

Abschlussbericht

Erprobung eines tragbaren Sprühsystems zur Desinfektion von Oberflächen mit ozoniertem Wasser in der gärtnerischen Produktion, „PathOzon“

Ausführende Stelle: Humboldt-Universität zu Berlin
ADTi, Fachgebiet Phytomedizin
Lentzeallee 55/57
14195 Berlin
vertreten durch: Dr. Martina Bandte, Wissenschaftlerin am
Fachgebiet Phytomedizin

Kurzzusammenfassung

Die Eignung von ozoniertem Wassersprühnebel, ausgebracht über eine tragbare mobile Sprüheinheit, zur Dekontamination von potentiell mit Pflanzenkrankheitserregern kontaminierten Oberflächen wurde geprüft. In die Untersuchungen wurden die wirtschaftlich bedeutenden pilzlichen Erreger *Fusarium oxysporum* und *Alternaria altanata*, die bakteriellen Erreger *Pectobacterium carotovora*, *P. periformis*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia pseudosolanacearum*, *R. solanacearum* und *Xanthomonas campestris* sowie die beiden stabilen viralen Erreger Tobacco mosaic virus (TMV) und Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) einbezogen. Die *in vitro* Prüfung zeigte eine sehr gute Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels bei einer Ozonkonzentration von 0,035 bis 0,25 mg/L für alle bakteriellen Krankheitserreger und *F. oxysporum*. *A. alternata* und die beiden viralen Erreger TMV und ToBRFV ließen sich mit einer Ozonkonzentration von 0,5 mg/L nicht inaktivieren.

Die Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels wurde nachfolgend mit einem zuvor entwickelten standardisierten Verfahren mit Hilfe von Prüfträgern aus Rohstahl, Edelstahl, Kunststoff, Holz und Glas ermittelt. Die Anwendung erfordert eine vollständige Benetzung der Oberflächen. Wir konnten zeigen, dass die Abreicherung der Krankheitserreger auf einer physikalischen Entfernung vom Träger beruht und einer Desinfektion der auf dem Träger verbliebenen Erreger. Geprüft wurde auf vermehrungsfähige bzw. infektiöse Erreger sowohl auf der Trägeroberfläche, als auch im Abtropfwasser. Die verschiedenen Bakterienarten konnten in Abhängigkeit vom Trägermaterial alle vollständig oder mit einem sehr hohen Wirkungsgrad abgereichert werden. Dabei war Edelstahl am einfachsten zu desinfizieren, offenes Holz erwartungsgemäß am schwierigsten. Mit den stabilen Pflanzenviren TMV und ToBRFV kontaminierte Träger konnten nicht desinfiziert werden, ebenso wenig solche, die mit dem zu den Ascomyceten gehörende Pilz *A. alternata* kontaminiert waren.

Erklärung

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde eingehalten.

Der Abschlussbericht und der Verwendungsnachweis wurden fristgerecht bereitgestellt.

1. Fachlicher Hintergrund

Pflanzenkrankheitserreger und Schädlinge können zu erheblichen Ertragsverlusten führen. Diese summieren sich - zu geschätzt - jährlichen weltweiten Verlusten von etwa 220 Milliarden US-Dollar (Savary et al., 2019). Zudem können Pflanzenkrankheitserreger zu einer Qualitätsminderung führen, beispielsweise durch die Kontamination mit Mykotoxinen. Diese durch pflanzenpathogene Pilze wie *Fusarium* spp. und *Aspergillus* spp. verursachte Kontamination von Nahrungs- und Futtermitteln führt dosisabhängig zu sowohl zu akuten als auch chronischen Erkrankungen von Menschen und Tieren und beeinträchtigt damit die Lebensmittelsicherheit (Stoev, 2024).

Um hohe Ernteerträge und eine hohe Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten ist ein Schutz der Kulturpflanzen unerlässlich. Aufgabe eines modernen Pflanzenschutzes ist es, Schäden an Nutzpflanzen durch Schaderreger, Unkräuter oder andere Einflussfaktoren zu verhindern oder zu mindern. Dabei sind die allgemeinen Grundsätze des integrierten Pflanzenschutzes (IPS) sind auf Grund der EU -Richtlinie 2009/128/EG verpflichtend einzuhalten. Der IPS bedient sich einer Kombination von Verfahren, bei der unter vorrangiger Berücksichtigung biologischer, biotechnischer, pflanzenzüchterischer sowie anbau- und kulturtechnischer Maßnahmen die Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel auf das notwendige Maß beschränkt wird (Anonymous, 2012). Eine große Bedeutung kommt in diesem Kontext der Betriebshygiene zu. Damit können Übertragungswege unterbunden werden und Erkrankungen durch den jeweiligen Erreger auf der Fläche, Nachbarfläche oder auch in Folgekulturen minimiert werden. In der gärtnerischen Praxis finden zur Reinigung und Desinfektion von Oberflächen auf Benzoesäure, Wasserstoffperoxid und Chlor basierende Präparate Anwendung. Diese Substanzen bzw. Substanzgemische zählen zu den Gefahrstoffen und müssen entsprechend der Sicherheitsbestimmungen transportiert, angewendet und gelagert werden. Im letzten Jahr wurde ein innovatives Reinigungs- und Desinfektionskonzept für bereifte Fahrzeuge und Maschinen zur Kontrolle des sehr stabilen Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) vorgestellt (Bandte et al., 2024). Die ProfilGate Sauberlaufzone in Kombination mit dem Desinfektionsmittel MENNO Florades erzielte eine sehr hohe Abreicherung (90-99%) sowohl für eine hohe, mittlere als auch niedrige Viruskonzentration an den getesteten Reifenmaterialien aus Gummi, Polyamid und Polyurethan.

