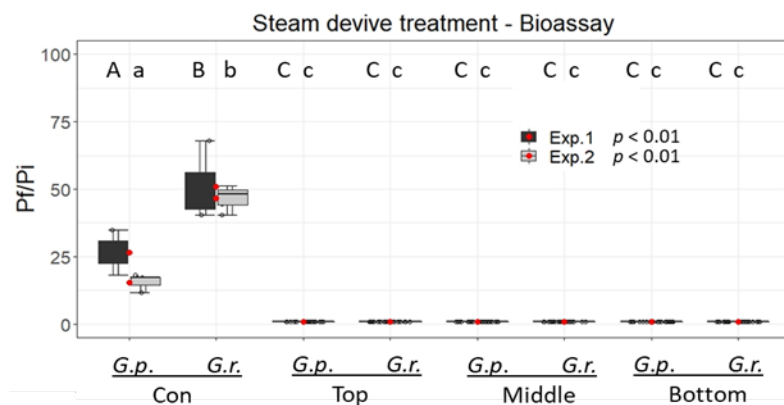
**Abbildung 32:** Ergebnisse der Behandlung im Plattenheizgerät STERILLO® mit einer am Gerät eingestellten Temperatur von 80°C für einen Behandlungszeitraum von etwa 8 h in verschiedenen Tiefen; 20 Zysten pro Gazebeutel PCN-Art an jeweils 12 verschiedenen Punkten pro Tiefenstufe wurden behandelt. Es wurde eine vollständige Abtötung aller im Gerät behandelten Referenzzysten sowohl im Schlupftest (a) als auch im Biotest (b) beobachtet. *G.p.* *Globodera pallida*, *G.r.* *G. rostochiensis* (Quelle: Berger et al. *in progress*).

Die thermische Behandlung mittels Dämpfung, der Einleitung von heißem Wasserdampf zur zu behandelnden Resterde mit den darin in drei verschiedenen Tiefen analog zum STERILLO® eingebrachten Referenzzysten, wurde ebenfalls für *G. pallida* und *G. rostochiensis* in zwei separaten Versuchen 2020 und 2021 durchgeführt. Essentiell für diese Form der Behandlung ist das Einfüllen körniger nicht zu feuchter Erde, die vom Wasserdampf durchdrungen werden kann. Der Erhitzungsprozess der über den Dampf in die Erde geleiteten Wärme dauerte etwa 1 h bis zum Erreichen von 91,6° in der mittleren Schicht nahe des Dampfeinlasses, der außerhalb der Bearbeitungskammer direkt im Gerät erzeugt wurde und 3,5 h im oberen Bereich, wobei hier Temperaturen zwischen 68,4°C und 82,7°C erreicht wurden. Der Energieverbrauch dieses Verfahrens lag mit 44 KWh in 2020 und 56

KWh in 2021 erheblich höher als im Trockenerhitzungsverfahren einer vergleichbaren Menge von Resterde (0,5 m<sup>3</sup>). Auch hier waren alle behandelten Referenzzysten im anschließenden Schlupf- und Biotest zu 100% inaktiviert (**Abb. 33**).



(a)



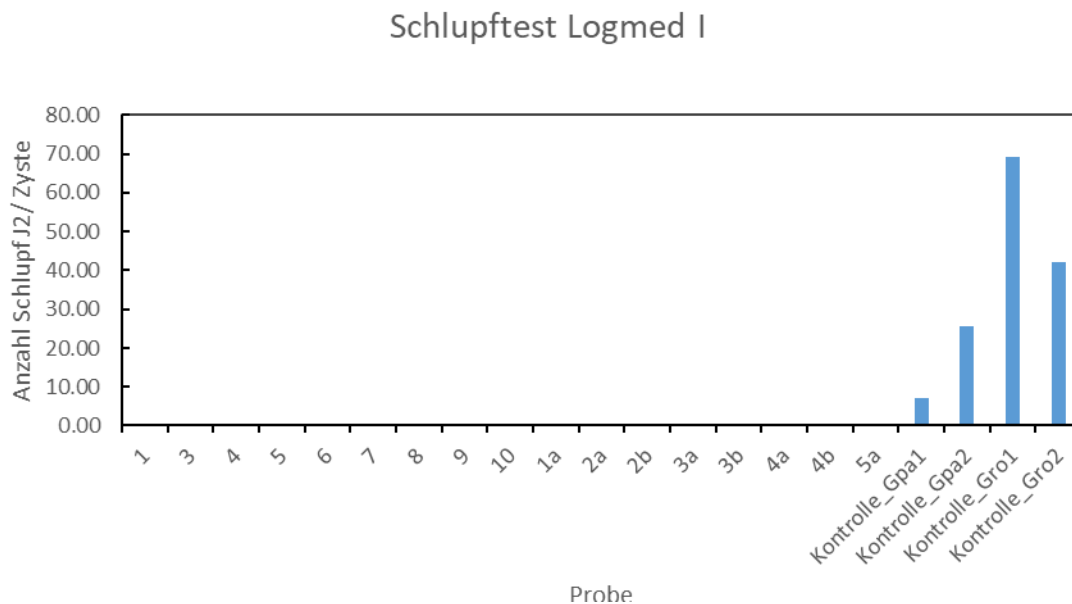
(b)

**Abbildung 33:** Ergebnisse im Schlupftest (a) und Biotest (b) für eine Behandlung von Referenzzysten der PCN-Arten mittels Dämpfung in zwei Versuchen in drei verschiedenen Bodenschichten mit jeweils 12 Wiederholungen pro Schichttiefe. Die Gazebeutel waren auch in diesen Untersuchungen mit je 20 Zysten versehen, die zu jeweils 10 Zysten in den beiden Methoden zur Bewertung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit im Vergleich zu mitgeführten unbehandelten Kontrollen untersucht wurden. Es war keine Schlupf- und Reproduktionsaktivität in behandelten Zysten zu beobachten (Quelle: Berger *et al. in progress*).

Für die Untersuchungen im Praxismaßstab mit dem gerät LOGMED I wurde eine Zieltemperatur von 105°C im ersten, 95°C im zweiten und 85°C im dritten Versuchsdurchlauf im System eingestellt. Allerdings wurde anhand der direkt an den Probekörpern befestigten Temperaturmessstreifen festgestellt, dass die Temperatur für alle ins System eingebrachten Proben mindestens 100°C mit einem Maximum von 110°C erreichte. Die minimale Durchlaufdauer betrug 30 min, die maximale Dauer 50 min bei einer mittleren Expositionszeit der Proben von 35 min. Von insgesamt 20 eingebrachten Probekörpern wurden 3 Proben



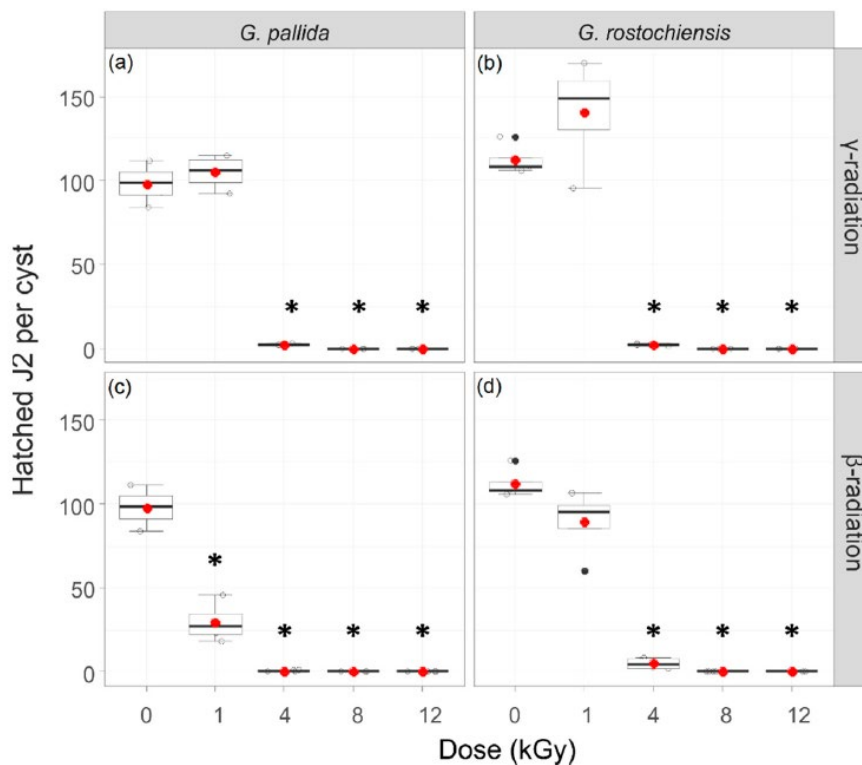
durch das Schneckenmahlwerk zerstört und waren nicht am Materialauslass auffindbar. Nach Durchführung des Schlupftests konnte auch für dieses System eine Wirksamkeit der Behandlung von 100% nachgewiesen werden (**Abb. 34**).



**Abbildung 34:** Wirksamkeit der Behandlung von Referenzzysten von *G. pallida* und *G. rostochiensis* die jeweils zu 10 Zysten pro Einzelprobe verpackt in Gazebeuteln untersucht wurden im Praxismaßstab des Gerätes LOGMED I. Die Zysten waren dabei für bis zu 50 min Temperaturen > 100°C ausgesetzt. Es konnte keine Schlupfaktivität in den behandelten für eine Zeitspanne von ca. 50 min behandelten Probenreplikaten von 1-10 sowie den nochmals unter kürzerer Behandlungszeit von <40 min behandelten Zysten beider Arten als Replikat 1a ff. dargestellt, nachgewiesen werden.

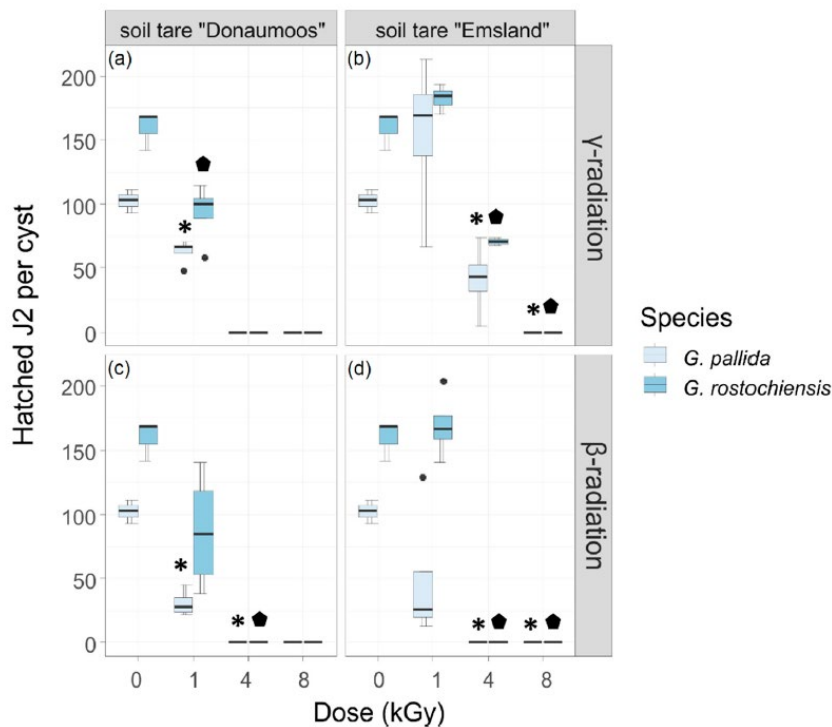
## AP2 – $\beta$ - und $\gamma$ Strahlenbehandlung

Eine Strahlendosis von >4 kGy wurde als Minimaldosis für eine wirksame Bestrahlung bei direkter Exposition von Referenzzysten beider PCN-Arten unabhängig von der Strahlungsart identifiziert. Eine Direktbehandlung der Tiere mit  $\gamma$ -Strahlung bei einer Strahlendosis von 1 kGy zeigte sogar einen schwachen Anstieg der Schlupfaktivität von *G. rostochiensis* zur unbehandelten Kontrolle der Art, wobei für *G. pallida* keine statistischen Unterschiede zu beobachten waren (**Abb. 35**). Bei  $\beta$ -Strahlung war eine Verminderung des Schlupfs von *G. pallida* auf etwa 30% zur Kontrolle zu verzeichnen, während die Schlupfaktivität von *G. rostochiensis* nicht statistisch verschieden zur Kontrolle, ebenfalls vermindert war. Bei einer Bestrahlung von Zysten in zwei verschiedenen Resterden (Parabraunerde aus dem Emsland [NI], Moorboden mit Mullanteil aus dem Donaumoos [BY]) hatte die für die Strahlen zu durchdringende Resterde eine nicht-signifikante Verminderung der an den Zysten erreichten  $\gamma$ -Strahlendosis zur Folge. Dies wurde indirekt belegt durch eine erhöhte Schlupfaktivität beider Nematodenarten bei 4 kGy in Parabraunerde, die eine höhere Dichte als mullhaltiger Boden des Donaumooses aufweist (**Abb. 36**).



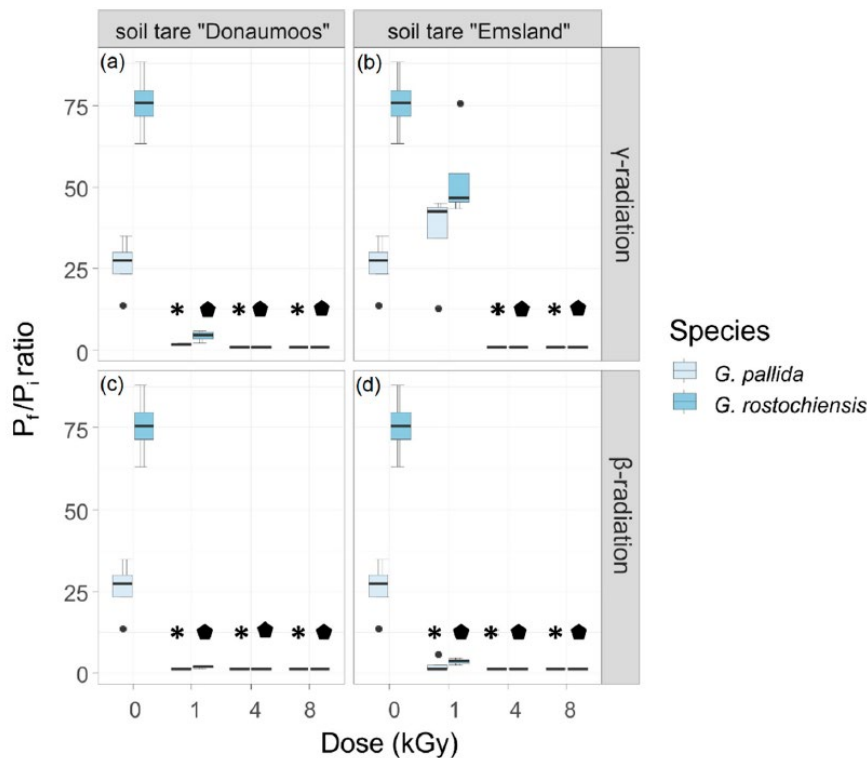
**Abbildung 35:** Schlupfaktivität pro Einzelzyste für Referenzzysten der Arten *G. pallida* und *G. rostochiensis* zur Bestimmung der letalen Behandlungsdosis für die Bestrahlungsarten  $\beta$ -Elektronenbestrahlung und  $\gamma$ -Strahlung; Die Zysten wurden verpackt in Gazebeutel und strahlendurchlässige Kartons versehen mit Dosimeterteststreifen direkt den Strahlenquellen ausgesetzt, bis eine Dosis von 1, 4, 8, oder 12 kGy erreicht war; Nach statistischer Auswertung mittels eines nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Wilcoxon-PostHoc Test zeigten die mit Stern markierten Plots statistische Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Quelle: Berger *et al.* 2022b).

Abgesehen von den Unterschieden für  $\gamma$ -Strahlung in Parabraunerde konnten die Ergebnisse zur Behandlungswirkung auf die Schlupfaktivität der Nematoden bei direkter Strahlungsexposition in den Untersuchungen zu in Erde eingebetteten Nematodenzysten bestätigt werden. Auch hier sind Strahlendosen  $>4$  kGy sicher wirksam zur Abtötung der Nematodenzysten. Zu beachten bleibt allerdings, dass eine weitere Erhöhung der zu behandelnden Schichtdicke des Bodens über die von uns untersuchten 10 cm hinaus, nicht untersucht wurde und bei höherer Schichtdicke eine Abnahme der Behandlungswirkung zu erwarten ist. Die Wirksamkeit von  $\beta$ -Elektronenstrahlung war dabei für beide Arten und Bodentypen etwas höher als die der  $\gamma$ -Strahlung, jedoch nicht statistisch verschieden.



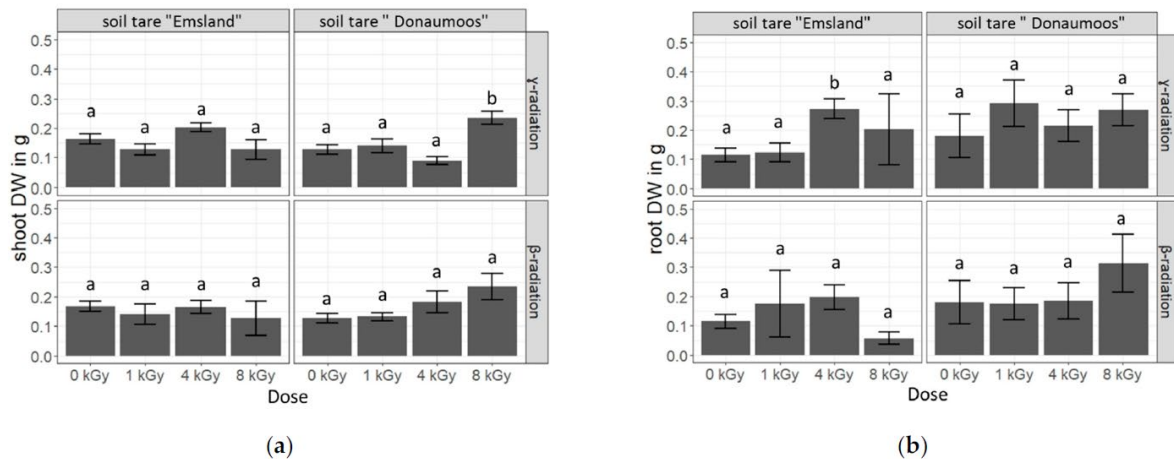
**Abbildung 36:** Schlupfaktivität von *G. pallida* und *G. rostochiensis* 10 cm überschichtet mit Böden mit Herkunft aus den beiden größten Kartoffelanbaugebieten Deutschlands (Emsland, Donaumoos); Eine Behandlung mit 4 kGy Elektronenstrahlung bzw. 8 kGy  $\gamma$ -Strahlung erzielte eine Wirksamkeit von 100% Inaktivierung des Juvenilenschlupfes (Quelle: Berger *et al.* 2022b).

Im Gegensatz zum Schlupftest waren Behandlungsdosen von 4-12 kGy mit einem völligen Verlust der Reproduktionsfähigkeit der Tiere im Biotest verbunden. Dies gilt sowohl für die direkt der Strahlung ausgesetzten Zysten als auch die mit Boden überschichteten Zysten beider Arten und Bodentypen. Auch die relativen Unterschiede von Schlupf- und Reproduktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen der beiden Methoden unter verschiedenen Strahlendosen, waren im Biotest erheblich höher als im Schlupftest. Daraus kann abgeleitet werden, dass ein erheblicher Teil der bei niedrigen Strahlendosen geschlüpften Tiere nicht reproduktionsfähig ist bzw. sich im Entwicklungsschritt der umweltbeeinflussten Geschlechterdifferenzierung von Entwicklungsstadium J3 zu J4 keine entwicklungsfähigen Weibchen ausbilden (**Abb. 37**).



**Abbildung 37:** Reproduktion von mit Boden überschichteten Referenzzysten beider PCN-Arten nach Bestrahlung mit verschiedenen Stärken; Für eine Strahlendosis von 4 kGy konnte im Unterschied zum Schlupftest keine Reproduktion der Nematoden beobachtet werden; Die Reproduktionsraten im Biotest sind auch für die geringere Dosis von 1 kGy deutlich vermindert gegenüber dem Schlupftest; Die Wirksamkeitsbewertung der Bestrahlung ist somit ein Beleg für die parallele Durchführung beider Methoden, Schlupf- und Biotest, um eine Beurteilung vornehmen zu können (Quelle: Berger *et al.* 2022b).

Bei der Bewertung der für das Pflanzenwachstum erforderlichen Bodeneigenschaften (Nährstoffverfügbarkeit, Mikrobiom) nach der Bestrahlung wurden im indirekten Ansatz der Einsaat von Mais in die behandelten Böden hinsichtlich der erreichten Spross- und Wurzelbiomasse keine negativen Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet (**Abb. 38**). Mit Ausnahme des mit 8 kGy mittels Elektronenstrahlung behandelten Bodens war in den meisten behandelten Böden ein Anstieg der pflanzlichen Biomasseproduktion zu verzeichnen, der u.a. bei einer Dosis von 8 kGy im Versuchsboden Donaumoos statistisch signifikant höher war als in der unbehandelten Kontrolle.



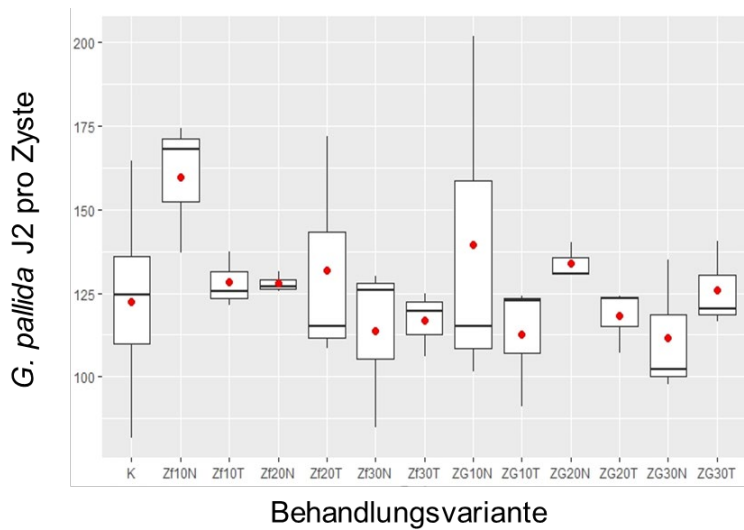
**Abbildung 38:** Biomasseproduktion von *Zea mays* in mit 1-8 kGy beider Strahlungsarten behandelten Böden im Vergleich zum unbehandelten Kontrollboden (0 kGy) nach 4 Wochen Wachstum; Dargestellt sind Trockengewicht von Spross (a) und Wurzel (b) für jeweils eine Pflanze in 4 randomisiert verteilt Replikaten pro Behandlungspunkt gewachsen in der Bodenmatrix „Emsland“ und Donaumoos“ nach Entnahme der Referenzzysten; Die statistische Bewertung der annähernd normalverteilten Daten wurde mittels ANOVA mit anschließendem Dunnett's PostHoc Test durchgeführt, wobei verschiedene Kleinbuchstaben signifikante Unterschiede zur Kontrolle (0 kGy) abbilden ( $p < 0,05$ ) (Quelle: Berger *et al.* 2022b).

## AP2 – Behandlung mit ozoniertem Wasser und Spaltprodukten von NaCl in wässrigen Lösungen

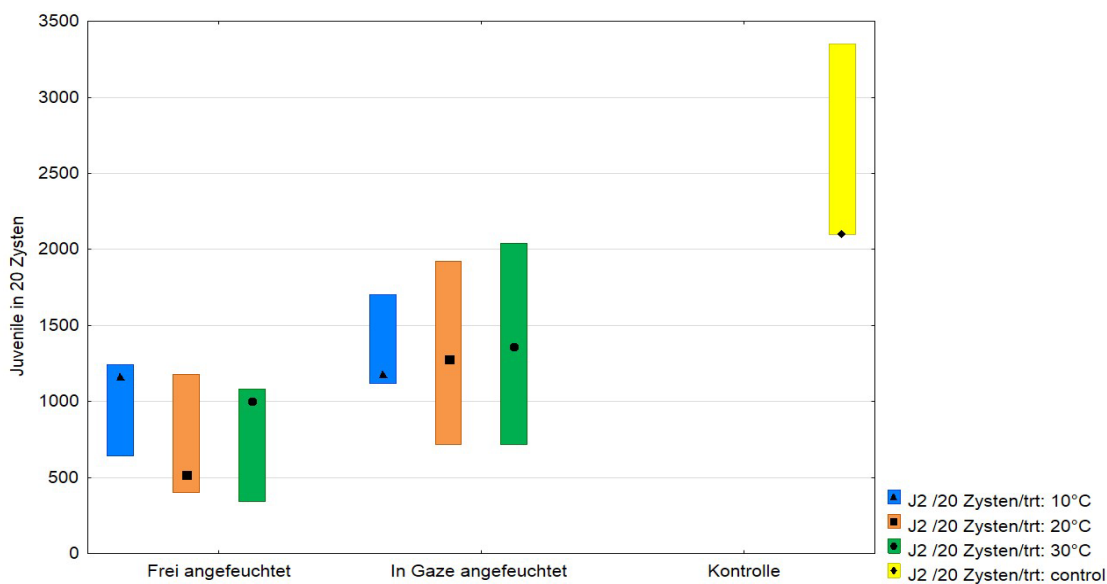
Es konnte in keinem der Versuche nach Behandlung der Zysten von *G. pallida* und *H. schachtii* ohne umgebende Resterdematrix eine Verminderung der Schlupfaktivität durch ozoniertes Wasser nachgewiesen werden. Im Gegenteil wurde für freischwimmende Zysten für das bei 10°C erzeugte ozonierete Wasser ein Anstieg der Schlupfaktivität festgestellt (**Abb. 39a**). Die dabei zu beobachtenden hohen Standardabweichungen der Replikate pro Behandlungsstufe mit zuvor angefeuchteten Zysten sind ein Hinweis auf einen nicht durch Wirtspflanzen induzierten Spontanschlupf der Juvenilen. Bei *H. schachtii* war zwar eine Verminderung des Schlupfs im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (**Abb. 39b**) jedoch lässt sich dieser eher auf die Sensitivität von Zysten der Art gegenüber trockenen Umgebungsbedingungen zurückführen als auf die eigentliche Behandlungswirkung.

Laut Angaben des Unterauftragnehmers, dem Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnik Braunschweig (IST), trat bei der Messung der Ozonkonzentration ein technisches Problem auf. Durch die Anreicherung von Bläschen in der Messküvette bei der Erzeugung ozonierten Wassers mit höherer Konzentrationen, konnte keine korrekte Messung der Ozonkonzentration erfolgen, da es zur unkontrollierten Verdrängung des ozonierten Wassers in der Küvette kam. Wie sich zeigte, wurde der Effekt der Bläschenbildung zusätzlich bei einem Temperaturanstieg verstärkt.

a)

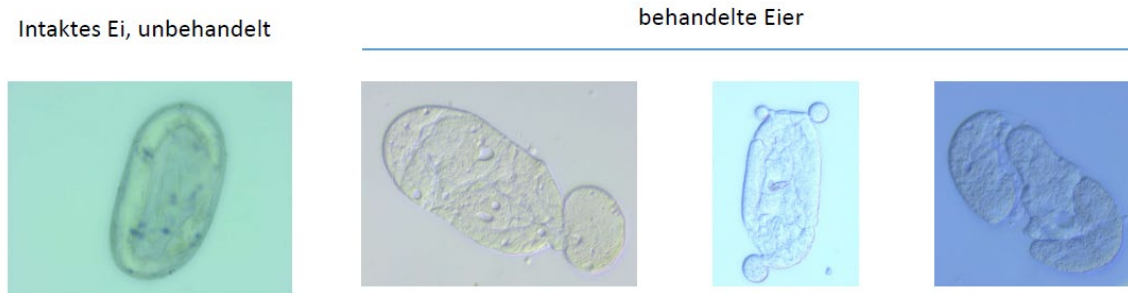


b)



**Abbildung 39:** Anzahl nach Behandlung mit ozoniertem Wasser selbstständig geschlüpfter J2 pro Zyste von *G. pallida* nach 7 Wochen Schlupfinduktion mit Kartoffelwurzeldiffusaten (PRD) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K); Es waren keine Unterschiede des physiologischen Zystenzustandes (trocken, angefeuchtet) bzw. der Einbringungsart der Zysten (frei/in Gazebeuteln) zu beobachten; Bei den meisten vor Behandlung angefeuchteten Proben wurde eine hohe Streuung der Werte beobachtet (a). Boxplot mit Median der Anzahl geschlüpfter Juvenile von *H. schachtii* für jeweils 20 Zysten aus unbehandelten und behandelten Zysten, die mit ZnCl<sub>2</sub>-Lösung zum Schlupf angeregt wurden (b). Für beide Arten (a, b) wurden pro Behandlungsstufe 3 Replikate untersucht (n=3)

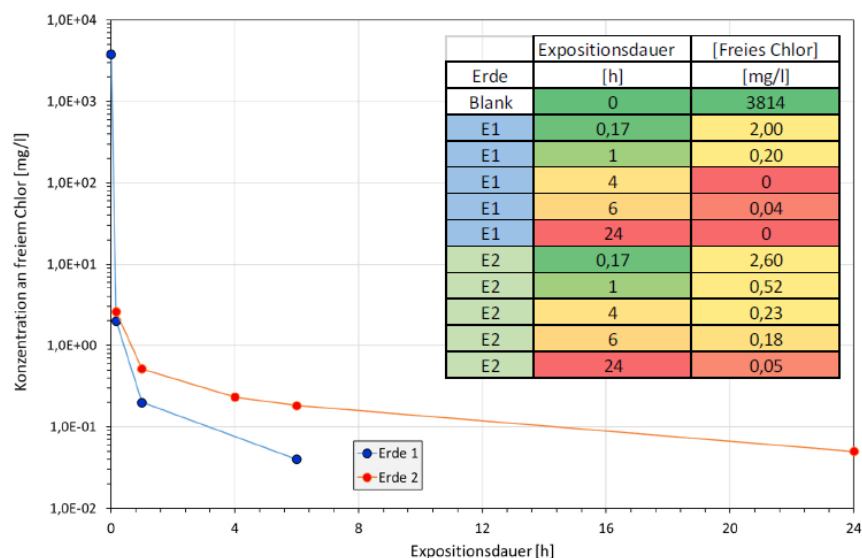
Eine direkte Behandlung der Zysten mit allen Konzentrationsstufen des aus der Aufspaltung von NaCl an der Diamantelektrode entstehenden Reaktionsgemisches mit verschiedener Konzentrationen von reaktivem „freiem Chlor“ hat Zysten und Eier konzentrationsabhängig in einem Zeitraum von 10 min bis 6 h komplett aufgelöst (**Abb. 40**).



**Abbildung 40:** Zustand der mit NaCl Spaltprodukten ( $c = 5\text{g/l}$ ) behandelten Zysten; Aus den Zysten extrahierte Eier von *G. pallida* vor der Behandlung (links) und nach Behandlung mit oxidativ wirksamen Lösungen aus der Spaltung von NaCl. Gut sichtbar ist die erfolgte Auflösung von Eihülle und zellulären Strukturen der juvenilen Nematoden, mit einzig verbleibenden hydrophoben Lipiden.

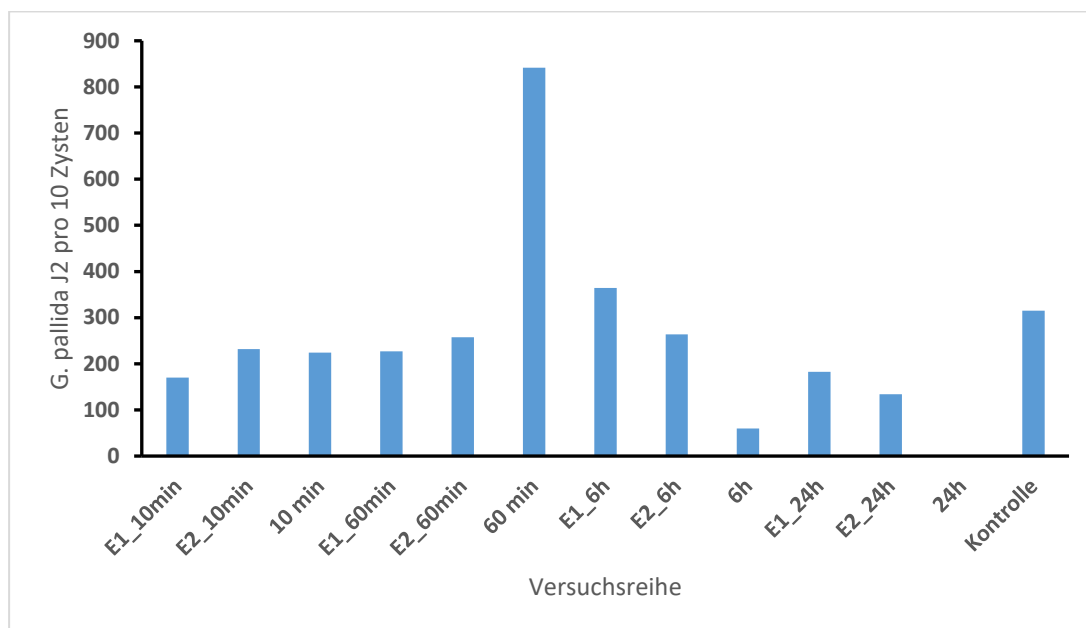
Die Konzentrationsmessung des Gehaltes an freiem, reaktiv wirksamen Chlor in einer Parabraunerde über einen Zeitraum von 10 min bis 24 h hat jedoch ein Abklingen der Konzentration dieser Verbindungen bereits nach wenigen Minuten in Bereiche von weit unter einem Tausendstel der Ausgangskonzentration ergeben (**Abb. 41**).

### Abklingverhalten von freiem Chlor in Erdproben



**Abbildung 41:** Die Konzentration von freiem Chlor (aufgetragen als Log des Gehaltes in mg/l) zeigt in Mischung mit Braunerde bereits nach 10 min (0,17 h; Stufe E1) einen Sprung von >3800 mg/l auf 2 mg/l. Bereits nach 1 h ist nahezu kein freies Chlor mehr messbar. Blank = Ausgangskonzentration an freiem Chlor nach Entnahme der Lösung von der Diamantelektrode; E1 bezeichnet Parabraunerde aus dem Emsland; E2 den stärker organischen Moorboden aus dem Donaumoos. (Abbildung M. Höfer Fraunhofer IST)

Dementsprechend konnte in Schlupftests, durchgeführt an Zysten von *G. pallida* eingebettet in 50 g Parabraunerde, keine Verminderung der Schlupfaktivität nach erfolgter Behandlung mit Spaltprodukten der am höchsten konzentrierten Kochsalzlösung nachgewiesen werden (**Abb. 42**).



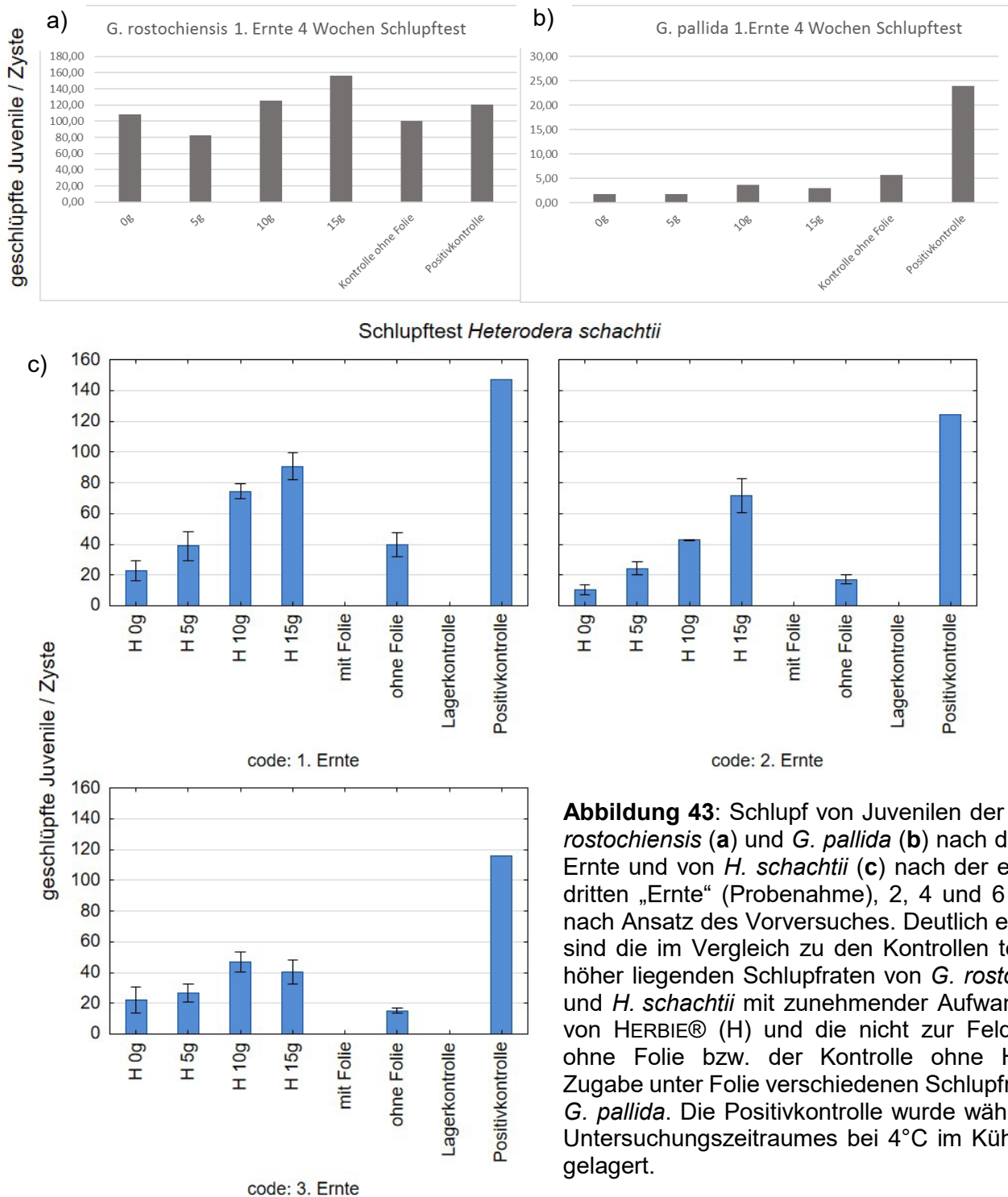
**Abbildung 42:** Wirkung einer Behandlung mit Spaltprodukten aus NaCl mit einer Konzentration von 50 g/l auf intakte Zysten der Art *G. pallida*. Neben den beiden Böden aus der vorhergehenden Abbildung (E1 Emsland; E2 Donaumoos) sind Versuche ohne umgebende Bodenmatrix für 60 min, 6 h und 24 h direkt in der Lösung von Spaltprodukten mit einer Ausgangskonzentration von 50 g/l NaCl inkubiert worden. Ersichtlich ist der gesteigerte Schlupf aus Zysten nach einer Behandlungsdauer von 60 min mit dreifach stärkerem Schlupf im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 6 h Inkubationszeit waren die behandelten Zysten in Lösung ohne umgebende Bodenmatrix nahezu und nach 24 h vollständig aufgelöst und zeigten daher keine verbleibende Schlupfaktivität.