Ozon, ein aus drei Sauerstoffatomen bestehendes Gas welches natürlicherweise in der Atmosphäre vorkommt, ist ein sehr reaktives und instabiles Molekül (Lim et al., 2022). Ozoniertes Wasser wird seit langem zum Abbau von organischen Mikroschadstoffen und Verunreinigungen in Abwasser bzw. in Wasserwerken eingesetzt. Die dazu notwendige sehr hohe Ozonkonzentration von 5 bis 10 mg/L wird durch das Begasen des Wassers mit gasförmigem Ozon erzeugt. In der Lebensmittelindustrie wird Ozon beispielsweise zur Oberflächendesinfektion, Hygienisierung von Betriebsanlagen, Aufbereitung von Prozesswasser, Desinfektion

von Geflügelschlachtkörpern und zur Verbesserung der Haltbarkeit von Obst und Gemüse verwendet (Ibanoglu, 2023).

Mikroorganismen sind empfindlich gegenüber Ozon (Patil und Bourke, 2012): gramnegative empfindlicher als grampositive Bakterien, und diese empfindlicher als Hefen und Schimmelpilze. Viren wird eine den Bakterien vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber Ozon zugeschrieben (Khadre et al., 2001). Die Inaktivierung von Mikroorganismen durch Ozon wird als komplexer Prozess verstanden. Dabei ist Ozon in der Lage, verschiedene Bestandteile in Zellmembranen, Zellwänden, dem Zytoplasma, Endosporen- und Viruskapsiden sowie -hüllen anzugreifen (Patil and Bourke, 2012). In der Literatur gibt es allerdings nur wenige Informationen über die zu Grunde liegenden Inaktivierungsmechanismen (von Sonntag und von Gunten, 2012).

2. Aufgabenstellung/Zielsetzung

Das Vorhaben adressiert das mikrobiologische Risiko der Verbreitung von pflanzenschädigenden Pilzen, Bakterien und Viren bei der Produktion und Verarbeitung von Gemüse einschließlich Kartoffeln. Diese Schadorganismen können auf Grund ihrer hohen Stabilität, nicht verfügbarer kurativer Pflanzenschutzmaßnahmen und/oder ihres hohen Vermehrungspotentials zu hohen ökonomischen Verlusten führen. Reinigung und Desinfektion sind empfohlene und angezeigte Maßnahmen zum Abtöten der Schadorganismen, zur Unterbrechung der Übertragungswege und Minimierung der Verbreitung der jeweiligen Erkrankungen. In der gärtnerischen Praxis werden zur Reinigung und Desinfektion von Oberflächen wie beispielsweise Transportkisten, Förderbänder, Werkzeugen, Tischen, Folien und Glasflächen Desinfektionsmittel verwendet. Derzeitig kommen das auf Benzoesäure basierende Desinfektionsmittel Menno Florades sowie auf Wasserstoffperoxid und Chlor basierende Präparate zum Einsatz. Diese Substanzen bzw. Substanzgemische zählen zu den Gefahrstoffen und müssen entsprechend der Sicherheitsbestimmungen transportiert, angewendet und gelagert werden.

Zur Produktion des ozonierten Wassersprühnebels, der mittels der mobilen Sprüheinheit hergestellt wird, werden weder Gefahrstoffe benötigt, noch entstehen Gefahrstoffe vor Ort oder gesundheits- oder umweltschädliche Nebenprodukte.

Welche pflanzenschädigenden Erreger besonders gut oder auch schlecht auf die Behandlung mit ozoniertem Wasser reagieren ist bisher nicht publiziert. Daher haben wir zunächst die Desinfektionswirkungen von elektrolytisch ozoniertem Wassersprühnebel auf verschiedene ökonomisch bedeutende Pflanzenkrankheitserreger aus der Gruppe der Bakterien, Pilze und Viren ermittelt. Nachfolgend war zu prüfen, ob dieses Verfahren für die Desinfektion von Oberflächen in der gärtnerischen Praxis eingesetzt werden kann.

Die mobile Sprüheinheit, entwickelt vom Fraunhofer IST, steht als Prototyp (Technologiereifegrad (TRL) 6) bereit und wurde für die Projektlaufzeit angemietet.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

In die Untersuchungen wurden unterschiedlichste pilzliche, bakterielle und virale Pflanzenkrankheitserreger aus der Sammlung des Leibniz-Instituts Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig), Julius Kühn-Instituts (JKI) und des Fachgebiets Phytomedizin der Humboldt-Universität zu Berlin einbezogen (Tab. 1). Dabei zählen *Ralstonia pseudosolanacearum* und *R. solanacearum* zu den Unionsquarantäneschadorganismen; mit Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2019/2072 wird Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV, Tobamovirus fructirugosum) seit 1. Januar 2025 nicht mehr als Quarantäneorganismus eingestuft, sondern als ein Unionsgeregelter Nicht-Quarantäneschadorganismus (RNQP).