## AP2 – Anaerobe Bodendesinfektion (ASD) und Biofumigation

Ein im Jahr 2021 in der Mikroplotanlage des JKI durchgeführter Freilandversuch konnte keine Verminderung des Schlupfs und damit der Lebensfähigkeit bei *G. rostochiensis* verzeichnen. Hingegen trat für *G. pallida* eine Verminderung des Schlupfs im Vergleich zur im Kühlschrank gelagerten Positivkontrolle derselben Untersuchungscharge auf, der jedoch keinen Unterschied zur Kontrolle im nicht mit HERBIE® behandelten, aber mit Folie abgedeckten Mikroplot



aufzeigte (**Abb. 43** – Darstellung der Ergebnisse nach der ersten Ernte). Mit nicht-signifikanter, leichter Verminderung des Schlupfs setzte sich dieser Trend zu den späteren Probenahmeterminen fort.



**Abbildung 43:** Schlupf von Juvenilen der Arten *G. rostochiensis* (a) und *G. pallida* (b) nach der ersten Ernte und von *H. schachtii* (c) nach der ersten bis dritten „Ernte“ (Probenahme), 2, 4 und 6 Wochen nach Ansatz des Vorversuches. Deutlich erkennbar sind die im Vergleich zu den Kontrollen teils noch höher liegenden Schlupfraten von *G. rostochiensis* und *H. schachtii* mit zunehmender Aufwandmenge von HERBIE® (H) und die nicht zur Feldkontrolle ohne Folie bzw. der Kontrolle ohne HERBIE®-Zugabe unter Folie verschiedenen Schlupfraten von *G. pallida*. Die Positivkontrolle wurde während des Untersuchungszeitraumes bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

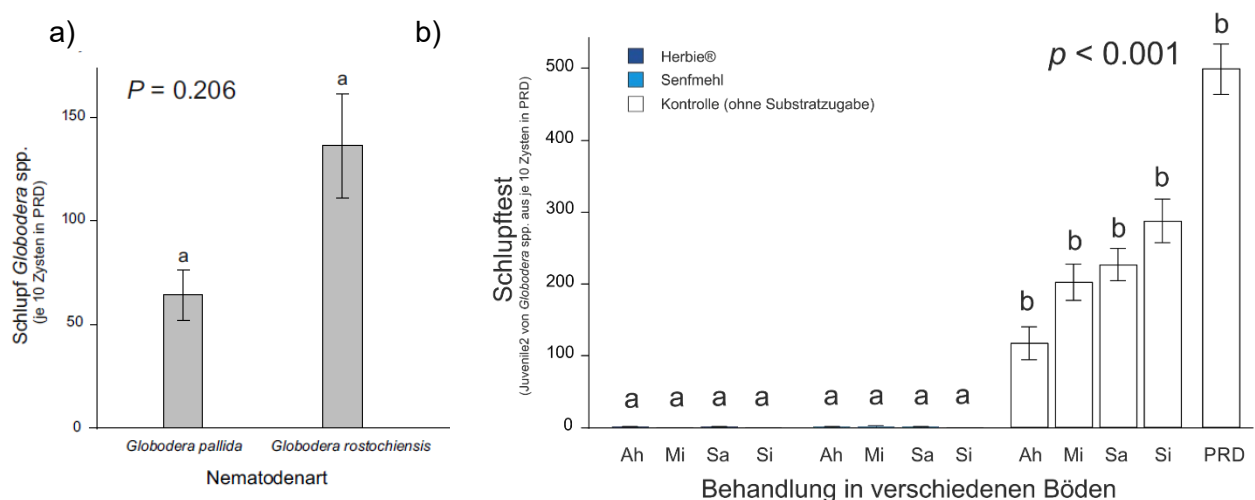
Die Ergebnisse für *H. schachtii* (**Abb. 43c**) ähneln denen von *G. rostochiensis* mit den gleichen paradoxen Analogien. Die Behandlungen mit HERBIE® zeigten gegenüber der Positivkontrolle

eine deutliche Wirkung. Diese Wirkung erhöhte sich mit abnehmender Menge an HERBIE®. Die nicht behandelte Variante mit und ohne Folie zeigte die höchste Wirkung.

Die Verwendung von schwarzer Folie zur Abdeckung der mit HERBIE® behandelten Mikroplots hatte zudem eine erhöhte Temperatur in der obersten Bodenschicht zur Folge, der als Solarisationseffekt eine durchschnittlich um 3,5 K höhere Temperatur abgedeckter im Vergleich zu nicht-abgedeckten Plots bewirkt hat. Hervorzuheben ist dabei eine erreichte Temperatur von 31°C über einen Zeitraum von 3 Tagen ca. 3 Wochen nach Versuchsstart. Diese erhöhten Temperaturen könnten die leichte Abnahme des Schlupfs im zeitlichen Verlauf des Experimentes erklären. Da eine Messung der Bodensauerstoffsättigung anhand der Bodenleitfähigkeit in nicht-wassergesättigten Böden technisch nicht durchführbar ist, kann das Nicht-Erreichen anaerober Bedingungen während der Versuche als Ursache für die geringe bzw. ausgebliebene Wirksamkeit des Verfahrens nur vermutet werden.

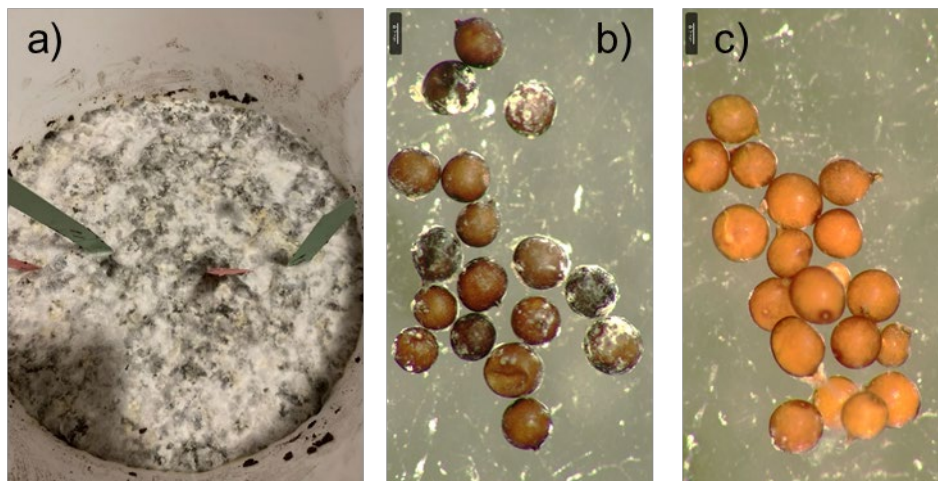
Im Ergebnis des zweifach durchgeführten Mesokosmenversuches im Jahr 2022 konnte unter den im Vergleich zum Versuch 2021 v.a. hinsichtlich der hohen Bodenfeuchtigkeit und des sicheren Luftdichten Abschlusses der behandelten Böden veränderten

Versuchsbedingungen, eine nahezu vollständige Abtötung der Zysten von *G. pallida* und *G. rostochiensis* erreicht werden (**Abb. 44**). Im Vergleich der zur ASD genutzten Substrate zeigte sich bei den optimal eingestellten Bedingungen ein statistisch nicht relevanter Unterschied zwischen HERBIE® (Behandlungserfolg 99,9% im Verhältnis zur Bodenkontrolle ohne Substrat) und Senfstaatmehl (99,4%). Der Unterschied im Schlupf und der daraus resultierenden Lebensfähigkeitsbestimmung zwischen *G. pallida* und *G. rostochiensis* war statistisch nicht verschieden. Generell jedoch zeigte *G. rostochiensis* eine höhere Schlupfaktivität als *G. pallida* bezogen auf alle Kontrollen (Bodenkontrolle, PRD-Kontrolle ohne Bodenkontakt). Auch die Unterschiede zwischen den beiden Substraten in der ASD beruhte nahezu ausschließlich auf dem Schlupf juveniler Tiere von *G. rostochiensis*.



**Abbildung 44:** Trotz höherer Schlupfraten von *G. rostochiensis* verglichen *G. pallida* war die Schlupfaktivität unbehandelter Kontrollen (a) zwischen den Arten nicht statistisch verschieden ( $p = 0,206$ ); Wirkung der Behandlung mittels anaerober Bodendesinfektion der Substrate HERBIE® und Senfsaatmehl im Mesokosmenmaßstab von ca. 15 l Boden verschiedener Bodentextur repräsentativ für Böden in der Anbaupraxis im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Boden ohne Substratzugabe und Referenzzysten gelagert bei 4°C im Kühlschrank (PRD) (b). Als einfachster Boden und interne Kontrolle zur Bewertung der mikrobiellen Aktivität dient „steriler“ grober Sand (Sa, Einkorn gemenge); Untersuchungsböden unter landwirtschaftlicher Nutzung waren sandiger Ton, Boden der Mikroplotanlage (Mi, Zweikorn gemenge) und tonigen Schluff, ökologischer Landbau auf Versuchsfläche des JKI in Sickte/Lucklum (Si, Zweikorn gemenge) sowie Lehm mit gleichem Anteil von Sand-/Schluff- und Tonpartikeln, konventioneller Landbau, Versuchsfläche des JKI in Ahlum (Ah, Dreikorn gemenge). Es wurden statistische Unterschiede zwischen behandelten Zysten im Vergleich zur Kontrolle im Boden sowie zu bodenfreien, unbehandelten Zysten (PRD) mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunnett's PostHoc-Test nachgewiesen ( $p < 0.001$ ); Demgegenüber waren innerhalb beider Gruppen (behandelt, unbehandelt) keine Unterschiede zu beobachten.

In allen Substraten konnte makroskopisch bereits das Wachstum eines dichten weißen Myzelgeflechtes auf der Oberfläche der Böden beobachtet werden. Diese Beobachtung belegt neben der visuell nicht erkennbaren bakteriellen Aktivität auch eine verstärkte Pilzaktivität unter den zumindest zeitweise anaeroben Versuchsbedingungen in den Mesokosmen (Abb. 45). Im Resultat der Behandlung im Verfahren anaerobe Bodendesinfektion konnte ein kompletter Abbau oder eine teilweise mikrobiell bedingte Auflösung von behandelten Zysten innerhalb des Untersuchungszeitraumes von etwa 6 Wochen in keinem der Böden und Substrate erreicht werden.

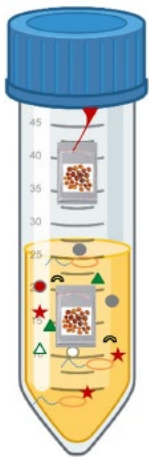


**Abbildung 45:** Mesokosmos (Eimer) überwachsen mit weißem Pilzmyzel einer mit HERBIE® behandelten Probe von Referenzzysten der Arten *G. pallida* (grüne Markierung) und *G. rostochiensis* (rote Markierung) des sandigen Tonbodens aus der Mikroplotanlage (a), teilweise mit Pilzhyphen umwachsene Zysten von *G. pallida* (b) aus der links dargestellten Probe, auffällig auch die Verfärbung und Verformung der Zysten im Vergleich zur gezeigten Kontrolle des Mikroplotanlagen-Bodens (c).

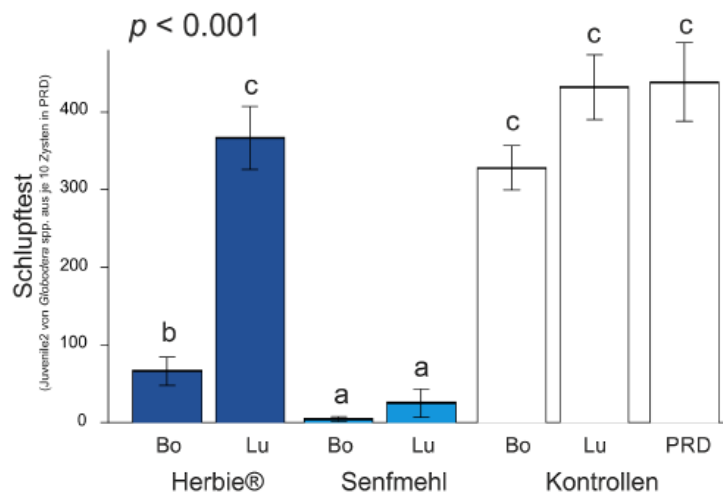
Der nochmals verkleinerte Ansatz von Falcon-Tube-Mikrokosmen (Abb. 46) zeigte einen deutlich schlechteren Behandlungserfolg verglichen zu den Mesokosmen (15 l+). Nichtsdestotrotz wurde damit eine wesentlich stärkere Differenzierung der ermittelten

Schlupfaktivitäten und der daraus resultierenden Behandlungswirksamkeit zwischen den Varianten erkennbar. So waren gemittelt über alle Varianten die Effekte im Bodenraum stets größer als im Luftraum. Allerdings war auch hier der Effekt volatiler Stoffe im Luftraum über mit Senfsaatmehl behandelten Substraten noch höher als der Bodeneffekt für mit HERBIE® behandelte Substrate. Eine vollständige Abtötung der behandelten Zystennematoden war lediglich für Senfsaatmehl in Verbindung mit den Boden-Mikrobiomen Ahlum und Mikroplotanlage sowie überraschend nach Zugabe von sterilem Wasser im Vergleich zur Substrat-freien Variante zu beobachten (**Abb. 46**). Dies lässt darauf schließen, dass das Boden-Mikrobiom keinen bzw. nur einen geringen Effekt auf die Behandlungswirkung in diesen sehr kleinen Volumina besitzt und eher von einer Biofumigation vergleichbar mit der Wirkungsweise von Bodenbegasungsmitteln (u.a. BASAMID®) als von einer mikrobiell gesteuerten anaeroben Bodendesinfektion gesprochen werden kann.

a)



b)



**Abbildung 46:** Versuchsansatz zur Durchführung der Mikrokosmenversuche an jeweils 20 in Gazebeuteln eingebrachten Zysten von *G. rostochiensis* (a) zur Trennung der bodenbürtigen Effekte von denen gasförmiger (volatiler) Stoffe im „Luftraum“ (*head space*, Lu) nach Behandlung mit zwei in den sterilen Sand eingearbeiteten Substraten sowie Mikroorganismen-Filtraten verschiedener bereits im Mesokosmenversuch genutzter landwirtschaftlicher Böden. Pro Bodenfiltrat wurden jeweils 8 Ansätze untersucht; Zur Bewertung der Wirksamkeit wurden Schlupftests (b) und Biotests (nicht dargestellt, mit tendenziell vergleichbaren Ergebnissen) aus je 10 Zysten durchgeführt; Keiner der mit HERBIE® behandelten Ansätze konnte den Schlupf der Nematoden inaktivieren während eine Reihe von Ansätzen mit Senfsaatmehl unabhängig vom mikrobiellen Filtrat eine hohe Wirksamkeit aufwies. Abkürzungen entsprechen: Bo (Boden), Lu (Luftraum) und PRD (Potato Root Diffusates).

Mittels PCR und Sanger-Sequenzierung aus vorangegangener *In-vitro* Kultivierung möglicher Antagonisten von Zystennematoden bzw. diese abbauenden Organismen konnten lediglich Organismen, die mittelbar am Abbau organischer Substanz beteiligt sind, isoliert und identifiziert werden. Es konnten insgesamt 25 Organismen (21 Bakterien, 4 Pilze) kultiviert werden. Vorgefunden wurden *Cladorhinum* sp. als einziger möglicher Antagonist

sowie Schimmelpilze und pilzliche Saprophyten (*Penicillium* sp., *Mucor* sp.) und ein phytopathogener Pilz (*Fusarium solani*). Bei den Bakterien dominierten gram-positive Bakterien der Gruppe der Firmicutes (u.a. *Bacillus megaterium*) und tierische Proteine zersetzende Bakterien (*Serratia plymuthica*, *Bacillus lichinoformis*) sowie weitere nicht näher zu spezifizierende Arten der Gattung *Pseudomonas* und *Paenibacillus*, wobei letztere auch zoopathogene Stämme enthalten können. Beim Auswerten der Pilz- und Bakterien-Amplicon PCR Produkte konnten keine eindeutigen Ergebnisse gefunden werden. Die Sequenzprodukte der Amplicon-Libraries ergaben bioinformatische Fehlermeldungen der resultierenden Taxonomie ohne signifikante Treffer in der Pilzdatenbank (UNITE 9). Über NCBI konnte die Ursache der Fehlermeldung identifiziert werden, die darin bestand, dass das mit Abstand abundanteste OTU wiederum dem Bakterium *Pseudomonas* sp. entspricht und alle anderen OTUs davon nicht abgrenzbar waren. Daraus kann abgeleitet werden, dass in den Micro-Volumenansätzen keine stabilen Mikroorganismengemeinschaften ausgebildet worden sind und den mikrobiologischen Abbauprozessen ähnlich der Biofumigation (s.o.) unter diesen Bedingungen keine Schlüsselrolle zukommt.

## **5 Diskussion der Ergebnisse**

### **AP1**

#### **Schlupf- und Biotest**

Im Gegensatz zum Rübenzystennematoden *H. schachtii*, mit einem sehr breiten Wirtsspektrum, sind Kartoffelzystennematoden komplett auf die Zugabe von schlupfinduzierenden Diffusaten der Wirtspflanze angewiesen (Roland N. Perry in Marks, R. J., Brodie, B. B. 1998), um die Entwicklung zum zweiten Juvenilenstadium zu beginnen. Dieses Schlupfverhalten stellt eine besondere evolutionäre Anpassung in Form einer Synchronisation der PCN-Entwicklung in Hinsicht auf Vorhandensein und den Entwicklungsstand ihrer Wirtspflanzen, der Kartoffel, dar. Für den Schlupftest (EPPO PM 7/40(5); EPPO 2022b), neben dem Biotest eines der zuverlässigsten Verfahren zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Nematodeneiern, wird diese Abhängigkeit durch Zugabe von PRD genutzt, um unter seminatürlichen Bedingungen einen *in-vitro* Schlupf der J2 zu erzeugen. Größter Nachteil des Schlupftests mit PRD ist allerdings die verschiedene Induktionsfähigkeit zur Anregung des Schlupfs zu verschiedenen Jahreszeiten, abhängig vom endogenen Ruhezustand der Eier und J1 bzw. J2-Juvenilenstadien im Ei. Zusammenfassend sind diese endogenen Entwicklungsvorgänge in der Literatur als Dormanz beschrieben. Allerdings steht hinter der Entwicklungsruhe der Zystennematoden, die ursächlich für das lange Überdauern der Tiere und deren Überlebenserfolg im Feld ist, eine Vielzahl möglicher und teilweise miteinander verbundener Prozesse, die sich allgemein

in zwei Gruppen unterscheiden lassen: Die Umwelt- bzw. Stress-induzierte Ruhephase (Quiescence = verlangsamte Entwicklung) und die endogene, art- bzw. populationstypische Entwicklungsunterbrechung (Diapause). Während Quiescence ohne Weiteres durch Abstellen des auslösenden Umweltfaktors (z.B. Abwesenheit des Wirtes, Trockenstress) durch Zugabe von PRD oder Erhöhung der (Boden-) Feuchte revidierbar ist, ist die Diapause nicht durch Änderung von Umweltparametern reversibel. Die Diapause ist damit ein hoch komplexer Prozess der Entwicklungsunterbrechung, der u.a. durch Stress des Wirtes beim Heranwachsen der parasitischen Nematoden bewirkt werden kann. Eine der möglichen Ursachen für die im Projekt zu beobachtende nachlassende Schlupffähigkeit beider Kartoffelzystennematodenarten, jedoch besonders deutlich erkennbar bei *G. pallida* u.a. im Verlauf der Untersuchungen zur Kompostierung sichtbar geworden (**Abb. 28**), könnte daher in kurzzeitigen Temperaturerhöhungen > 40°C im warmen Sommer 2018 bei der Nachzucht des Untersuchungsmaterials im Gewächshaus zu finden sein. *G. pallida* reagiert auf diese exogenen Einflüsse zumeist etwas stärker als *G. rostochiensis*, was jedoch auch durch die generell langsamere Aktivierung der für den J2 Schlupf erforderlichen Reserven und die daraus resultierende geringere initiale Schlupfrate von *G. pallida* nach erster Interaktion mit der Wirtspflanze bedingt sein kann (Perry in Marks & Brodie 1998). Diese Herabsetzung der ermittelten Vitalität ist im Schlupftest stärker zu verzeichnen als im Biotest (siehe u.a. **Abb. 28**). Damit werden vergleichende Untersuchungen einer Studie zur Bewertung von Methoden zur Vitalitätsuntersuchung von J2 und Eiern in Zystennematoden bestätigt, die prinzipiell von einer Unterschätzung der potentiellen Lebensfähigkeit der Tiere im Schlupftest stärker als beim Biotest berichten (Back *et al.* 2004, Projektbericht DEFRA HP0143 zitiert in Kaemmerer *et al.* 2012). Von einer Nutzung der Pikrolonsäure als nahezu sofort wirkender schlupfinduzierender Reagenz für Arten der Gattung *Globodera* wurde aufgrund der geringen Schlupfraten und dem damit verbundenen Risiko der noch stärkeren Unterschätzung möglicher Restmengen lebender Eier abgesehen. Es konnte in unseren Untersuchungen gezeigt werden, dass diese auch als Semiochemikalie bezeichnete Substanz, die das Schlupfverhalten von PCN manipuliert, nach Zeiträumen über 10 Tagen die Juvenilen in den Eiern irreversibel lähmt oder abtötet. Das Einbringen der Zysten mittels Gazebeuteln nahe der Wirtspflanze im Biotest hatte verglichen zur direkten Inokulation mittels J2 (EPPO 2017) keine Unterschiede hinsichtlich der resultierenden Vermehrungsrate ( $P_f/P_i$ ) zur Folge. Mögliche Effekte hinsichtlich der Dichte vieler Nematodenzysten auf kleinem Raum im Gazebeutel und dem damit verbundenen Risiko von Infektionen antagonistischer Mikroorganismen bzw. intraspezifischer Konkurrenz zwischen den Tieren, wie von Timmermans (2005) im Vergleich zu direkt in den Boden eingebrachten Zysten untersucht, wurden bei uns nicht beobachtet. Auch Timmermans konnte diesen Effekt in Versuchen direkt im Sand eingebrachter Zysten im Vergleich zu denen im Gazebeutel nicht

beobachten, schlägt jedoch als Referenz Kontrollen mit und ohne Einschluss der Zysten in definierte Beutel vor.

### **AP1 - Färbemethoden**

Bei der Nutzung von Farbstoffen zur Anfärbung nicht vitaler Nematoden (J2 und Eier) haben unsere Untersuchungen die Angaben aus der Literatur (Back *et al.* 2004, DEFRA Bericht zitiert in Kaemmerer 2012), dass die aufwendigen Auswertungen unter dem Lichtmikroskop subjektiv entstehen und damit abhängig vom Bearbeiter große Unterschiede in der Lebensfähigkeitsbewertung auftreten, bestätigt. Vor allem MELDOLA'S BLUE als der am geeignetsten bewertete Farbstoff (Shepherd 1986) mit der höchsten Farbintensität hatte häufig eine Überbewertung abgestorbener Tiere durch diverse Fehlanfärbungen zur Folge. Dies steht im Gegensatz zu den Bewertungen von Back *et al.* (2004), die eine Überschätzung der Zahl lebender Tiere beschreiben. Zusammenfassend kann aus unseren Beobachtungen konstatiert werden, dass Anfärbungen von J2 und Eiern zeitintensiv sind, stark vom Bearbeiter abhängen und demzufolge möglichst von derselben Person durchzuführen sind sowie im Vergleich zur Mikroskopie ungefärbter Tiere wichtige Kriterien nicht vitaler Eier und J2 (Vakuolen, Degradation) verdecken können. Im Einzelfall können jedoch Färbungen (z.B. mit Malachitgrün) zur Illustration morphologischer Veränderungen behandelte im Vergleich zu unbehandelten Tieren hilfreich sein. Aufgrund der schwierigen Beschaffbarkeit einzelner Farbstoffe (v.a. MELDOLA'S BLUE) sind Anfärbeprotokolle nicht Bestandteil der EPPO-Diagnosestandards (EPPO 2017).

### **AP1 – Bestimmung Trehalose-Gehalt**

Der in der Literatur beschriebene Nachteil der vor der Trehalose-Umsatzbestimmung notwendigen Verdünnung (siehe Beniers *et al.* 2014) hat sich auch in unseren Versuchen zur Erprobung dieser Methode als wahrscheinliche Ursache für die schwierige Reproduzierbarkeit der Messansätze und die nur bedingt bis nicht vorhandene Linearität im Anstieg bei zunehmender Zystenanzahl erwiesen (**Abb. 20**). Eine Verdünnung der Extrakte nach erfolgtem Aufschluss der Zysten führt dabei zwangsläufig zu einer ungleichen Verteilung der Zellmembran- und Plasmafraktion mit der darin enthaltenen Trehalose und resultiert in einer unzureichenden Quantifizierung.

### **AP1 – DNA-Blocking mittels Propidium-Monoazid (PMA) und anschließende RealTime-PCR Quantifizierung**

Als die wesentliche Einschränkung für eine Quantifizierung der in den Eiern und Juvenilen vorhandenen DNA hat sich in unseren Untersuchungen die Auswahl der zur Detektion verwendeten Real-Time PCR-Methode erwiesen. Um einen Behandlungserfolg der Zysten in den Resterden bewerten zu können, ist es notwendig, dass die für eine absolute Quantifizierung eingezählte Ei-/J2-Anzahl in der Real-Time PCR einen linearen Verlauf mit

$R^2 > 0,97$  aufweist und die Effizienz der PCR zwischen 95 und 105% liegt (BioRad Guide). Der in der Literatur von Christoforou et al. (2014) beschriebene Ansatz zur Lebensfähigkeitsbewertung nach vorangegangenem DNA-Blocking mittels PMA nutzt einen von den Autoren im Jahr 2013 entwickelten Real-Time PCR TaqMan-Assay auf Grundlage der Amplifikation von DNA des internen nichtcodierenden Genbereichs in der späteren ribosomalen RNA (ITS; Papayiannis *et al.* 2013). Mittels dieser PCR konnte im Vorversuch eine Standardkurve für 1-600 Eier/J2 experimentell erstellt werden mit den Cycle Threshold - Werten ( $C_t$ ) in der Spanne von 38 (1 Ei/J2) bis 26,8 (600 Eier/J2) ein Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,9775 bei einer Reaktionseffizienz von 96% aufwies (Daten nicht abgebildet). Da diese PCR allerdings nicht Teil der international validierten Protokolle im EPPO-Standard ist, wurde der Real-Time PCR TaqMan Assay nach Gamel et al. (2017) im weiteren Verlauf der Untersuchungen verwendet, der zudem eine der 3 obligat zu nutzenden Methoden zur Identifizierung von *G. pallida* und *G. rostochiensis* in der aktuellen Durchführungsverordnung der (EU) 2022/1192 darstellt. Dieser End-Point Test auf der Basis artspezifischer Mikrosatelliten-Marker hat sich aufgrund des nicht-kontinuierlichen Verlaufes der PCR bei verschiedenen Konzentrationen von Nematoden-DNA sowie der ungenügenden PCR-Effizienz als schwierig einsetzbar für den Zweck der Quantifizierung lebender Nematoden erwiesen. Dessen ungeachtet entsprechen die von uns ermittelten  $C_t$ Werte auch auf Basis dieser PCR für Hitze-abgetötete Zysten nach erfolgter PMA Inkubation den bei Christoforou et al. beschriebenen Werten mit 0-2 lebensfähigen Eiern bzw. J2 pro Zyste. Der Nachweis einzelner Eier/J2 ist allerdings bei der Erstellung der Standardkurve mit dem Assay von Gamel et al. nur in 30% der Replikate erreicht worden und war ebenfalls im alternativen Ansatz von Papayiannis et al. (2013) mit wesentlich höheren  $C_t$  Werten als beschrieben und falsch-negativen Ausfällen von etwa 50% der Einzel-Ei/J2 Extrakte ohne Vorbehandlung mit PMA belegt.

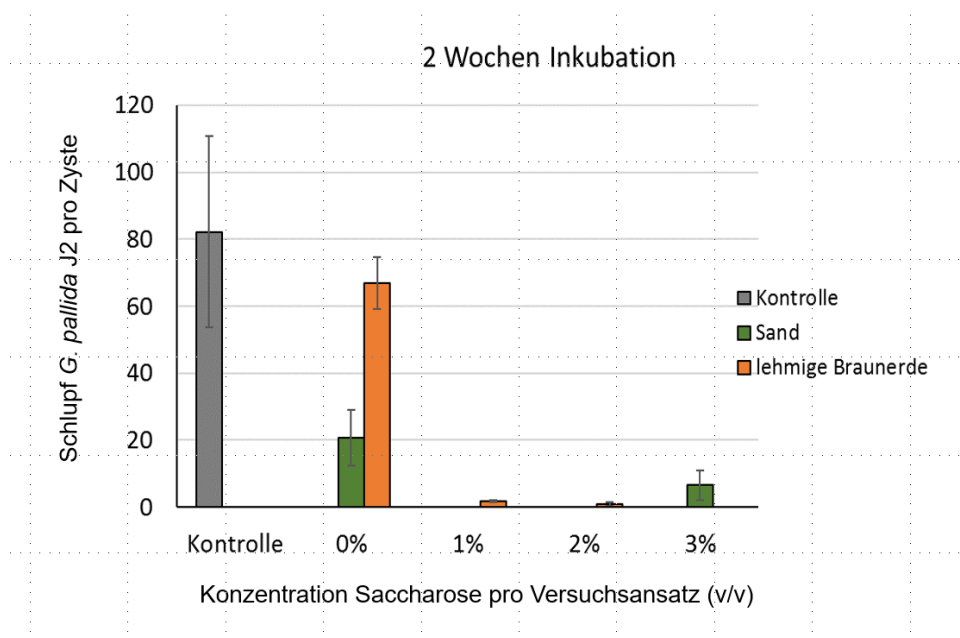
## **AP2 – Inundation, anaerobe Überstauung**

Untersuchungen zur Überdauerung von Zysten im anaeroben Abwasser gehen bereits bis in die 1960'er Jahre zurück (Lücke 1964; Sprau 1967). Seit den 1980'er Jahren wurden verstärkt Untersuchungen hinsichtlich der Inaktivierung und Abtötung von Kartoffel- und Rübenzystennematoden in Resterden aus der Kartoffel- und Zuckerrübenindustrie mittels anaerober Überstauung (Inundation) durchgeführt (Stelter 1981; Spaul & McCormack 1988; Heinicke 1989; Ebrahimi *et al.* 2016). Durchgängig beruhen diese Untersuchungen auf empirischen Beobachtungen in Form zufällig aus Schlammproben entnommener Zysten bzw. Mesokosmenversuchen im Labor, die im Nachgang auf ihre Lebensfähigkeit, zumeist mikroskopisch nach morphologischer Beurteilung, untersucht wurden. Unsere Studien können hierzu erstmals Ergebnisse anhand künstlich eingesetzter Zystennematoden zeigen, die während verschiedener Phasen der Resterdebehandlung eines großen



Produktionsbetriebs im Praxismaßstab eingebracht wurden. Die beobachteten Behandlungszeiten weichen von denen in der Literatur mit zwischen 6 Wochen (Spaull & McCormack 1988) und bis zu 6 Monaten (Stelter 1981) während der Behandlungszeiten bis zum Erreichen einer Abtötung von 99% (bei Temperaturen von 5-15°C) erheblich voneinander ab. In unseren Untersuchungen bei Temperaturen von ca. 5°C verglichen mit den Literaturangaben im unteren Bereich, wurde eine Behandlungszeit von 38 Tagen unter anaeroben Bedingungen im Stapelteich in replizierten Versuchen über 2 Verarbeitungskampagnen ermittelt, um eine komplette Schlupfinaktivierung zu erreichen. Nach vorhergehender Behandlung im Bruknerbecken bei pH >11 war diese mit ≤20 Tagen nochmals verkürzt (**Abb. 24**). Ergänzt wurden die von uns im Praxismaßstab durchgeführten Untersuchungen durch Versuche im Labormaßstab zur Auftrennung möglicher Wirkungsmechanismen. Untersucht wurden die Wirkung von anaeroben Bedingungen, verschiedenen Bodenarten, Zugabe von organischem Material in Form von Saccharose als mikrobiell leicht abbaubarer Bestandteil bei der Zuckerverarbeitung, pH-Wertunterschiede verschiedener Basen (simulierend den Effekt des Bruknerbeckens) und die spezifische Zugabe organischer Milchsäure. Anaerobe Bedingungen *per se* hatten ohne zusätzliche Zugabe von organischem Material unabhängig von der Bodenart nach 6 Wochen eine annähernd komplette Inaktivierung der Schlupfaktivität zur Folge. Dies könnte einerseits auf das Fehlen von Sauerstoff, verstärkt jedoch durch mikrobiellen Abbau der im Boden noch vorhandenen organischen Restsubstanz zurückgeführt werden (Runia et al. 2014; vgl. Kapitel zur Fermentation im Unterabschnitt Kompostierung; S. 80). Während Ebrahimi et al. (2016) eine Reduzierung der Lebensfähigkeit der Kartoffelzystennematoden nach 8 Wochen um 72% beschrieben, betrug die Reduktion der Schlupfaktivität der Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in unseren Versuchen zwischen 97-100% bereits nach 6 Wochen. Dies könnte auf Unterschiede im organischen Gehalt der verwendeten Böden zurückzuführen sein. Durch zusätzliche Zugabe von Saccharose wurde bereits nach 2 Wochen eine Reduktion um über 90% erreicht (**Abb. 47**). Dies bestätigt die Ergebnisse von Ebrahimi et al. (2016) mit einer Reduktion um 99,9% nach 4 Wochen. Ursächlich dabei sind wiederum typische mikrobielle Abbauprodukte, hervorzuheben sind kurzkettige volatile Fettsäuren und CO<sub>2</sub> (Runia et al. 2014; Ebrahimi et al. 2016a). Organische Säuren v.a. von Milchsäure (L-Lactat) wurden u.a. von Seo et al. (2014) für *Meloidogyne incognita* als Verbindungen mit nematizider Wirkung nachgewiesen. Bei *Meloidogyne incognita* handelt es sich um eine Wurzelgallen induzierende Nematodenart mit freilebenden J2 (vergleichbar zu Zystennematoden) und männlichen Tieren, jedoch ohne dormante, im Boden persistente Zysten. Nach einer mit 7 Tagen vergleichsweise kurzen Einwirkzeit konnte nur durch sehr hohe Konzentration der Milchsäure eine Reduktion der Lebensfähigkeit um über 60% (bei 5% v/v Lactatkonzentration) bzw. von annähernd 100% (bei 10% v/v Lactatkonzentration)

beobachtet werden. Die Wirkung der Milchsäure bei 90 Tagen Lagerung der Resterde dürfte in Verbindung mit weiteren kurzkettigen organischen Säuren (Essig-, Butter-, Propionsäure), die zusätzlich als natürlich auftretende mikrobielle Abbauprodukte entstehen, erheblich höher sein. Bei den pH-Werten >11 als Besonderheit der vorgeschalteten Sedimentation der Resterde im Waschwasser der Zuckerrübenverarbeitung in Bruknerbecken ist die stark ätzende basische Wirkung der Kalkmilch zur nahezu vollständigen Inaktivierung der Schlupfaktivität in der Lage. Demgegenüber konnte eine vergleichbare Wirkung mit KOH bei identischen pH-Werten nicht beobachtet werden. Dies belegt, das Zystennematoden, geschützt durch die Zyste umschließende Kutikula, Epidermis und Collagene des Weibchens und das anabiotische Verhalten der im Stoffwechsel extrem herabgesetzten Juvenilen sehr viel widerstandsfähiger als freilebende Nematoden sind und nur durch stringente chemisch-physikalische und biologische Einwirkung inaktiviert werden können.



**Abbildung 47:** Schlupfraten von mit Saccharoselösungen behandelten Kartoffelzystennematoden der Art *G. pallida* in Sand (grüne Balken) und lehmiger Braunerde (orange Balken), vergleichend zur nicht überstauten Schlupfkontrolle (grauer Balken). Dargestellt sind der Schlupf der Referenzzysten ohne Behandlung (Kontrollen, n=3), mit Wasser inundierte Kontrollen (0%), sowie Proben mit wässrigen Saccharoselösungen mit v/v 1 %, 2% und 3% (jeweils n=2).

## AP2 – Kompostierung

Kompostierung ist der Abbau organischer Verbindungen unter Anwesenheit von Sauerstoff. Zystennematoden können nach einer Literaturstudie des Norwegischen Wissenschaftlichen Komitees sowohl aeroben Abbauprozessen der Kompostierung *s. str. (sensu stricto)* als auch anaerober Fermentation, Vermikompostierung (Abbauprozesse durch Verdauung von Pflanzenresten in Regenwürmern) und Kompostierung in Rottetunneln für längere Zeit

widerstehen. Neben der bereits bekannten abtötenden Wirkung der Kompostierung in großen prozessgesteuerten Anlagen gegen Humanpathogene (v.a. Bakterien *Salmonella* sp., *Escherichia coli*) ist nach BioabfallVO (BioAbfV 2013) auch die Freiheit von Phytopathogenen im produzierten Kompost zu gewährleisten. Die im Rahmen unserer Untersuchungen in beide Hauptprozesse (anaerobe Fermentation **Abb. 27a** und daran anschließende aerobe Kompostierung **Abb. 28**) eingebrachten Kartoffel- und Rübenzystennematoden konnten im Gesamtdurchlauf aber auch in beiden Einzelprozessen erfolgreich inaktiviert werden. Im relevanten EPPO Standard PM 3/93 (EPPO 2021) wird v.a. der Temperatur die größte Behandlungswirkung zugesprochen. Die zu erreichende Behandlungstemperatur wird darin auf Grundlage von Literaturdaten zwischen 50-55°C (Steinmüller *et al.* 2012) für eine Zeitspanne von 7 Tagen bzw. etwas höhere Werte im Standard der EPPO zur phytosanitären Behandlung von biologischen Abfällen (Biomüll) von 55°C für 14 d/65°C für 7 d (EPPO PM 3/66 EPPO 2022a) als erforderlich für eine wirksame Behandlung der Nematodenzysten angegeben. Im Prozess der Fermentation werden jedoch selten Temperaturen über 40°C erreicht. Die erfolgreiche Behandlung der Zysten von *G. pallida* und *G. rostochiensis* in diesem Prozess kann, ähnlich anaeroben Prozessen im Faulschlamm (Spaull *et al.* 1989) daher nur auf der Wirkung direkter mikrobieller Abbauprozesse jeglicher organischen Substanz, wahrscheinlicher jedoch der nematiziden Wirkung mikrobieller Abbauprodukte beruhen (Eberlein *et al.* 2019; Jothi *et al.* 2003). Eine Wirkung wird dabei dem entstehenden Kohlendioxid in Verbindung mit Sauerstoffabschluss sowie einer Reihe volatiler, flüchtiger kurzkettiger Fettsäuren (Davis *et al.* 1997) und einer NH<sub>3</sub> Anreicherung zugeschrieben. Während Methan (CH<sub>4</sub>) und Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Runia *et al.* 2014), erweist sich die Identifikation der vielfältigen mikrobiellen Sekundärmetabolite als komplex und wird gegenwärtig hinsichtlich ihrer nematiziden Wirkung intensiv erforscht (Oldani *et al.* 2022, Vortrag). Obwohl das Perkolat mit potentiell hoher Anreicherung der nematiziden Verbindungen vor dem Beginn der aeroben Kompostierung abgetrennt werden muss, da eine zu hohe Wassersättigung (>60%) des Materials keine aeroben Bedingungen zulässt (Epstein 1997). Dies spricht für eine Anreicherung der Verbindungen im organischen Material, was allerdings bei der zum Teil zu beobachtenden niedrigen Temperatur im Rottetunnel (<50°C in einzelnen Bereichen der Miete) durch ausreichende Umsetzung gezielt unterstützt werden muss. Die Untersuchungen zur Kompostierung wurden unter kontrollierten Bedingungen im Praxismaßstab eines Kompostwerkes durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass eine Wirksamkeitsbewertung vor dem Hintergrund der Erzeugung nährstoffreichen Komposts zur direkten Verwendung in Landwirtschaft und Gartenbau erfolgte. Nachteilig wirkte sich aus, dass im Test der laufenden Anlage v.a. hinsichtlich der vorgeschriebenen Wirksamkeitsbewertung gegen humanpathogene Organismen keine für

den Praxiseinsatz zur Resterdebehandlung gezielt für unsere Versuche notwendigen zusätzlichen Resterden hinzugegeben werden konnten, die im regulären Bioabfall so nicht vorhanden gewesen wären. Nach Einschätzung einer ingenieurtechnisch durchgeführten Vorstudie (Hessler 2016) kann lose Rüttelerde mit hohen Anteilen organischer Substanz (ca. 20% w/w Anteil organischer Rückstände aus der Zuckerrübenverarbeitung) direkt kompostiert werden, was nach Einschätzung der Experten aus der Kompostierungsanlage Bützberg nicht möglich ist, da ein Erdanteil von bis zu 80% w/w bei der Ausbildung der zur Kompostierung notwendigen aeroben Bedingungen und der dabei zu erreichenden Temperatur hinderlich ist (mdl. Mitteilung Frau T. Böhlke). Allgemein werden Anteile beigemischter Resterde im Kompostierungsmaterial von bis zu 15% als möglich angesehen.