Tab. 1: Übersicht der in die Prüfung der Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel gegen Pflanzenkrankheitserreger verwendeten Organismen und der zum Nachweis der Vermehrungsfähigkeit verwendeten Medien bzw. Wirtspflanzen

Gruppe	Erreger		Nachweis Vermehrungsfähigkeit
	Art	Spezifikation	
Bakterien	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	AGQB#103 AGQB#121 (JKI)	YPGA-Medium ¹
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	AGQB#26 (JKI)	YPGA-Medium ¹
	<i>Xanthomonas campestris</i>	DSM 3586 (DSMZ)	Medium 1 ²
	<i>Pectobacterium carotovora</i>	DSM 30169 (DSMZ)	Medium 1 ²
	<i>Pectobacterium periformis</i>	Pecpe1 (FG Phytomedizin)	Medium 1 ²
	<i>Pseudomonas syringae</i>	PseuoSy-NS-K (FG Phytomedizin)	LB-Medium ³
Pilze	<i>Alternaria alternata</i>	Altalt-08 (FG Phytomedizin)	SNA-Medium ⁴
	<i>Fusarium oxysporum</i> subsp. <i>lycopersicum</i>	DSM-62059 (DSMZ)	SNA-Medium ⁴
Viren	Tobacco mosaic virus (TMV)	PV-1701 (DSMZ)	<i>Nicotiana tabaccum</i> var. Xanthi NN
	Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)	ToBRFV-Nc, ToBRFV-Nt (FG Phytomedizin)	<i>Nicotiana tabaccum</i> var. Xanthi NN

¹ Hefeextrakt 7,0 g/l, Bactopepton 7,0 g/l, Glucose 7,0 g/l und Agar 15,0 g/l, pH 7,3.

² Pepton 5,0 g/l, Fleischextrakt 3,0 g/l und Agar 15g/l, pH 7,0.

³ Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, Natriumchlorid 10 g/l und Agar 15 g/l, pH 7,0

⁴ Glukose 0,2 g/l, Saccharose 0,2 g/l, Kaliumdihydrogenphosphat 1 g/l, Kaliumnitrat 1 g/l, Magnesiumsulfat 0,5 g/l, Kaliumchlorid 0,5 g/l und Agar 15g/l, pH 5,5.

Mobile Sprüheinheit

Der verwendete Prototyp der mobilen Sprüheinheit (Abb. 1) basiert auf einer kommerziell verfügbaren Rückenspritze (REB 15, Fa. Birchmeier, Stetten, Schweiz). Diese wurde vom Fraunhofer-Institut für Schicht- und Oberflächentechnik (IST) umgebaut. Sie wurde dabei mit zwei Bor-dotierten Diamant-Elektroden in der Spritzlanze einschließlic eines dazugehörigen Gehäuses versehen; zur Gewährleistung einer konstanten Stromzufuhr mit gleichbleibender Spannung wurde die Stromversorgung modifiziert.

Die Spritzlanze wurde wahlweise mit einer Fein-Hohlkegeldüse (Birchmeier Fein Hohlkegeldüse NF 125) oder einer Ultra-Fein-Hohlkegeldüse verwendet (Abb. 1). Die beiden Düsen unterscheiden sich hinsichtlich des Durchflusses, der Tropfengröße und der maximal produzierten Ozonkonzentration (Tab. 2).

Tab. 2: Kennwerte der beiden verwendeten Düsen: Fein-Hohlkegeldüse („Fein Hohlkegeldüse NF 125“, Fa. Birchmeier, Stetten, Schweiz) und Ultra-Fein-Hohlkegeldüse (äquivalent zur „Duro-Nebeldüse 0.8 mm, G1/4“, Fa. Birchmeier, Stetten, Schweiz)

Kennwerte	Fein-Hohlkegeldüse	Ultra-Fein-Hohlkegeldüse
Durchfluss bei 3 bar	120 ml/min	36 ml/min
Maximale O ₃ -Konzentration	~0,4 ppm	~0,7 ppm
Tropfengröße	Ca. 60 Mikrometer	Ca. 20 Mikrometer

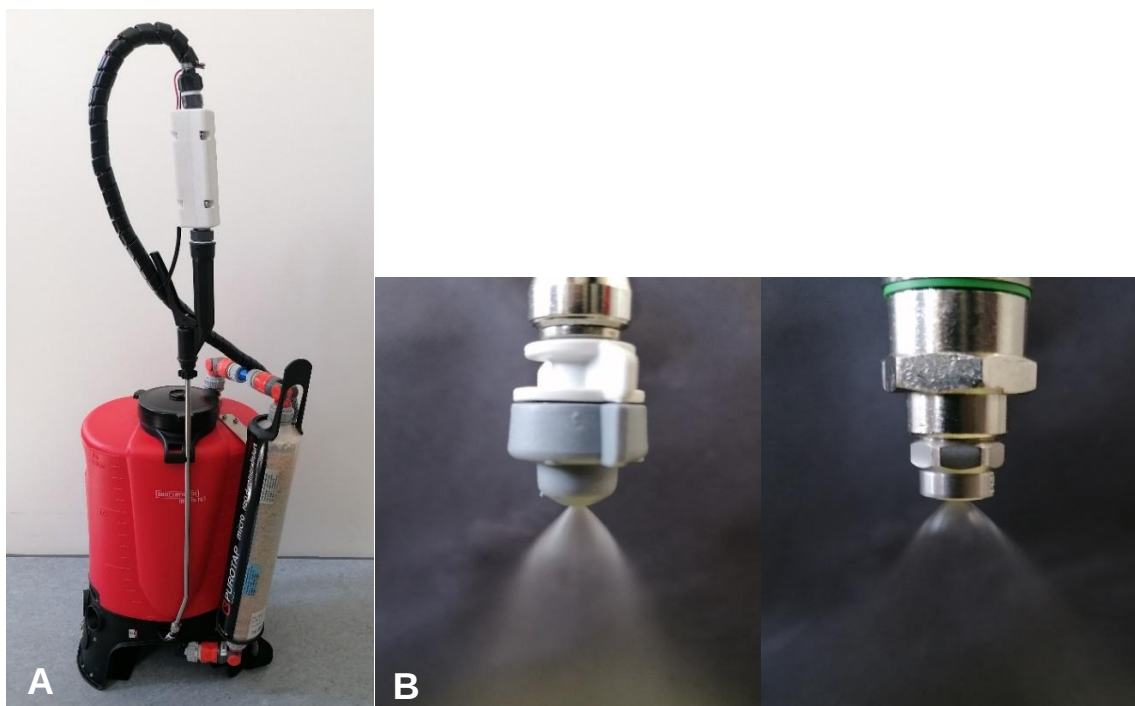


Abb. 2: Mobile Sprüheinheit zur Applikation von ozoniertem Wassersprühnebel (A) und Darstellung der Sprühkegel (B) der Fein-Hohlkegeldüse (links) und der Ultra-Fein-Hohlkegeldüse (rechts), jeweils bei einem Druck von drei bar