## **AP2 – Thermische Behandlungsverfahren**

Die Anforderungen an thermische Behandlungsverfahren waren in der bis 2022 geltenden nationalen Kartoffelkrebs-KartoffelzystennematodenVO (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2010) auf eine zumindest kurzzeitige Erhitzung der Resterde auf 100°C durch die Einleitung von heißem Wasserdampf gelegt, um behandelte Erden ohne Risiko in landwirtschaftlich genutzte Flächen zurückführen zu können. Wir konnten anhand von Mikro- und Mesokosmenversuchen zur Erhitzung mit dem am schnellsten und energieeffizientesten wirkenden thermischen Verfahren der Mikrowellenbestrahlung zeigen, dass bereits eine Erhitzung auf 80°C für wenige Sekunden ausreichend ist, um eine sichere Abtötung von Zystennematoden zu erzielen. Nach EPPO PM 3/66 (EPPO 2022a) zum Umgang mit biologischen Abfällen mit Risiko einer Kontamination durch phytopathogene Organismen wird von einer Behandlung bei einer Temperatur von 70°C für 1 h ausgegangen, um eine sichere Abtötung der Kartoffelzystennematoden zu erreichen. Steinmüller et al. (2012) gehen ebenfalls von einer Mindesttemperatur von 70°C jedoch bei einer Behandlungsdauer von 30 min aus. Ohne umgebende Resterde bei einer Erhitzung unter optimaler Wärmeübertragung in Wasser kann diese Zeitspanne nochmals drastisch auf 2 min bei 70°C bzw. 20 min 60°C Wassertemperatur verkürzt werden (Viaene *et al.* 2019). Dies ist allerdings nur für Zysten im wassergesättigten Zustand zutreffend, während trockene Zysten erheblich höheren Temperaturen widerstehen können. So konnten Linhardt (1959) sowie Stone und Wesley (1975) zeigen, dass trockene Zysten 90°C für 30 min Behandlungszeit bzw. 65-70°C für bis zu 24 h bis zur sicheren Abtötung der Nematodeneier bedürfen. Unabhängig vom Feuchtegehalt der Zysten wurde bei der Behandlung von Zysten ohne umgebende Resterdematrix in einer Haushaltsmikrowelle (**Abb. 30**) festgestellt, dass bei ungleichmäßiger Bestrahlung einzelne Zysten bis zu 10% Schlupfaktivität aufwiesen, was eines der größten Probleme des Verfahrens, das Vorhandensein sogenannter „blinder Flecken“ ohne Behandlungseinwirkung aufzeigt. Mit Hilfe eines praxisnahen Mikrowellentunnels kann das Problem „blinder Flecken“ umgangen werden. Versetzt

angebrachte Magnetronen erreichen eine gleichmäßige Bestrahlung und damit verbunden eine robuste Temperatureinwirkung über das gesamte Band mit dem Bestrahlungsgut. Dies konnte experimentell durch versetzt eingebrachte Gazebeutel in den Behandlungsboxen in verschiedenen Tiefen bis 10 cm belegt werden. Die größte Gefahr der Entstehung blinder Flecken ist beim Einleiten von heißem Wasserdampf zur Resterde gegeben, da dieser eine Aggregatbildung des Bodens, vergleichbar zur Kompostierung (abhängig von der Bodenart, v.a. lehmig tonige Böden betroffen) fördert. Die Bodenaggregate besitzen eine äußerst geringe Wärmeleitfähigkeit und werden nicht vom heißen Dampf durchdrungen. In unseren Versuchen gelang eine vollständige Abtötung der Nematoden im Dämpfungsgerät durch eine lockere Schüttung der Parabraunerde bei wesentlich höherem Energieverbrauch im Vergleich zum Plattenerhitzungsgerät (44 kWh verglichen zu 16-17 kWh) für je 0,5 m<sup>3</sup> behandelte Erde unter vergleichbaren Außenbedingungen bei Temperaturen um den Gefrierpunkt. Der höhere Energieverbrauch ist bedingt durch die Zwischenübertragung der Wärme auf den Wasserdampf, demgegenüber die Wärme im Plattenheizgerät STERILO® direkt an die feuchte Erde weitergegeben wird. Daher wird in der einzigen Zuckerrübenverarbeitungsanlage mit Hitzebehandlung der Resterde in Euskirchen der Dampf indirekt über Heizplatten an die zu behandelnde Resterde abgegeben (Hessler 2016). Nach Berechnungen des Ingenieurbüros APRO beträgt der Energiebedarf bei der Mikrowellenbehandlung nur etwa 12% der für eine Dämpfung erforderlichen Energie, was etwa 5-6 kWh pro 0,5 m<sup>3</sup> Resterde entspricht (Hessler 2016).

## **AP2 – $\beta$ - und $\gamma$ Strahlenbehandlung**

Die Ermittlung der letalen Dosis für Nematodenzysten ohne umgebende Resterde ergab mit einer sicheren Behandlung für beide Strahlungsarten Werte von >4 kGy, was den in der Literatur (u.a. McNamara *et al.* 2003) angegebenen Werten entspricht. Die Verwendung eines Hochenergie-Elektronenbeschleunigers zur Erzeugung von  $\beta$ -Elektronenstrahlen ist dabei für die Übertragung der Energie einer festen Co60 Elektronenquelle aufgrund der (i) kürzeren Behandlungsdauer, (ii) gleichmäßigeren Behandlung in der Kammer, des (iii) flexibleren Praxiseinsatzes und der (iv) höheren Behandlungseffizienz vorzuziehen. Die Unterschiede in der Behandlungseffizienz zwischen beiden Bestrahlungsarten waren statistisch nicht verschieden, wobei jedoch die Behandlungswirkung der  $\beta$ -Elektronenstrahlen im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung stets etwas höher war. Die Erzeugung der Elektronen im Beschleuniger erfolgt durch thermische Emission z.B. aus einer Wolfram-Katode. Die Elektronen werden im elektrischen Feld beschleunigt und zu einem Elektronenstrahl fokussiert. Beim Auftreffen auf Materie treten die Elektronen in intensive Wechselwirkung mit den Atomen und Molekülen des zu durchdringenden Mediums (Resterde) und werden dabei dichteabhängig sukzessive absorbiert. Dies konnte in den von uns durchgeführten Versuchen an zwei Resterden (Parabraunerde mit Dichte >1,5 g/ml und

Boden mit hohem organischen Anteil Dichte ca. 1,0 g/l) belegt werden. Die Behandlung im dichteren Boden zeigte stets höhere Reproduktionsraten von Nematoden als im stärker organisch geprägten Boden des Donaumooses. Obwohl diese Unterschiede nicht statistisch belegbar sind, lässt dies den Rückschluss zu, dass eine Behandlung gezielt auf die Bodenart abgestimmt durchzuführen ist. Dabei ist die ionisierende Wirkung der  $\beta$ -Elektronenstrahlung wiederum unabhängig von der Bodenart stets zuverlässiger als die der  $\gamma$ -Bestrahlung. Die Eindringtiefe der Strahlung ist bei 10 cm Schichtdicke sicher gegeben und kann unter höheren Dosen (bei 8 kGy) auch bis zu 15 cm betragen. Die erhöhten Schlupfraten von *G. rostochiensis* bei einer Dosis von 1 kGy in der  $\gamma$ -Bestrahlung wurde auch in einer frühen Studie von Townshend (1967) beobachtet, die bei einer Dosis von 1,28 kGy eine Stimulation des Schlupfs des Rübenzystennematoden *H. schachtii* beobachtete. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in einer partiellen Auflösung der Zystenwand und der damit verbundenen höheren Durchlässigkeit für die schlupf-induzierenden PRD liegen. Obwohl dieser Effekt bei geringen Strahlendosen bis zu 4 kGy für *G. rostochiensis* stärker als für *G. pallida* ausgeprägt war, zeigten beide Arten Schlupfaktivitäten von mindestens 25%. Eine Verminderung des Schlupfs vitaler Juvenilen im Feld kann dabei generell aufgrund des besseren Verhältnisses von Nahrungsangebot zur Populationsdichte und des damit bei Kartoffelzystennematoden spezifischen höheren Auftretens weiblicher Tiere paradoxerweise sogar einen kurzzeitigen Populationsanstieg bewirken, wie Seinhorst (1965) beobachten konnte. In unseren Untersuchungen wurden stets Schlupfaktivität und Reproduktion im Biotest untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die beobachtete Reproduktion, ermittelt anhand der Anzahl neu gebildeter Zysten, mit Ausnahme der  $\gamma$ -Bestrahlung bei 1 kGy in Parabraunerde aus dem Emsland (mit höherer Dichte) in allen Fällen nahezu vollständig zum Erliegen kam (**Abb. 37**). Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen der Studie von Townshend (1967) überein, die bei einer Dosis von 1,28 kGy keine Reproduktion der Nematoden nachweisen konnte. Townshend führte dies auf die durch die Strahlung bewirkten Stoffwechselbeeinträchtigungen der Juvenilen zurück, die noch vor der Ausdifferenzierung zu adulten Tieren abgestorben sind. Die meisten Studien haben ausschließlich die Reproduktionserfolge und damit die komplette Generationsfolge der Nematoden betrachtet, wobei die Überschätzung der Lebensfähigkeit der behandelten Tiere im Schlupftest nicht aufgefallen ist. Im Endeffekt ist die gezielte Wirkung von Strahlendosen zwischen 4 und 8 kGy mit effizienten Behandlungserfolgen gegen Zystennematoden, die das Bakterien- und Pilzmikrobiom des Bodens nahezu unbeeinträchtigt lässt, ein Vorteil der Technik gegenüber anderen physikalischen Verfahren (z.B. Hitzebehandlung bei 80°C), da die biologischen und physiko-chemischen Eigenschaften des Bodens erhalten bleiben. Dies konnte in den von uns durchgeführten Versuchen zur Maisansaat (**Abb. 38**) bestätigt werden. Nicht zuletzt ist die Bestrahlung mit einem durchschnittlichen Energiebedarf von 0,6

kWh pro 0,5 m<sup>3</sup> Resterde mit einem Faktor 10, verglichen zur Mikrowellenerhitzung des Bodens, das weitaus günstigste der untersuchten physikalischen Behandlungsverfahren. Die technischen Herausforderungen bestehen dabei allerdings in der Vorbereitung der Resterden und der nicht kontinuierlichen Behandlung, da die mit Resterde einer Schichtdicke ≤ 15 cm beladenen Container nacheinander in der Bestrahlungskammer der Strahlungsquelle bis zum Erreichen der Dosis auszusetzen sind. Daraus resultierend kommt das Bestrahlungsverfahren vermutlich nur für kleinere bis mittlere Resterdevolumina von wenigen 100 t in Frage. Das Verfahren könnte jedoch über Zystennematoden hinaus, auch für weitere bodenbürtige Schaderreger wie den Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*) angewendet werden, was allerdings eine Behandlung der Resterde abhängig vom Gehalt an organischen Verbindungen bei wesentlich höheren Strahlendosen von (8) - 15 - 50 kGy (folgend der Studie von McNamara *et al.* 2003) notwendig macht.

## **AP2 – Behandlung mit ozoniertem Wasser und Spaltprodukten von NaCl in wässrigen Lösungen**

In einer aktuellen Studie des Jahres 2021 wurde die Nutzung von unter Verwendung einer Diamant-Elektrode hergestelltem ozoniertem Wasser als kostengünstige Methode zur Bekämpfung freilebender Nematoden im Feld vorgestellt (Kanfra *et al.* 2021). Erprobt wurde das Verfahren in Zusammenarbeit mit unserem Projektpartner Fraunhofer IST zur Bekämpfung der Bodenmüdigkeit im Apfelanbau (*apple replant disease*), die u.a. durch die freilebende Nematodenart *Pratylenchus penetrans* hervorgerufen wird. Die nicht durch eine Zysten-hülle geschützten Juvenilen und adulten Tiere dieser Nematodenart konnten durch Einsatz des ozonierten Wassers bereits bei Ozonkonzentrationen von etwa 0,6 g O<sup>3</sup> l<sup>-1</sup> in ihrer Abundanz, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, bis zu 60% reduziert werden. Einher ging die Verringerung der Nematodenabundanz mit einer deutlichen Verminderung der Krankheitssymptome an mehrjährigen Apfelschösslingen begleitet von einer höheren Biomasseproduktion. Bereits einmaliges Gießen zeigte erste Behandlungserfolge, jedoch konnte auch eine längerfristige, wiederholte Behandlung mittels ozoniertem Wasser keine komplette Tilgung der Nematodenpopulation bewirken. Überlebensraten von 19-36 % vitaler im Boden verbleibender Tiere stellen zudem aus pflanzengesundheitlicher Sicht keine zufriedenstellende Behandlung dar. Eine Reihe von Nematodengattungen, z. B. die Jungtiere der sedentären Wurzelgallennematoden *Meloidogyne* spp sowie nicht-sedentäre Nematodengattungen *Ditylenchus* spp. und *Aphelenchoides* spp., sind zudem in der Lage, bedrohliche Umweltbedingungen über mehrere Monate hinweg durch Anabiose, einen vertieften Ruhezustand mit nahezu vollständig herabgesetztem Stoffwechsel zu überleben (Perry & Wright 1998). Dies führt zeitlich versetzt zur Ozonbehandlung nach Überwindung der unvorteilhaften Umweltbedingungen zur Re-Vitalisierung behandelter überlebender

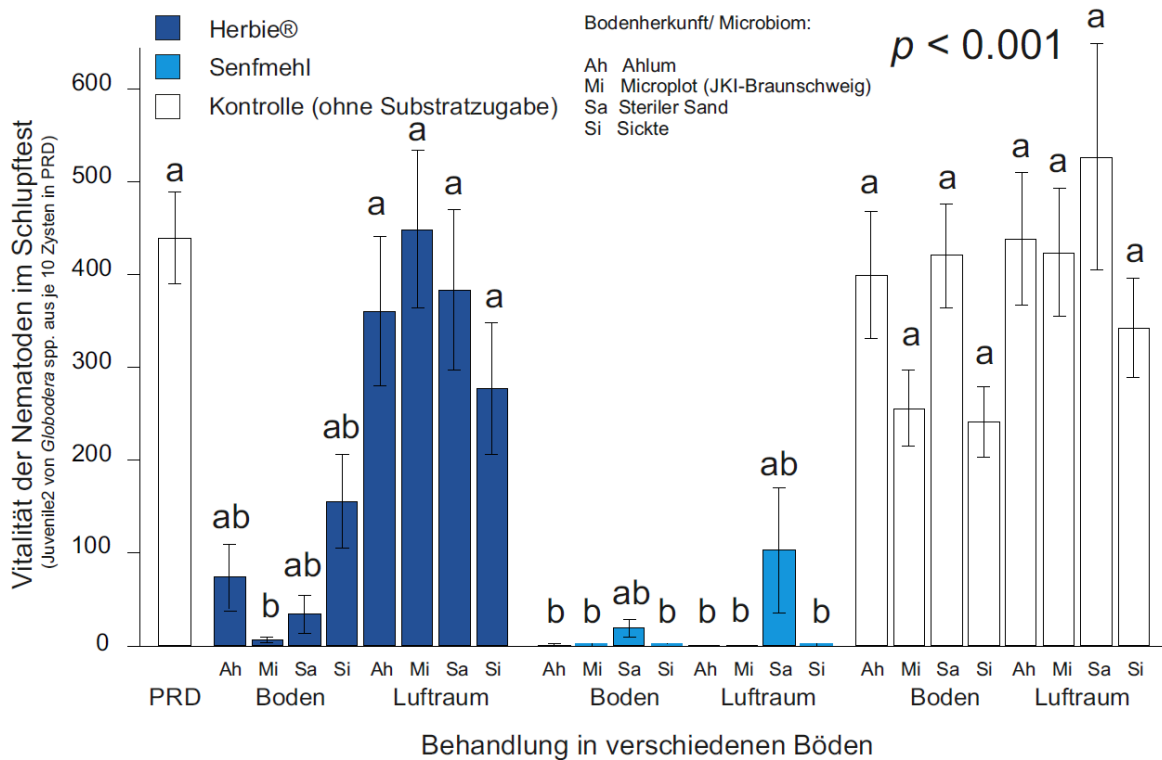
Nematoden, die bis dato nicht durch Auswanderung im Baermann-Trichter aus dem Boden extrahiert werden konnten.