Die Ermittlung der Ozonkonzentration im Wassersprühnebel erfolgte mithilfe eines Ozon-Test-Sets (118758, Merck KGaA, Darmstadt), welches auf dem N, N Diethyl-1,4 Phenylenediamin Sulfat (DPD)-Verfahren beruht, nach Herstellerangaben. Im ozonierten Wassersprühnebel wurden Ozonkonzentrationen von 0,35 bis 0,6 mg/L erzielt.

Prüfträger und Prüffelder

Als Prüfträger wurden in der gärtnerischen Produktion praxisübliche Gegenstände aus den Werkstoffen Polystyrol, Polypropylen, Edelstahl und Holz verwendet. Auf diese Gegenstände, Edelstahlplatten, Pikierkisten aus Polypropylen, Unterschalen für Anzuchtplatten aus Polystyrol und unbehandelte Kanthölzer aus Nadelholz, wurden Kunststoffrahmen aus Plastikklemmbausteinen aufgeklebt (Abb. 3-4). Die durch diese Rahmen begrenzten Prüffelder haben eine Fläche von 6,0025 cm².

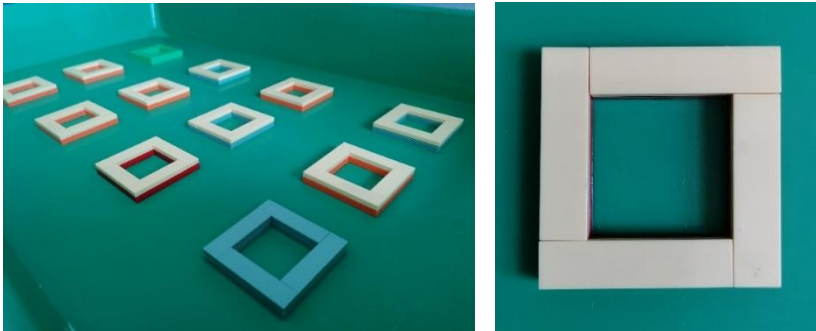


Abb. 3: Prüfträger aus Polypropylen
links: Pikierkiste aus Polypropylen mit 12 Prüffeldern
rechts: Prüffeld, begrenzt durch Kunststoffrahmen aus Klemmbausteinen

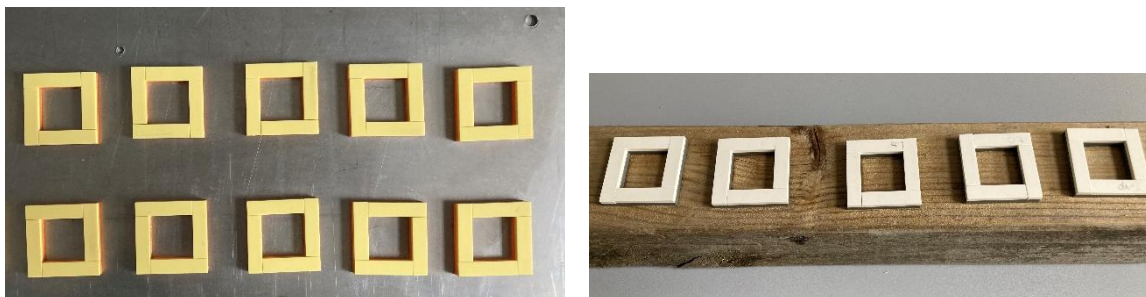


Abb. 4: Gegenstände aus dem gärtnerischen Umfeld als Prüfträger mit Prüffeldern
links: Prüfträger aus Edelstahl (Edelstahlblech) mit 10 Prüffeldern
rechts: Prüfträger aus Holz (Kantholz) mit 5 Prüffeldern

Darüber hinaus wurden verschiedenste Prüfträger aus Holz, Kunststoff, und Metall (Rohstahl, Edelstahl) verwendet, die bedingt durch Ihre Konstruktion direkt in eine Petrischale mit Nährmedium abgeklatscht werden konnten (Abb. 5).

Für den Behandlungserfolg ist eine gleichmäßige, möglichst vollständige Benetzung erforderlich, um den Kontakt zwischen dem Wirkstoff Ozon und dem Krankheitserreger zu gewährleisten. Eine niedrige Oberflächenspannung führt dazu, dass Flüssigkeiten auf der Materialoberfläche abperlen, anstatt sich gleichmäßig zu verteilen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur weisen viele Kunststoffe eine niedrige Oberflächenenergie

auf, was die Benetzbarkeit und somit die Haftung erschwert. So weist beispielsweise Polytetrafluorethylen (PTFE) eine sehr niedrige Oberflächenspannung von unter 20 mN/m auf, während die im Gartenbau gebräuchlichen Materialien Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP) Werte zwischen 29 und 32 mN/m, Polyurethan (PUR) sogar 43-47 mN/m aufweisen. Edelstahl und Glas haben mit 43 und 47 mN/m deutlich höhere Werte als die meisten Kunststoffe, was ihre bessere Benetzbarkeit erklärt.