## **AP2 – Anaerobe Bodendesinfektion (ASD) und Biofumigation**

Die Behandlungswirkung der anaeroben Bodendesinfektion (ASD) ist abhängig von Bodenfeuchte, dem Bodenvolumen und zu einem geringeren Grad auch den Bodeneigenschaften. Unter zu trockenen Bedingungen ohne zusätzliche Anfeuchtung der behandelten Erde (sandiger Ton) im Mikroplot war eine Behandlung mit HERBIE® unabhängig von der eingesetzten Menge (5/10/15 g/l) artabhängig mit großen Unterschieden versehen. Die Behandlung war in allen Fällen mit mindestens 10% verbleibender Schlupf- bzw. Reproduktionsrate nicht ausreichend, um ein Etablierungsrisiko der Zystennematoden bei Rückbringung der behandelten Resterden in Feldflächen auszuschließen. Während in diesem Versuchsansatz unter Freilandbedingungen für *G. rostochiensis* und *H. schachtii* verglichen zur Kontrolle teils höhere Schlupfraten bei zunehmender HERBIE®-Konzentration zu beobachten waren, waren alle dem Boden ausgesetzten Ansätze von *G. pallida*, unabhängig von der Substratmenge und der Abdeckung mit Folie in ihrem Schlupfverhalten gegenüber den Kontrollen, die nicht in den Boden eingebracht wurden („Positivkontrollen“), mit 10-20% verbleibenden Schlupf stark herabgesetzt (**Abb. 43**). Dies spricht zum einen für eine höhere Widerstandsfähigkeit von *G. rostochiensis* und *H. schachtii* für zumindest teilweise anaerobe Bedingungen (s.o.), ist jedoch für die Art *G. pallida*, die auch in den unbehandelten Kontrollen nur einen geringen Schlupf von 25 Juvenilen pro Zyste zeigte, nur bedingt aussagekräftig. Für die genutzten Referenzzysten von *G. pallida* ist ein vertiefter Ruhezustand (Quiescence, siehe Abschnitt Schlupf- und Biotest, Seite 74f.) anzunehmen, da die behandelten, jedoch nicht geschlüpften Eier kaum morphologischen Schädigungen aufwiesen. Diese stark heterogene Wirkung bei Einbringung des ASD-Substrates und der zu behandelnden Nematodenzysten in die obersten 10 cm der nach unten nicht abgeschlossenen Mikroplots lässt auf eine nur unzureichende Behandlungswirkung schließen, die stärker auf exogene Einflüsse der Erwärmung bzw. Austrocknung (z.B. *H. schachtii* stirbt relativ schnell im ausgetrockneten Zustand ab, siehe Abschnitt Inundation, Seite 52) unter der Folie als auf das Erreichen anaerober Zustände zurückzuführen ist. Wie dem auch sei, mit Ausnahme von *G. rostochiensis* konnte der Effekt der Folienabdeckung allein bereits eine als Trend vorhandene Reduktion des Schlupfs der Eier/Juvenilen in *G. pallida* und *H. schachtii* bewirken, der als solcher auch in der Literatur für Versuche ohne Substrateinbringung unter stärker kontrollierten Bedingungen in abgeschlossenen Mesokosmen beschrieben wurde (Runia et al. 2014). Bei der Wiederholung der Versuche im geschlossenen System von Plastikeimern mit Füllmenge von 15 l und zusätzlichem Luftraum von 5 l unter kontrollierten Bedingungen nach Anfeuchtung verschiedener Bodenarten auf 20% v/v wurde durch Zugabe beider Substrate, HERBIE® und Senfsaatmehl, eine nahezu



vollständige Inaktivierung von Schlupf- und Reproduktion bei >99% der eingesetzten Kartoffelzystennematodenarten erzielt. Damit wurden die in der Literatur dargestellten Ergebnisse für HERBIE® (Runia *et al.* 2014) auch für das Alternativsubstrat Senfsaatmehl bestätigt. Die in diesen Versuchen genutzten Kontrollen ohne Substratzugabe bei erfolgter Anfeuchtung unter Luftabschluss zeigten vergleichbar zur Studie von Runia *et al.* (2014) ebenfalls eine Behandlungswirkung hinsichtlich der Verminderung von Schlupf- und Reproduktion, wobei die stärker sandigen und damit grobkörnigeren Bodenarten im Trend etwas stärker auf den Luftabschluss reagierten als der Boden mit der geringsten Körnung (toniger Schluff, Sickete; **Abb. 44b**). Die im Versuch unter Freilandbedingungen zu beobachtende geringere Schlupf- und Reproduktionsrate von *G. pallida* im Vergleich zu *G. rostochiensis* war abgeschwächt auch in diesen Versuchen zu beobachten. Obwohl die Vorgänge in den Mesokosmen *per se* nicht begleitend hinsichtlich der Sauerstoffverdrängung, CO<sub>2</sub> Anreicherung und Abgabe organischer volatiler Säuren untersucht wurden, ist davon auszugehen, dass bei vollständiger mikrobieller Verarbeitung der hinzugefügten Substrate bzw. organischen Bestandteile im behandelten Boden, diese von Runia *et al.* beschriebenen Vorgänge maßgeblich zum Behandlungserfolg beigetragen haben. Der Einfluss verschieden diverser mikrobieller Gemeinschaften scheint dabei im Unterschied zur Bodentextur nochmals von untergeordneter Bedeutung zu sein. Selbst der grobkörnige Sand, der als Kontrollboden verwendet worden ist und kaum organisches Material (einschließlich mikrobieller Biomasse) aufweist, hatte versetzt mit den beiden Substraten eine vollständige Inaktivierung der Zysten erzielt. Dies ist vermutlich auf die mit dem Substrat vermittelte mikrobielle Artengemeinschaften zurückzuführen, die auch bei annähernd sterilen Böden unter optimalen Feuchtebedingungen und Luftabschluss eine anaerobe Bodendesinfektion in Gang setzen können. Die miniaturisierten Versuche zur ASD im Falcon-Tube haben verglichen zum Mesokosmenversuch trotz Zugabe des Mikrobioms aus den 4 Untersuchungsböden zu sterilem Sand, einer Einstellung des Wassergehaltes auf 20% v/v und der gleichen Substratkonzentration eine nur unzureichende Behandlungswirkung im Boden erzielt. Während keine Unterschiede für die im Luftraum platzierten Zysten für das Substrat HERBIE® zu beobachten waren, konnte demgegenüber aber eine akzeptable >98% Inaktivierung des Schlupfs bzw. der Reproduktion der PCN durch Senfsaatmehl induziert (**Abb. 48**).



**Abbildung 48:** Unterschiede der verschiedenen Substrate Herbie® und Senfsaatmehl aus *B. juncea* auf den Schlupf von *G. rostochiensis* aufgetrennt nach den einzelnen Mikrobiomfiltraten aus den verschiedenen Böden in Ahlum (Ah), Mikroplot (Mi), Sand (Sa) und Sickte (Si); Lediglich der Boden der Mikroplotanlage konnte unter Zusatz von HERBIE® eine Behandlungswirkung von ca. 98% im Vergleich zum Schlupf der nicht im Boden eingebrachten PRD-Kontrolle erzielen. Alle übrigen HERBIE® behandelten Böden waren zur PRD-Kontrolle als auch zu den korrespondierenden Kontrollen im Boden ohne Substratzugabe nicht verschieden. Bei der Behandlung mit Senfsaatmehl wies lediglich reiner Sand eine, nicht zu den Kontrollen verschiedene, geringere Behandlungswirkung auf.

Mit Ausnahme von sterilem Sand war die Behandlungswirkung im 25 ml Ansatz unter Verwendung von Senfsaatmehl in allen Bodentypen und im Luftraum gegeben. Diese Behandlungswirkung beruht wahrscheinlich auf der dissoziativen Umsetzung auch kleiner Mengen von Senfsaatmehl in wassergesättigten Böden. Beschrieben wird diese Form der Behandlung als Biofumigation, was sich durch den Behandlungserfolg im Luftraum widerspiegelt (Angus *et al.* 1994, Buskov *et al.* 2002, Lazzeri *et al.* 2004). Literaturangaben (u.a. Thoden *et al.* 2011) berichten von einer enzymatischen Umsetzung der in Senfsaatmehl enthaltenen Glycoside durch das im pflanzlichen Gewebe einiger Arten von *Brassica* spp. enthaltene Enzym Myrosinase, welches durch Hydrolyse u.a. Methyl-Isothiocyanat abspaltet. Es entwickelt sich Senfgas und damit der gleiche Wirkstoff, der im Pflanzenschutzmittel Basamid enthalten ist. Der Prozess ist von Temperatur, pH und Feuchtigkeit abhängig. Damit kann Senfsaatmehl seine nematizide Wirksamkeit unabhängig vom Mikrobiom und dessen Abbauaktivität entfalten. In der Literatur wurde die Zusammensetzung der Mikrobiome beschrieben, insbesondere die positive Korrelation von sogenannten

Lactobakterien (Abteilung Firmicutes, u.a. *Bacillus* spp.), die Milchzucker in Milchsäure umwandeln bzw. die nematizid wirksame Polyhydroxybuttersäure (PHB) ausscheiden können (Runia *et al.* 2014). Bei der direkten Isolierung von Mikroorganismen aus den Zysten wurden sporadisch *Bacillus*-Arten festgestellt, von denen ein Einzelfund von *Bacillus* (syn *Priestia*) *megaterium* tatsächlich PHB bilden können. Des Weiteren wurden mit *Serratia plymuthica* und *Bacillus lichinoformis* Organismen isoliert, die in der Lage sind, tierische Proteine (u.a. Keratin) aufzulösen und damit beim Abbau von Insekten und Fadenwürmern im Boden eine Rolle spielen. Leider sind diese Organismen in der Direktanalyse der amplifizierten DNA im Hochdurchsatz-Sequenzier-Verfahren nicht identifiziert worden.

## **6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.**

Im folgenden Abschnitt wird auf Vor- und Nachteile der einzelnen im Projekt vergleichend untersuchten Tests zur Lebens- und Entwicklungsfähigkeit sowie der Behandlungsverfahren von Resterde hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit in die Praxis eingegangen. Vertiefende Darstellungen zu den einzelnen Behandlungsverfahren sind den unter Punkt 10 des Berichtes vermerkten Veröffentlichungen zu entnehmen.

Obwohl zusammenfassend die Testmethoden Schlupf- und Biotest zur Lebens- und Entwicklungsfähigkeitsbewertung von Eiern und Juvenilen im Jahresverlauf keine konstanten Ergebnisse über den Jahresverlauf erzielen und immer vom endogenen Zustand der Nematodeneier zum jeweiligen Zeitpunkt abhängig sind, sind jedoch der relative Schlupf in PRD bzw. der Biotest an der Wirtspflanze (in Prozent) behandelte Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aussagekräftig genug, um die Wirksamkeit der Behandlung sicher quantifizieren und bewerten zu können. Demgegenüber war der Vorteil der quantitativ nicht mit konstanter Zuverlässigkeit behafteten Methoden der Trehalosegehaltsbestimmung sowie der Bindung zellfreier DNA aus geschädigten nicht lebensfähigen Tieren unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt anwendbar. Dies ist dadurch bedingt, dass beide Testmethoden keines *in-vitro* Systems von Wirtspflanzen im zur Infektion geeigneten Entwicklungsstadium im Biotest bedürfen bzw. unabhängig vom Dormanzstatus der Zysten im Schlupftest genutzt werden können. Obwohl beide Tests weniger zeitaufwendig sind, funktionieren sie nur für kleine Stichproben von jeweils einzelnen Eiern/Juvenilen aus ein bis zwei Zysten lediglich bedingt zuverlässig im linearen Bereich. Als qualitative Nachweismethode ist das Verfahren der Trehalose-Gehaltsbestimmung aus Zellmembranbestandteilen der in den Eiern befindlichen Juvenilen *per se* geeignet, sollte jedoch mit abgetöteten Zysten tiefgreifend validiert werden, um falsch-positive Bewertungsergebnisse durch nicht abgebaute Restmengen an Trehalose v.a. bei Extrakten höherer Zystenanzahlen zu vermeiden. Beim Verfahren der PMA-vermittelten Bindung zellfreier DNA kann zusammenfassend festgestellt

werden, dass eine Bindung zellfreier DNA mittels Propidium-Monoazid ein funktionierender Ansatz für eine kleinere Anzahl von bis zu 3 Nematodenzysten (>600 Eier/J2) darstellt, die in Verbindung mit einer absoluten Quantifizierung anhand einer zuvor erstellten Standardkurve in einer bei allen Konzentrationen mit gleicher Effizienz ablaufenden PCR, qualitativ und quantitativ akzeptable Ergebnisse liefern kann. Allerdings wird dies in der Praxis nur über die auf Ergebnissen einer tiefgreifenden Validierung mit verschiedenen Konzentrationen lebensfähiger Eier/Juvenile beruhende Festlegung eines cut-off  $C_T$ -Wertes in der Real-Time PCR erfolgen können, um der Gefahr einer Überschätzung der Anzahl lebensfähiger Tiere vorzubeugen. Auch für die Färbemethoden ist eine Durchführung der Tests unabhängig von Jahreszeit und Ruhestadium der Eier und Juvenilen gegeben. Jedoch ist durch die verschiedenen Grade der Anfärbbarkeit der zu untersuchenden Tiere bei diesem Test eine Überschätzung lebensfähiger Tiere noch stärker als in allen übrigen Testmethoden gegeben. Für die praktische Untersuchung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit im Rahmen des jährlichen Kartoffelzystennematoden-Monitorings, wie in der BekämpfungsVO (EU) 2022/1192 gefordert, sollten in erster Linie Schlupftest und Biotests genutzt werden. Biotests an einem Spektrum von 3-7 Sorten mit verschiedener Anfälligkeit gegenüber den einzelnen Pathotypen von *G. pallida* und *G. rostochiensis* sind zudem die Grundlage der auszusprechenden Empfehlungen von Sorten im Bekämpfungsprogramm auf mit PCN befallenen Flächen nach Art. 8 dieser Verordnung. Eine Bewertung auf Grundlage morphologischer Merkmale bzw. nach Anfärbung ist nur für kleinere Probenumfänge praktisch sinnvoll und zuverlässig durchzuführen.

Das Behandlungsverfahren der **Inundation** ist zusammenfassend ein sicheres, kontinuierlich wirkendes, d.h. nur unwesentlich durch Randeffekte etc. beeinflusstes Verfahren zur Behandlung größerer Mengen an Resterde. Andererseits hat die bei der anaeroben Inundation unvermeidbar auftretende Geruchsbelastung bereits in Einzelfällen zum Rückbau von Stapelteichen zur Abwasserbehandlung in Zuckerfabriken geführt. Wie dem auch sei, stellt die Inundation für Betriebe mit ausreichenden Reserven an Raumkapazität zur Anlage von Stapelteichen das wirksamste der untersuchten Verfahren zur phytosanitär sicheren Behandlung von Zystennematoden, insbesondere *G. pallida* und *G. rostochiensis*, für mehrere 10.000 t Resterde pro Jahr dar. Verfahren auf der Basis einer **thermischen Behandlung** der Resterde sind, abhängig vom Prozess der Hitzeerzeugung und dem mehr oder weniger kontinuierlichen Durchlauf der Resterde in den jeweiligen Anlagen, sichere bis sehr sichere Verfahren zur erfolgreichen Bekämpfung von Zystennematoden. Bei der Anwendung der verschiedenen Verfahren zur Wärmeübertragung auf die Resterde ist jedoch sicherzustellen, dass eine Aggregatbildung mit nur ungenügender Hitzedurchdringung durch z.B. mechanisch bewirkte ständige Umwälzung in einem Trommeloffen bzw. dem Schneckengetriebe der Logmed 1 verhindert wird, um einen kontinuierlichen

Behandlungserfolg großer Resterdemengen zu gewährleisten und damit das Risiko der Verschleppung lebensfähiger Zysten im landwirtschaftlichen Bereich zu minimieren. Weiterhin scheinen Anlagen mit ständigem Durchlauf von Resterden v.a. hinsichtlich der hohen in der Praxis anfallenden Mengen eher geeignet als statische Verfahren in Containern beispielsweise einer Dämpfungseinrichtung oder eines Plattenheizsystems. Energetisch ist die Wärmeübertragung mittels Mikrowellenstrahlung effizienter als eine Übertragung über Dampf bzw. aufgeheizte Platten. **Kompostierung** kann zusammenfassend als wirksames Verfahren zur Abtötung von Zystennematoden genutzt werden, trotz der nach der Behandlung noch zu beobachtenden bis zu 4% schlupffähiger Eier/J2 von *H. schachtii*. Mit Beimischung von Resterde, die im Projekt nicht untersucht wurde, erhöht sich jedoch das Risiko der Ausbildung „blinder Flecken“, in denen keine wirksame Behandlung sowohl die Temperatur als auch die vermutete Wirkung nematizider Stoffe betreffend, erreicht wird. Durch häufiges Umsetzen (1x wöchentlich) und homogenes Einarbeiten der Resterde in das mikrobiologisch abbaubare organische Material der Kompostmieten sollte eine effiziente Prozesssteuerung dennoch erreichbar sein. Verstärkt wird diese durch eine vorangehende anaerobe Fermentierung, bei der zumeist große Mengen nematizid wirkender organischer Verbindungen entstehen können. Bei der **Bestrahlung mittels  $\beta$ -Elektronen- und  $\gamma$ -Strahlung** ist ebenfalls eine sichere Behandlungswirkung gegen Zystennematoden zu erzielen, wobei  $\beta$ -Elektronenstrahlung aufgrund des geringeren Zeitaufwandes zum Erreichen der erforderlichen Strahlendosen  $>4$  kGy zu bevorzugen ist. Zudem bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, gezielt spezifische Schaderreger (Zystennematoden, bodenbürtige Pilze) abhängig von der zu erreichenden Strahlendosis zu behandeln. Entscheidender Nachteil des Verfahrens ist zum einen der technisch nur bedingt gerechtfertigte negative Ruf radioaktiver Anwendungen und zum anderen die geringe Kapazität an Resterde, die pro Zeitintervall in den Kammern behandelt werden kann. Eine bereits bei einigen freilebenden Nematodenarten (u.a. Vertreter der Gattung *Meloidogyne* spp.) zu beobachtende Anpassung der Tiere nach regelmäßigem Aussetzen nicht letaler Strahlendosen ist bei den mit sich nur in 1 bis 1,5 Generationen pro Jahr vermehrenden Kartoffelzystennematoden absehbar nicht zu erwarten. In unseren Untersuchungen konnten weder der Einsatz von **ozoniertem Wasser** als auch die **Anreicherung von aktivem Chlor** eine Verminderung von Schlupf- und Reproduktionsaktivität der in den Zysten geschützten Eier und Juvenilen bewirken. Des Weiteren ist v.a. letzteres Verfahren mit umweltbelastenden Anreicherungen von Salzen im Boden verbunden und eignet sich deshalb *per se* nicht zu einer Behandlung von Böden, die im Anschluss in den landwirtschaftlichen Produktionskreislauf zurückverbracht werden sollen. Damit ist dieses Behandlungsverfahren das einzige im Projekt untersuchte Verfahren, dass keine Herabsetzung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit für alle von uns untersuchten Arten

von Zystennematoden erzielen konnte. Abschließend kann aus den Ergebnissen der Versuche zur **anaeroben Bodendesinfektion** geschlossen werden, dass dieses Verfahren hochwirksam zur Behandlung von zystenbildenden Nematoden eingesetzt werden kann, jedoch auf Umgebungsparameter wie Bodenfeuchte und homogene Einarbeitung der Substrate in den Boden zu achten ist. Das Verfahren hat sich bei nur unvollständig ausgebildeten anaeroben Bedingungen u.a. bei nur oberflächlich eingearbeitetem Substrat als wirkungslos erwiesen, was beim Praxiseinsatz eine kontinuierliche Beobachtung des zudem geruchsintensiven Verfahrens notwendig macht, um der Ausbildung blinder Flecken mit nur unzureichender Behandlungswirkung vorzubeugen.