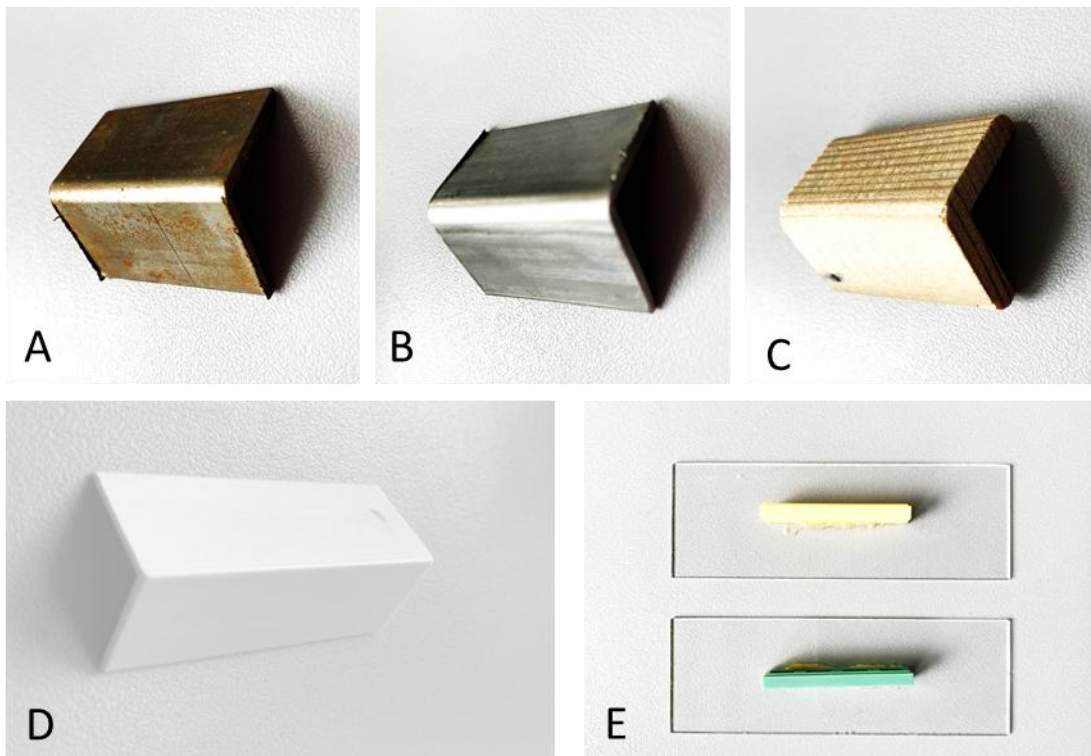


Abb. 5: Prüfträger aus Rohstahl (A), Edelstahl (B), Holz (C), Kunststoff (D) und Glas (E)

Prüfverfahren – Wirksamkeit zur Dekontamination von Oberflächen:

Die Etablierung wurde des Prüfverfahrens am Beispiel des pflanzenschädigenden Bakteriums *Pseudomonas syringae* vorgenommen. Aus einer Vielzahl von Experimenten wurde zunächst - unter Verwendung von Prüfträgern mit Prüffeldern (Abb. 3-4) - ein standardisierter Ablauf für ein Prüfverfahren erarbeitet (Abb. 6).

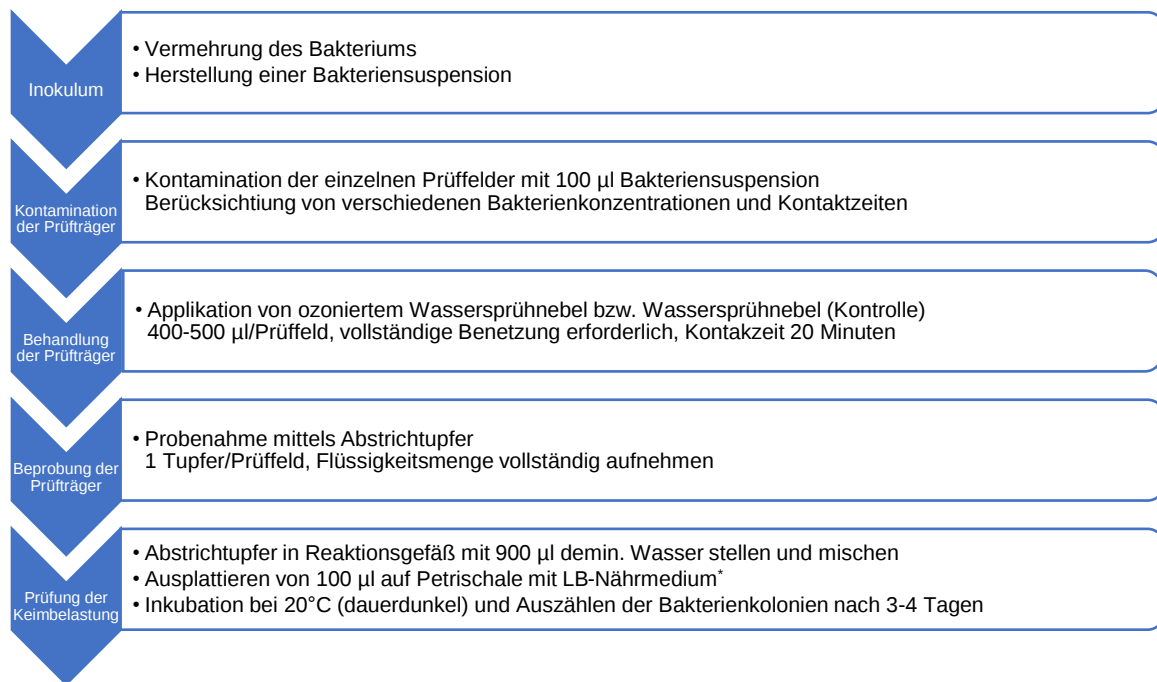


Abb. 6: Arbeitsschritte des standardisierten Verfahrens zur Prüfung der Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel auf das Abtöten von Phytopathogenen auf Prüfträgern unter Verwendung der mobilen Sprüheinheit mit der Fein Hohlkegeldüse NF 125 am Beispiel des bakteriellen Erregers *Pseudomonas syringae*.

* LB-Medium: Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, Natriumchlorid 10 g/l und Agar 15 g/l, pH 7,0

Dieses Prüfverfahren wurde im Verlauf des Vorhabens modifiziert (Abb. 7). Mit der Verwendung von L-förmigen Prüfträgern (Abb. 5) konnten diese nach der Behandlung direkt auf das Nährmedium abgeklatscht werden; damit entfällt die Probenahme mittels Abstrichtupfern sowie deren Prozessierung. Des Weiteren ist damit zu zeigen, ob die Erreger durch die Behandlung abgetötet, oder womöglich nur physikalisch von der Trägersoberfläche abgeschwemmt (entfernt) werden und vermehrungsfähig im Abschwemm-/tropfwasser verbleiben.

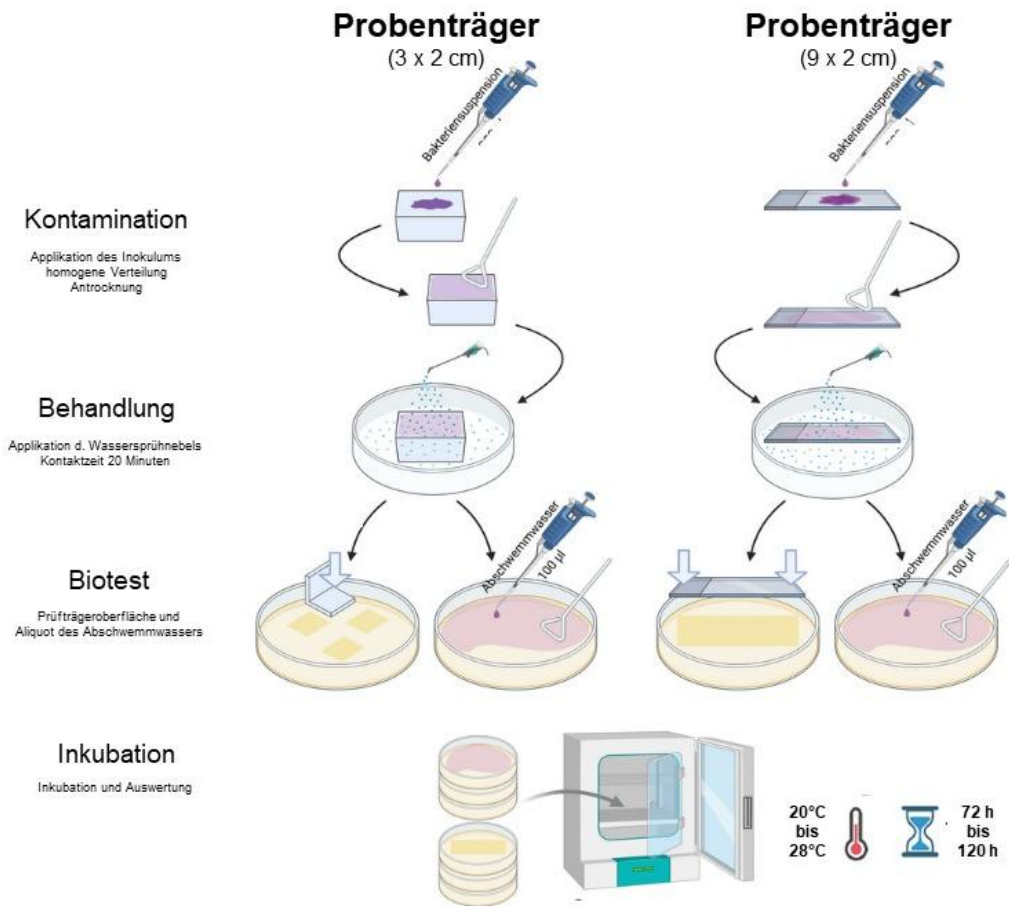


Abb. 7: Schematische Darstellung des modifizierten Verfahrens zur Prüfung der Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel auf das Abtöten von Phytopathogenen auf Prüfträgern unter Verwendung der mobilen Sprüheinheit mit der Ultra-Fein-Hohlkegeldüse. Der Biotest zur Ermittlung der vermehrungs-fähigen Erregereinheiten wurde sowohl mit der Prüfträgeroberfläche als auch mit einem Aliquot des Abschwemmwassers vorgenommen.

4. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

4.1 Erarbeitung eines standardisierten Prüfverfahrens am Beispiel von *P. syringae*

Unter Anwendung der in Abb. 6 skizzierten Arbeitsschritte ließen sich sowohl die mit *P. syringae* kontaminierten Prüfträger aus Polypropylen als auch diejenigen aus Edelstahl durch den ozonierten Wassersprühnebel fast vollständig dekontaminieren, nicht jedoch die offenporigen Prüfträger aus Holz (Abb. 8, 9). Die Kontamination der Prüfträger wurde mit 2×10^3 bzw. 4×10^4 Bakterienzellen vorgenommen. Die scheinbar hohe Anzahl von Zellen ist vor dem Hintergrund der versuchstechnisch bedingten „Verluste“ beispielsweise durch Adsorption der Bakterien nicht besonders hoch. So verbleiben etwa 40% der Bakterienzellen in dem Abstrichtupfer. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die mittels Zählkammer ermittelte Anzahl der Zellen keine Aussage über deren Vermehrungsfähigkeit zulässt. Die Bewertung der Wirksamkeit der Behandlung, der über einen Biotest (Ausplattierung) erfolgt, erfordert aber zwingend die Vermehrungsfähigkeit der jeweiligen Organismen.