## 7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Arbeitspakete (AP)	Bearbeitungsstand zu Projektende 31.08.2023
<p>AP 1</p> <p><b>M2 Bestimmung der Effizienz von Methoden zur Bewertung der Lebens- und Entwicklungsfähigkeit von Zystennematoden</b></p>	<p><b>AP 1 ist für folgende Punkte erreicht:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Schlupftest mit PRD <u>zusätzlich</u> künstliche Schlupf-induzierende Reagenzien (Pikrolonsäure)</li> <li>(ii) Biotest</li> <li>(iii) Färbeverfahren und morphologische Bewertung am Lichtmikroskop</li> <li>(iv) Bestimmung des Trehalose-Gehalts</li> <li>(v) Untersuchung der DNA nach Inkubation der Eier und Juvenilen in Blocking-Reagenz (Propidium-Mono-Azid; PMA)</li> </ul> <p>Ursprünglich geplant und nicht umgesetzt: Untersuchung der Lebensfähigkeit auf Basis von RNA wurde nicht durchgeführt<sup>1)</sup> (Begründung s.u.)</p> <p>Erfolgreich weiter im Projekt verwendete Verfahren waren Schlupf- und Biotest (PCN) sowie Schlupftest mittels ZnCl<sub>2</sub>-Lösung/ Biotest mit <i>Brassica</i> spp.-Wirtspflanzen (Rübenzystennematoden).</p>
<p>AP 2</p> <p><b>Testung und Weiterentwicklung von Verfahren zur Resterdenbehandlung</b></p>	<p><b>AP2 ist für folgende Verfahren (und Meilensteine) erreicht:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Inundation (<b>M3</b> für verschiedene Teilprozesse; <b>M4</b>; <b>M5</b> Publikation s. Pkt. 10) <b>M1</b> ist für die Inundation nicht umsetzbar</li> </ul>

<p><b>M1 Bestimmung der letalen Dosis zur Bekämpfung von Zystennematoden OHNE Umgebungsmatrix</b></p> <p><b>M3 Mesokosmenversuche zur Bewertung der Wirksamkeit verschiedener Behandlungsverfahren</b></p> <p><b>M4 Freilandversuche zur Bewertung der Anwendbarkeit und Wirksamkeit der Resterdenbehandlungsverfahren unter Praxisbedingungen</b></p> <p><b>M5 Erarbeitung von Informationsmaterial</b></p>	<p>(ii) Kompostierung (<b>M4; M5</b> Publikation s. Pkt. 10) <b>M1</b> und <b>M4</b> sind für das Verfahren Kompostierung nicht umsetzbar</p> <p>(iii) Thermische Behandlung bei 80°C zu erreichender Zieltemperatur (<b>M1; M3; M4; M5</b> Publikation gegenwärtig in Erarbeitung; s. Pkt. 10)</p> <p>(iv) Bestrahlung (<b>M1; M3; M5</b> Publikation s. Pkt. 10) <b>M4</b> Untersuchungen im Freiland nicht möglich, Mesokosmen mit mittlerem Resterdeumfang (ca. 5-10 kg) wurden unter Praxisbedingungen mit beiden Strahlungsarten behandelt</p> <p>(v) Behandlung mit ozoniertem Wasser und <u>zusätzlich</u> zum Projektantrag mit Spaltprodukten von NaCl in wässrigen Lösungen (<b>M1; M3</b>) <b>M4</b> aufgrund der nicht erfolgreichen Behandlung im mittleren Volumen (Mesokosmos) nicht durchgeführt; <b>M5</b> erfolgt im Rahmen einer 2024 geplanten deutschsprachigen Veröffentlichung (s. Pkt. 10)</p> <p>(vi) Anaerobe Bodendesinfektion (ASD; <b>M3; M4<sup>2)</sup>; M5</b> Publikation der Ergebnisse geplant für 2024/25); <b>M1</b> nicht sinnvoll für dieses Verfahren anwendbar</p> <p>Ursprünglich geplant und nicht umgesetzt: Das als Referenzverfahren im Antrag vorgesehene Verfahren einer Nematizidbehandlung mit Basamid® wurde aufgrund der in der Praxis kaum noch erfolgenden Verwendung des Mittels und der restriktiven Anwendungsbestimmungen im Kartoffelanbau nicht genutzt/erprobt<sup>3)</sup>; eine Solarisation im Rahmen der thermischen Behandlungsverfahren wurde aufgrund der nicht vorhandenen Freilandflächen mit der Möglichkeit einer Ausbringung lebender Referenzzysten nicht erprobt (indirekte Erprobung als Nebeneffekt zur ASD mit unzureichendem Erfolg in Mikroplots durchgeführt, s. Abschnitte zur ASD)</p>
--	--

<sup>1)</sup> RNA-Untersuchungen zur Lebensfähigkeitsbewertung wurden im Projektzeitraum von der Gruppe um Evelyn van Heese (Lombard *et al.* 2024, under review) in den Niederlanden erfolgreich für den Real-Time PCR TaqMan Assay nach Beniers et al. (2014) zur diagnostischen Identifizierung/Unterscheidung von *G. pallida* und *G. rostochiensis* erprobt. Die Erprobung erfolgte jedoch mit dem Ziel, eine qualitative Aussage über den Zustand der untersuchten Zysten zu treffen bzw. eine Artidentifikation im Zusammenhang mit einer Bewertung der Lebensfähigkeit des untersuchten Materials vorzunehmen und nicht unter dem im Projekt als notwendig erachteten Aspekt der quantitativen Bewertung der Lebensfähigkeit der Eier und Juvenilen in behandelten Zysten im Vergleich zur Kontrolle.

<sup>2)</sup> Anaerobe Bodendesinfektion ist im engeren Sinn ein Verfahren zur Desinfektion von Gewächshausflächen im geschützten Anbau, die Anwendung im Freiland (z.B. Erdlager eines Kartoffelverarbeitungsbetriebes) bedarf, wie am Beispiel der Mikroplotversuche belegt werden konnte, einer regelmäßigen Kontrolle von Bodenfeuchte und Anaerobie der unter der Folienabdeckung laufenden Behandlung, bzw. einer Beprobung der behandelten Resterden durch die zuständige Behörde nach erfolgter Behandlung. Wenn diese den Nachweis lebensfähiger Nematoden ergeben sollte, ist eine Lagerung bis zum Ende der gesetzlichen Frist von bis zu 15 Jahren erforderlich.

<sup>3)</sup> Eine anwendungsspezifische Zulassung von Basamid® zur Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden liegt gegenwärtig nicht vor (vermutlich aufgrund der geringen Wirksamkeit bei den zulässigen Höchstaufwandmengen von 500 kg/ha). Eine Anwendung auf Nicht-Kulturland bedarf zudem einer Sondergenehmigung, die unter der vorliegenden Indikation in der Praxis nicht erteilt wird.

## **8 Zusammenfassung**

Im Rahmen des Projektes GlobRISK wurde die Wirksamkeit verschiedener Behandlungsverfahren zur Tilgung pflanzenparasitärer Nematoden untersucht sowie Methoden zur quantitativen Bewertung der Wirksamkeit über die Bestimmung der Lebensfähigkeit von Nematoden getestet. Im Ergebnis der vergleichenden Untersuchungen der verschiedenen Methoden zur Quantifizierung lebender von bereits abgetöteten Eier bzw. Juvenilen in den inaktiv im Boden über längere Zeiträume überdauernden Zysten, wiesen alle Tests sowohl Vorteile als auch Nachteile auf. Die Vorteile der biologischen Anregung durch Wurzelexudate im Schlupftest bzw. der Reproduktionsfähigkeit der Tiere im Biotest an der Wirtspflanze Kartoffel hatten den klaren Vorteil einer vergleichbaren Quantifizierung des auch im natürlichen Umfeld zu erwartenden Schlupfs bzw. der zu erwartenden Reproduktion



unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus zwischen einer beliebigen Anzahl behandelter Zysten mit unbehandelten Kontrollen. Um die Nachteile der nur schwer vorauszusagenden Ruhephasen der Nematoden auszugleichen, ist es unabdingbar, dass sowohl die zur Behandlung herangezogenen Zysten, wie auch die unbehandelten Kontrollzysten aus dem gleichen Reproduktionszyklus entstammen und damit soweit wie möglich eine identische generative Vorgeschichte aufweisen. Die in vielen Pflanzenschutzdiensten genutzte morphologische Bewertung des Zustandes von Eiern/Juvenilen in den durch Zerdrücken bzw. mittels Skalpell geöffneten Zysten mit/ohne nachfolgende Anfärbung hat die Nachteile eines hohen Arbeitsaufwandes, individueller bzw. subjektiver Einschätzung der potentiellen Lebensfähigkeit und der Zerstörung lebensfähiger Eier/Juvenilen beim Vorgang des Herauslösend dieser aus den Zysten. Vorteil dieser wie auch der molekularbiologischen und biochemischen Verfahren ist die Unabhängigkeit vom Untersuchungszeitraum im Jahresverlauf. Jedoch empfiehlt es sich auch hier, Zysten der gleichen Reproduktionsphase zu verwenden, da diese bereits einen Einfluss auf Anzahl und Vitalität der Eier und Juvenilen in den Zysten besitzt. Die auf Basis der Bindung freier DNA mittels Propidium-Monoazid bzw. dem Nachweis des Lebensfähigkeitsindikators Trehalose beruhenden Verfahren haben sich als qualitativ zuverlässig, jedoch zur Quantifizierung als nur unzureichend geeignete Verfahren erwiesen. Zudem ist hier eine Limitierung auf nur wenige Zysten zur Lebensfähigkeitsuntersuchung gegeben.

Die im Projekt hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bewerteten Verfahren können abhängig von den örtlichen Gegebenheiten in den Betrieben mit Ausnahme der Verwendung oxidativ wirkender Detergenzien (Ozon, Spaltprodukte aus NaCl) als wirksam für eine Anwendung in der Praxis empfohlen werden. Allerdings gilt es auch hier, Vor- und Nachteile gegeneinander abzuwägen. Bei den Behandlungsverfahren auf biologischer Basis ist die Verwendung der Inundation in ihrer Zuverlässigkeit hinsichtlich einer homogenen Behandlung des komplexen Materials Boden sowie der Wirksamkeit für erhebliche Mengen an Resterde dem Verfahren der anaeroben Bodendesinfektion ohne Überstauung vorzuziehen. Obwohl bereits nach 3 Wochen eine erfolgreiche Behandlung in der anaeroben Überstauung (Inundation) ohne verbleibende Schlupf- und Reproduktionsaktivität für Kartoffelzystennematoden festgestellt werden konnte, war bei Rübenzystennematoden auch nach 59 Tage noch eine Restaktivität zu verzeichnen. Diese gegen Austrocknung überraschend anfällige Art aus der Schwestergattung der Kartoffelzystennematoden weist demnach eine erheblich höhere Widerstandsfähigkeit gegen anaerobe Bedingungen, biochemische Belastung durch im Stauwasser vorhandene organische Verbindungen und mikrobiologische Abbauvorgänge aus. Dies führt zusammenfassend zur Einschätzung, dass eine Behandlungszeit von 10 Wochen (statt 13 Wochen/90 d) im Stapelteich ohne eine die Behandlungszeit verkürzende zusätzliche Vorbehandlung mit Detergenzien wie Kalkmilch zu empfehlen ist, um eine

erfolgreiche Behandlung der Resterde durch dieses bereits in der Praxis bewährte Verfahrens sicherzustellen. Dies ermöglicht es zukünftig dem Zuckerrüben verarbeitenden Betrieb, der dankenswerterweise seine Behandlungsanlagen für die Untersuchungen zur Inundation im Projekt zur Verfügung gestellt hat, die Lagerzeit mehrerer 10.000 t Resterden in den Stapelteichen um 3 Wochen (23% Zeitersparnis) zu verkürzen und auf diesem Weg mehrere 100.000 € anfallender Kosten pro Jahr einzusparen. Die anaerobe Bodendesinfektion war nur unter stark kontrollierten Bedingungen mit vergleichbarem Behandlungserfolg zur Inundation durchführbar. Für eine Anwendung bei der Behandlung in Erdlagern sollte besondere Aufmerksamkeit auf eine konstante Anfeuchtung des Bodens auf 20% v/v, eine gleichmäßige Einarbeitung von mindestens 8 g Substrat pro Liter Resterde, sowie den luftdichten Abschluss der zu behandelnden Resterden gelegt werden. Die Behandlungszeit kann unter zu überwachenden optimalen Bedingungen auf 6 Wochen reduziert werden. Als Substrat kann neben kommerziell erhältlichen Gemischen (z.B. HERBIE®) alternativ auch Saatmehl von Brassicaceen (z.B. *B. juncea*) verwendet werden, wobei dies gegenwärtig unseres Wissens nach noch nicht praktiziert wird. In der Praxis ist zu erwarten, dass dieses wesentlich störungsanfälligeres Verfahren nicht zur Behandlung von zur Inundation vergleichbaren Mengen an Resterde geeignet ist. Letzteres trifft auch für die Kompostierung und die Gesamtheit aller physikalischen Behandlungsverfahren zu. Zur Kompostierung kann festgestellt werden, dass die Zeiträume von etwa 15 Tage anaerober Fermentation mit anschließender 10 Tage dauernden Durchlüftung/ Kompostierung ausreichend für eine Abtötung der Zystennematoden im überwiegend organischen Material war, wobei mindestens im gleichen Umfang die Wirksamkeit organischer mikrobieller Abbauprodukte während der Fermentation, im Verhältnis zur Temperaturerhöhung während der aeroben Kompostierung selbst, für die Erzielung des Behandlungseffektes notwendig ist. Eine zusätzliche Beimischung von Erde wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Für thermische Behandlungsverfahren wurde eine Behandlungsdauer von 30 sec bei 80°C als ausreichend geprüft, um die Nematoden wirksam abzutöten. Dies kann relativ schnell (innerhalb von ~2 min) über eine Erhitzung durch Mikrowellenstrahlung erfolgen, wurde jedoch auch mit anderen Verfahren, wie Dämpfung und Trockenerhitzung erreicht. Ingenieurtechnisch ist die Zuführung von Dampf mittels einer indirekten Übertragung der Wärme über Heizflächen für einen kontinuierlichen Behandlungsprozess größerer Mengen an Resterde denkbar (APRO Bericht 2017). Energetisch ist eine Übertragung mit Mikrowellenstrahlung am günstigsten, gefolgt von Trockenerhitzung und Dampferzeugung. Nochmals um fast das 10-fache günstiger im Energieaufwand ist die ionisierende Bestrahlung, wobei  $\beta$ -Elektronenstrahlung der weniger wirksamen  $\gamma$ -Strahlung vorzuziehen ist. Nachteilig bei diesem Verfahren ist jedoch der Umgang mit Strahlenquellen im Umfeld von Lebensmittelerzeugungsbetrieben und die nur bedingt mögliche kontinuierliche

Behandlung größerer Mengen an Resterde. Durch Erhöhung der Strahlendosis auf über 15 kGy würde zudem eine wirksame Behandlung von pilzlichen Schaderregern, wie *Synchytrium endobioticum*, dem Erreger des Kartoffelkrebses, der bisher nicht in dem hohen Umfang, wie Kartoffelzystennematoden, in landwirtschaftlichen Flächen auftritt, ermöglicht. Abschließend kann festgestellt werden, dass mit dem noch schwerer zu bekämpfenden Schaderreger *Synchytrium endobioticum* (Steinmüller *et al.* 2012) ein Quarantäneschädling in den letzten Jahren wieder verstärkt mit virulenten Populationen im Kartoffelanbau auftritt, an dem sich künftige Behandlungsverfahren zur Resterdedekontamination messen lassen müssen. Projekte in diesem Zusammenhang werden unter Beteiligung des JKI gegenwärtig durchgeführt.

Die im Projekt bearbeiteten Methoden zur Lebensfähigkeitsbestimmung von Eiern/Juvenilen in den Zysten sowie die bewertende Untersuchung vielfältiger biologischer und physikalischer Verfahren zur Bekämpfung von Zystennematoden in Resterden aus der Kartoffel- und Zuckerrübenverarbeitung wären ohne die Einstellung von zusätzlichem wissenschaftlichen und technischen Personal nicht realisierbar gewesen. Der mit der Bearbeitung der im Projekt durchgeführten Untersuchungen verbundene Mehraufwand, die Untersuchungen im Unterauftrag und die Beschaffung der zur Untersuchung notwendigen technischen Ressourcen wäre in dem Umfang aus der Grundfinanzierung der Institute JKI-Institut Pflanzengesundheit und JKI-Institut Pflanzenschutz im Ackerbau und Grünland nicht möglich gewesen.

## 9 Literaturverzeichnis

- Allen, C. (2005). *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*.
- Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A. & Desmarchelier, J.M. (1994). Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant Soil*, 162, 107–112.
- Beniers, J.E., Mendes, O., Van Gent-Pelzer, M.P., Van Der Lee, T.A. & Been, T.H. (2014). Quantification of viable eggs of the potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) using either trehalose or RNA-specific Real-Time PCR. *Nematology*, 16, 1219–1232.
- Berger, B., Daub, M., Gärtner, K., Becker, M. & König, S. (2022a). Tare Soil Disinfestation from Cyst Nematodes Using Inundation. *Life (Basel, Switzerland)*, 13.
- Berger, B., Schumann, L., Daub, M. & König, S. (2022b). An Evaluation of Irradiation Treatment to Disinfect Soil Tare from *Globodera* spp. *Agronomy*, 12, 464.
- Blok, W.J., Lamers, J.G., Termorshuizen, A.J. & Bollen, G.J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90, 253–259.
- Bundesministerium für Justiz (2013). *Bioabfallverordnung - Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden*. BioAbfV.
- Bundesministerium für Justiz (2010). *KartKrebs/KartZystV - Verordnung zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses und der Kartoffelzystennematoden*.

- Buskov, S., Serra, B., Rosa, E., Sørensen, H. & Sørensen, J.C. (2002). Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 690–695.
- Chinnasri, B., Moy, J.H., Sipes, B.S. & Schmitt, D.P. (1997). Effect of gamma-irradiation and heat on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 29, 30–34.
- Christoforou, M., Pantelides, I.S., Kanetis, L., Ioannou, N. & Tsaltas, D. (2014). Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide. *Plant Pathology*, 63, 1185–1192.
- Clarke, A.J. & Shepherd, A.M. Picrolonic Acid as a Hatching Agent for the Potato Cyst Nematode, *Heterodera rostochiensis* Woll. *Nature*, 1964, 546.
- Clarke, A.J. & Shepherd, A.M. (1964). Synthetic Hatching Agents for *Heterodera schachtii* and Their Mode of Action. *Nematologica*, 10, 431–453.
- Clarke, A.J. & Shepherd, A.M. (1968). Hatching agents for the potato cyst-nematode, *Heterodera rostochiensis* Woll. *Ann Applied Biology*, 61, 139–149.
- Crüger, G. (1983). *Pflanzenschutz im Gemüsebau*. 2nd edn. Ulmer, Stuttgart.
- Davis, E.L., Meyers, D.M., Dullum, C.J. & Feitelson, J.S. (1997). Nematicidal Activity of Fatty Acid Esters on Soybean Cyst and Root-knot Nematodes. *J Nematol*, 29, 677–684.
- Eberlein, C., Zhang, R., Adelati, A. & Westphal, A. (2019). Do Liquid Digestates, By-Products of Bioenergy Production, have Nematode-Suppressive Potential. [WWW document]. URL <https://progressivecrop.com/2019/09/do-liquid-digestates-by-products-of-bioenergy-production-have-nematode-suppressive-potential-2/>.
- Ebihara, K., Takayama, M., Ikegami, T., Ogata, K., Stryczewska, H.D. & Gyoutoku, Y. *et al.* (2006). Development of agricultural soil sterilization using ozone generated by high frequency dielectric barrier discharge. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 9, 170–173.
- Ebrahimi, N., Viaene, N., Aerts, J., Debode, J. & Moens, M. (2016a). Agricultural waste amendments improve inundation treatment of soil contaminated with potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *European journal of plant pathology*, 145, 755–775.
- Ebrahimi, N., Viaene, N., Aerts, J., Debode, J. & Moens, M. (2016b). Agricultural waste amendments improve inundation treatment of soil contaminated with potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Eur J Plant Pathol*, 145, 755–775.
- Eglitis, M., Johnson F. & Breakey, E.P. Soil pasteurization with high frequency energy. *Phytopathology*, 1956, 635–636.
- Endo, B.Y. (1962). Lethal time-temperature relationships for *Heterodera glycines*. *Phytopathology*, 52, 992–997.
- EPPO (2017). PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin*, 47, 174–197.
- EPPO (2021). PM 3/93 (1) Management of phytosanitary risks for potato crops resulting from movement of soil associated with root crops and potatoes. *EPPO Bull.*, 51, 418–435.
- EPPO (2022a). PM 3/66 (3) Guidelines for the management of plant health risks of biowaste of plant origin. *EPPO Bulletin*, 52, 518–525.
- EPPO (2022b). PM 7/40 (5) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin*, 52, 286–313.
- Epstein, E. (1997). *The Science of Composting*, Lancaster, Pennsylvania.