Da die Abstrichproben der Prüfträger aus Holz in der Kontrolle als auch der Behandlung neben *P. syringae* viele Fremdkeime aufwies, wurde das Holz vor dem folgenden Versuch sehr gründlich mit einem Flächendesinfektionsmittel behandelt. Dieses führte vermutlich dazu, dass auch in der Kontrollbehandlung keine bzw. kaum Bakterienkolonien auf den Nährmedien wuchsen (Abb. 9).

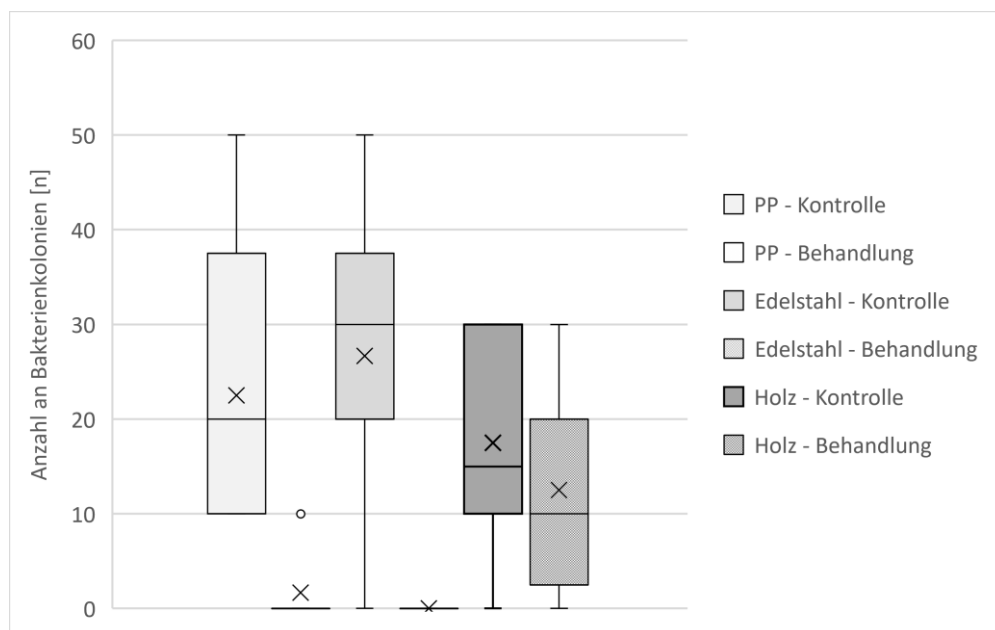


Abb. 8: Abtötung von *P. syringae* auf Polypropylen (PP)-, Edelstahl- und Holz-Prüffeldern (2×10^3 Bakterien/Prüffeld) nach Applikation von 400-500 µl ozonisiertem Wassersprühnebel (0,35 mg/L Ozon) (Behandlung) und demin. Wassersprühnebel (Kontrolle), ermittelt über die mit Abstrichproben nach einer Kontaktzeit von 20 Minuten festgestellten Anzahl von vermehrungsfähigen Bakterienzellen. Das Inokulum ist 16 Stunden auf den Prüffeldern angetrocknet. Ausplattiert wurden – nach der Behandlung - 100 µl der 1000 µl, in denen der jeweilige Abstrichtupfer suspendiert wurde. Die Bakterienkolonien wurden nach 3 Tagen gezählt. Alle Werte wurden um den Faktor zehn multipliziert, um die Darstellung zu vereinfachen. N: 72