- European Commission (2022). *Commission Implementing Regulation (EU) 2022/1192 of 11 July 2022 establishing measures to eradicate and prevent the spread of Globodera pallida (Stone) Behrens and Globodera rostochiensis (Wollenweber) Behrens. (EU) 2022/1192.*
- Evans, K. (1970). The effects of gamma radiation on *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16, 284–294.
- Evans, K. (1991). Lethal temperatures for eggs of *Globodera rostochiensis*, determined by staining with new blue r. *Nematologica*, 37, 225–229.
- Falciglia, P.P., Bonifacio, A. & Vagliasindi, F. (2016). An Overview on Microwave Heating Application for Hydrocarboncontaminated Soil and Groundwater Remediation. *Oil and Gas Research*, 2.
- FAO (2003/2016). International Standard for Phytosanitary Measures 18 - Guidelines for the use of irradiation as a phytosanitary measure. ISPM 18. [WWW document].
- FAO (2018). International Standard for Phytosanitary Measures 15 - Regulation of wood packaging material in international trade. ISPM 15. [WWW document].
- Hallmann, J., Daub, M. & Wesemael, W. (2021). Estimating numbers. In: *Techniques for work with plant and soil nematodes* (ed. Perry, R.N., Hunt, D.J. & Subbotin, S.A.). CABI, Wallingford, Oxfordshire, Boston, MA, pp. 42–59.
- Heinicke, D. (1989). Spread of nematodes with sludge and sewage. *Kartoffelbau*, 40, 221–224.
- Hessler, A. (2016). *Möglichkeiten zur Behandlung der Rüttelerde. Vorplanung des Ingenieurbüro APRO GmbH zur Rübenerdebehandlung im Werk Uelzen der Nordzucker AG.*
- Josephson, K.L., Gerba, C.P. & Pepper, I.L. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 59, 3513–3515.
- Jothi, G., Pugalendhi, S., Poornima, K. & Rajendran, G. (2003). Management of root-knot nematode in tomato *Lycopersicon esculentum*, Mill., with biogas slurry. *Bioresource Technology*, 89, 169–170.
- Kaemmerer, D. (2012). Detection of viable potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) by reverse transcription PCR. *J. Plant Dis. Protect.*, 119, 100–106.
- Kanfra, X., Elhady, A., Thiem, H., Pleger, S., Höfer, M. & Heuer, H. (2021). Ozonated water electrolytically generated by diamond-coated electrodes controlled phytonematodes in replanted soil. *J Plant Dis Prot*, 128, 1657–1665.
- Kort, J., Ross, H., Stone, A.R. & Rumpfenhorst, H.J. (1977). An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica*, 23, 333–339.
- LaMondia, J.A. & Brodie, B.B. (1984). Control of *Globodera rostochiensis* by solar heat. *Plant disease*, 68, 474–476.
- Lazzeri, L., Curto, G., Leoni, O. & Dallavalle, E. (2004). Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 6703–6707.
- Lindhardt, K. (1959). *Kartoffelål – en samlet oversigt*. Statens Plantetilsyn, København.
- Lombard, L., Dekker-Noren, C., Wuijster, B., van Duivenbode, I., van Bruggen, A.H.C. & van Heese, E.Y. (2024). *Comparing the effectiveness of real-time PCRs to simultaneously detect and identify viable Globodera pallida and G. rostochiensis*. *Eur J Plant Pathol* in publication.
- Lord, J.S., Lazzeri, L., Atkinson, H.J. & Urwin, P.E. (2011). Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: Activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 7882–7890.
- Lücke, E. (1964). *Untersuchungen über die Verschleppung zystenbildender Nematodenarten durch landwirtschaftliche Abwasserverwertung*, Braunschweig, Biologische Bundesanstalt.

- Luna, G.M., Manini, E. & Danovaro, R. (2002). Large Fraction of Dead and Inactive Bacteria in Coastal Marine Sediments: Comparison of Protocols for Determination and Ecological Significance. *Applied and environmental microbiology*, 68, 3509–3513.
- Marks, R. J., Brodie, B. B. (ed.) (1998). *Potato cyst nematodes. Biology, distribution and control*. CAB Internat, Wallingford, Oxon.
- Matthiessen, J.N. & Kirkegaard, J.A. (2006). Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical reviews in plant sciences*, 25, 235–265.
- McNamara, N.P., Black, H.I., Beresford, N.A. & Parekh, N.R. (2003). Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology*, 24, 117–132.
- Meinecke, A., Ziegler, K., Bürcky, K. & Westphal, A. (2014). Composition of the stubble weed flora and its role for *Heterodera schachtii* in the year preceding sugar beet production. *Weed Research Society*, 54, 614–623.
- Meyer, S., Sayre, R.M. & Huettel, R.N. (1988). Comparisons of selected stains for distinguishing between live and dead eggs of the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 55, 132–139.
- Nelson, S.O. (1996). A review and assessment of microwave energy for soil treatment to control pests. *Transactions of the ASAE*, 39, 281–289.
- Noble, R. & Roberts, S.J. (2004). Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: A review. *Plant Pathology*, 53, 548–568.
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D. & Camper, A.K. (2007). Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. *Applied and environmental microbiology*, 73, 5111–5117.
- O'Bannon, J.H. & Good, J.M. (1971). Applications of microwave energy to control nematodes in soil. *Journal of Nematology*, 3, 93–94.
- Ogiga, I.R. & Estey, R.H. (1974). The Use of Meldola Blue and Nile Blue A, for Distinguishing Dead from Living Nematodes. *Nematologica*, 20, 271–276.
- Oka, Y. (2010). Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments-A review. *Applied Soil Ecology*, 44, 101–115.
- Oldani, E., Cabianca, A., Dahlin, P. & Ruthes, A.C. (2022). *Biogas digestate as potential source for nematicides*, Braunschweig.
- Ouden, H. den (1960). Periodicity in spontaneous hatching of *Heterodera rostochiensis* in the soil. *Nematologica*, 101–105.
- Papayiannis, L.C., Christoforou, M., Markou, Y.M. & Tsaltas, D. (2013). Molecular Typing of Cyst-Forming Nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*, Using Real-Time PCR and Evaluation of Five Methods for Template Preparation. *Journal of Phytopathology*, 161, 459–469.
- Perry, R.N. & Wright, D.J. (eds.) (1998). *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*.
- Potocek, J. (1991). Methods of direct protection against potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*). *Rostlinna Vyroba-UVTIZ (CSFR)*.
- Rahi, G.S. & Rich, J.R. (2008). Potential of microwaves to control plant-parasitic nematodes in soil. *The Journal of microwave power and electromagnetic energy: a publication of the International Microwave Power Institute*, 42, 5–12.
- Rahi, G.S. & Rich, J.R. (2011). Effect of Moisture on efficiency of microwaves to control plant - Parasitic nematodes in soil. *The Journal of microwave power and electromagnetic energy: a publication of the International Microwave Power Institute*, 45, 86–93.

- Rausch, S. & Bastuck, K. (2020). *Versuchsbericht der Nehlsen AG zur Abtötung von Kartoffelzystennematoden am 20.01.2020 bei SMHZ Stahl- und MetallbauHarz GmbH in Halberstadt, Bremen.*
- Runia, W.T., Molendirk, L.P., Ludeking, D.J. & Schomaker, C.H. (2012). Improvement of anaerobic soil disinfestation. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 77, 753–762.
- Runia, W.T., Thoden, T.C., Molendijk, L., van den Berg, W., Termorshuizen, A.J. & Streminska, M.A. *et al.* (2014). Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. *Acta Hort.*, 177–193.
- Schröder, T. (1999). *Über die Eignung verschiedener physikalisch-technischer Verfahren zur phytosanitären Behandlung und zur Lagerung von Forstsaatgut unter besonderer Berücksichtigung der Stiel- und Traubeneiche.* Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 1998, Berlin.
- Schumann, L., Berger, B., Daub, M., Böhlke, T. & König, S. (2023). Industrial-scale composting process as a successful method for inactivation of potato cyst nematodes (*Globodera* spp. Skarbilovich) and sugar beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt). *J. Plant Dis. Protect.*, 130, 1317–1330.
- Seinhorst, J.W. (1964). Methods for the Extraction of *Heterodera* Cysts From Not Previously Dried Soil Samples. *Nematologica*, 10, 97-94.
- Seinhorst, J.W. (1965). The relation between nematode density and damage to plants. *Nematologica*, 11, 137–154.
- Seo, Y. & Kim, Y.H. (2014). Control of Meloidogyne incognita Using Mixtures of Organic Acids. *Plant Pathol J*, 30, 450–455.
- Shepherd A.M.(1986). *Extraction and estimation of cyst nematodes.* In 'Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book No. 402'.(Ed. JF Southey) pp. 31–50. Her Majesty's Stationery Office: London.
- Shepherd, A.M. Extraction and estimation of cyst nematodes. In: *J. F. Southey Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes.*
- Shepherd, A.M. (1962). New Blue R, A Stain that Differentiates Between Living and Dead Nematodes. *Nematologica*, 8, 201–208.
- Spaull, A.M. & McCormack, D.M. (1988). The incidence and survival of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) in various sewage sludge treatment processes. *Nematologica*, 34, 452–461.
- Spaull, A.M., McCormack, D.M. & Pike, E.B. (1989). Effects of Various Sewage Sludge Treatment Processes on the Survival of Potato Cyst-Nematodes (*Globodera* spp.) and the Implications for Disposal. *Water Science and Technology*, 21, 909–916.
- Sprau, F. (1967). Das Verhalten von Zysten des Kartoffelnematoden in Kläranlagen. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt (BBA)*, 121, 39–44.
- Steinmüller, S., Bandte, M., Büttner, C. & Müller, P. (2012). Effects of sanitation processes on survival of *Synchytrium endobioticum* and *Globodera rostochiensis*. *Eur J Plant Pathol*, 133, 753–763.
- Stelter, H. (1981). Die Verschleppung von *Heterodera* und *Globodera*-Arten mit dem Abwasser aus einer Zuckerfabrik.
- Stone, L.E.W. & Wesley, D.P. (1975). The Effect of Heat on the Hatch of Potato Cyst Eelworms. *Plant Pathology*, 24, 74–76.
- Stremińska, M.A., Runia, W.T., Termorshuizen, A.J., Feil, H. & Van Der Wurff, A.W. (2014). Anaerobic soil disinfestation in microcosms of two sandy soils. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 79, 15–19.
- Thoden, T.C., Korthals, G.W. & Termorshuizen, A.J. (2011). Organic amendments and their influences on plant-parasitic and free-living nematodes: a promising method for nematode management? *Nematol*, 13, 133–153.

- Timmermans, B.G.H. (2005). *Solanum sisymbriifolium* (Lam.): A trap crop for potato cyst nematodes. *Proefschrift ter verkrijging van de graad van doctor*, Wageningen.
- Townshend, J.L. (1967). Gamma irradiation of *Heterodera schachtii* 1. *Nematologica*, 13, 586–592.
- van Assche, C. & Uytebroek, P. (1983). Possibilities of microwaves on soil disinfestation. *EPPO Bulletin/Bulletin OEPP*, 491–497.
- van Loenen, M.C., Turbett, Y., Mullins, C.E., Feilden, N.E., Wilson, M.J. & Leifert, C. *et al.* (2003). Low Temperature–Short Duration Steaming of Soil Kills Soil-Borne Pathogens, Nematode Pests and Weeds. *European journal of plant pathology*, 109, 993–1002.
- van Overbeek, L., Runia, W., Kastelein, P. & Molendijk, L. (2014). Anaerobic disinfestation of tare soils contaminated with *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and *Globodera pallida*. *European journal of plant pathology*, 138, 323–330.
- van Wambeke, E., Wijsmans, J. & d’Hertefeldt, P. (1983). Possibilities in microwave application for growing substrate disinfestation. *Acta Hortic.*, 209–217.
- Veronico, P., Paciolla, C., Sasanelli, N., De Leonardis, S. & Melillo, M.T. (2017). Ozonated water reduces susceptibility in tomato plants to *Meloidogyne incognita* by the modulation of the antioxidant system. *Molecular Plant Pathology*, 18, 529–539.
- Viaene, N., Ajmal, B., Bighiu, A., Damme, N. & Sutter, N. de (2019). Exploring heating of potato cysts as a method to disinfest soil. In: *Aspects of Applied Biology - 5<sup>th</sup> Symposium of Potato Cyst Nematode Management* (ed. Association of Applied Biologists), pp. 95–102.
- Zibilske, L.M. (1998). Composting of organic wastes. In: *Principles and applications of soil microbiology* (ed. Sylvia, D.M.). Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp. 482–497.

## 10 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

### Präsentationen:

#### 2019

**S. König:** Maßnahmen und Umgang mit den Unions-Quarantäneschadorganismen *Synchytrium endobioticum* sowie Kartoffelzystennematoden. (V Arbeitsbesprechung mit der niedersächsischen Ministerin für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Barbara Otte-Kinast, Vertretern der Landwirtschaftskammer Niedersachsen und der umsatzstärksten Firmen im Bereich der Kartoffelverarbeitung am JKI Braunschweig; 05.06.2019)

**B. Berger, S. König:** GlobRISK – Maßnahmen zur Schließung der Übertragung von Kartoffelzystennematoden durch Resterden. (V Fachtreffen der Arbeitsgemeinschaft Kartoffelzüchtung und Pflanzguterzeugung. JKI Braunschweig; 26.06.2019)

#### 2020

B. Berger, **M. Daub**, S. König: Maßnahmen zur Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden in Resterden. (V 40. Tagung des Arbeitskreises Kartoffel der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft DPG. Wien; 05.03.2020)

**B. Berger, C. Aukamp-Timmreck, M. Daub, S. König:** Phytosanitäre Maßnahmen zur Eindämmung von Zystennematoden in Resterden. (V 48. Tagung des Arbeitskreises Nematologie der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, DPG. Wien; 05.03.2020)

#### 2021



**S. König**, B. Berger, C. Aukamp-Timmreck, K. Schuldt: Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden in Resterden – GlobRISK. (FG, Fachgespräch *Synchytrium endobioticum* in Kleinmachnow mit Vertretern des JKI, der Länder und der Kartoffelwirtschaft, 06./07.02.2021)

**S. König** und B. Berger: Stapelteichversuche in den Kampagnen 2018/19 und 2019/20 – Untersuchungen zu Lebens- und Vermehrungsfähigkeit von PCN (FG "Rübenerde und Kartoffelschädlinge" organisiert durch den Verein der Zuckerindustrie (VdZ) und Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ))

**M. Daub**, **L. Schumann**, B. Berger, S. König: Versuche im Stapelteich und Bruknerbecken 2018-2021 – Ergebnisse zu *Heterodera schachtii*, *Globodera pallida* und *Globodera rostochiensis*. (FG Besprechung mit Vertretern der Nordzucker AG und der LWK Niedersachsen zum weiteren Vorgehen der Verbringung von mit Inundation behandelten Resterden aus Stapelteichen. 15.10.2021)

**L. Schumann**, B. Berger, C. Aukamp-Timmreck, K. Reimann, M. Daub und S. König: Bekämpfung von Kartoffel- und Rübenezystennematoden in Resterden. (V, 49. Tagung des Arbeitskreises Nematologie der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, virtuell)

**L. Schumann**, B. Berger, C. Aukamp-Timmreck, K. Reimann, M. Daub und S. König: Bekämpfung von Kartoffel- und Rübenezystennematoden in Resterden. (V, 62. Deutsche Pflanzenschutztagung, virtuell)

## 2022

**S. König**, B. Berger, M. Höfer, M. Daub: GlobRISK - Ergebnisse des Behandlungsverfahrens Ozonierung zur Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden in Resterden. (FG, Bilateraler Austausch zu Forschungsfragen JKI und Fraunhofer-Institut für Schicht und Oberflächentechnik (IST), 18.11.2022)

**S. König**, B. Berger, L. Schumann und M. Daub: GlobRISK - Ergebnisse verschiedener Behandlungsverfahrens zur Schließung der Verschleppungswege von Kartoffelzystennematoden in Resterden. (FG, Fachgespräch mit Vertretern der Länder zu EU DVO Kartoffelquarantäneschadorganismen, Berichte aus den Projekten am JKI, 24.11.2022, virtuell)

## 2023

**B. Berger**, M. Daub, L. Schumann, C. Aukamp-Timmreck, K. Reimann, S. König: GlobRISK-Methoden zur Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden in Resterden. (V, 63. Deutsche Pflanzenschutztagung: Pflanzenschutz morgen - Transformation durch Wissenschaft; 26. bis 29. September 2023)

### Artikel in Nicht-Referierten Zeitschriften:

## 2022

**Steinmüller, Silke; Fornefeld, Eva; Glenz, René; König, Stephan; Pfeilstetter, Ernst (2022):** Neue Verordnungen gegen Schaderreger. Kartoffelbau. 73 (11), 13-16.

[Link OpenAgrar](#)

### Artikel in Referierten Zeitschriften:

## 2020

**Berger, Beatrice; Becker, Matthias; Daub, Matthias; Steinmüller, Silke; König, Stephan (2020):** Kartoffelzystennematoden (*Globodera pallida*/ *G. rostochiensis*) und Kartoffelkrebs-Erreger (*Synchytrium endobioticum*) belastete Resterden – Status quo und Perspektiven effektiver Diagnosemethoden und Dekontaminationsverfahren. Journal für Kulturpflanzen. 72 (8), 421-434.

Doi: [10.5073/JfK.2020.08.13](https://doi.org/10.5073/JfK.2020.08.13)

[Link OpenAgrar](#)

## 2022

**Berger, Beatrice; Schumann, Lisa; Daub, Matthias; König, Stephan (2022):** An Evaluation of Irradiation Treatment to Disinfect Soil Tare from *Globodera* spp.. Agronomy. 12 (2), 464. R

**Doi:** [10.3390/agronomy12020464](https://doi.org/10.3390/agronomy12020464)

[Link OpenAgrar](#)

**Berger, Beatrice; Gärtner, Kathleen; Daub, Matthias; Becker, Matthias; König, Stephan (2022):** Tare soil disinfection from cyst nematodes using inundation. MDPI Life 13(1), 57, R

<https://doi.org/10.3390/life13010057>

## 2023

**Schumann, Lisa; Berger, Beatrice; Daub, Matthias; Böhlke, Tanja; König, Stephan (2023):**

Industrial-scale composting process as a successful method for inactivation of potato cyst nematodes (*Globodera* spp. Skrabilovich) and sugar beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt). Journal of Plant Diseases. 130 (6); 1317-1330. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00801-0>

**Berger, Beatrice; Schumann, Lisa; Daub, Matthias; König, Stephan:** Thermal treatment technologies at a practice-oriented level interrupt hatching and suspend reproduction of potato cyst nematodes (*Globodera* spp. SKARBILOVICH) in infested soils (in preparation)

## Poster:

### 2020

**B. Berger,** C. Aukamp-Timmreck, K. Schuldt, M. Daub, S. König: Entwicklung praktikabler Maßnahmen zur Schließung der Verschleppungswege von Kartoffel- und Zuckerrübenzystennematoden (GlobRISK). (BLE-Innovationstage Digital. 20.-21.10.2020)

### 2022

**S. König,** C. Aukamp-Timmreck, K. Reimann, C.-M. Gottwald, M. Daub, B. Berger: Development of appropriated measures to close pathways for the distribution of cyst nematodes. (7<sup>th</sup> International Congress of Nematology, Antibes, France, 01.05.2022 – 06.05.2022)

### 2023

**S. König,** B. Berger, M. Daub, K. Reimann, C.-M. Gottwald, A. Elhady: Anaerobe Bodendesinfektion als wirksames Verfahren zur Bekämpfung von Kartoffelzystennematoden, *Globodera pallida* (Stone) Behrens und *G. rostochiensis* (Wollenweber) Behrens, in Reststoffen aus der Verarbeitung von Kartoffeln und Zuckerrüben. 63. Deutsche Pflanzenschutztagung: Pflanzenschutz morgen - Transformation durch Wissenschaft; 26. bis 29. September 2023

Für **2025** sind weitere Publikationen zu den thermischen Behandlungsverfahren und zur anaeroben Bodendesinfektion in internationalen (*peer reviewed*) Fachzeitschriften sowie eine Übersichtsdarstellung zu den Ergebnissen aus GlobRISK in der nationalen Zeitschrift top-agrar vorgesehen.