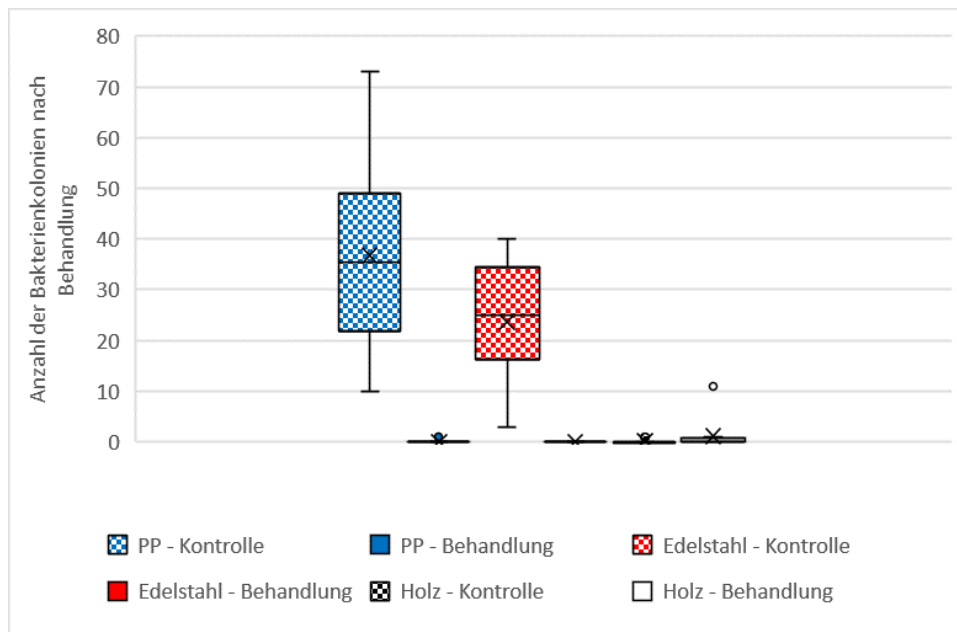


Abb. 9: Abtötung von *P. syringae* (4×10^4 Bakterienzellen/Prüffeld) auf Polypropylen (PP)-, Edelstahl- und Holz-Prüffeldern nach Applikation von 400-500 μ l ozonisiertem Wassersprühnebel (0,35 mg/ml) (Behandlung) und demin. Wassersprühnebel (Kontrolle), ermittelt über die mit Abstrichproben nach einer Kontaktzeit von 20 Minuten festgestellten Anzahl von vermehrungsfähigen Bakterienzellen. Das Inokulum ist 16 Stunden auf den Prüffeldern angetrocknet. Ausplattiert wurde 100 μ l der 1000 μ l, in denen die jeweiligen Abstrichtupfer suspendiert wurde. Die Bakterienkolonien wurden nach 3 Tagen gezählt. N: 72

Auffällig ist, dass die Anzahl der auf den Petrischalen nach Ausplattieren von Aliquoten des Eluats der Abstrichtupfer auszählbaren Bakterienkolonien der Kontrollprüfträger sich materialabhängig stark unterschied. Die Ergebnisse zum Abtöten von *P. syringae* ließen sich auch unter Verwendung von 4×10^6 und 4×10^5 *P. syringae* Zellen zur Kontamination der Prüffelder bestätigen (Abb. 10). Auf Polypropylen und Edelstahl können die Bakterien inaktiviert werden, nicht jedoch auf Holz.

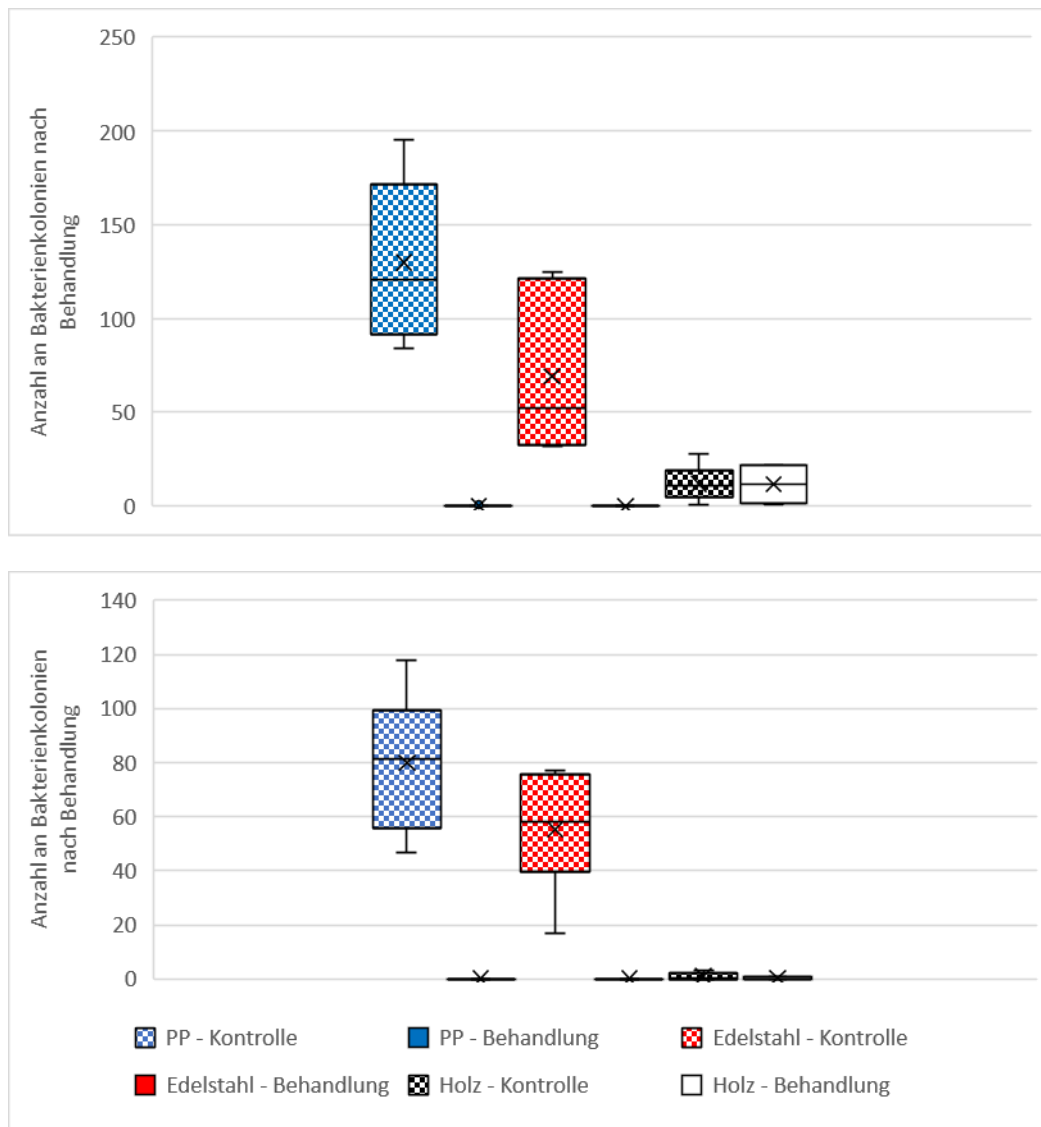


Abb. 10: Anzahl der Bakterienkolonien nach Behandlung von mit 4×10^6 (oben) und 4×10^5 (unten) *P. syringae* Zellen/Prüffeld kontaminierten Prüfträgern mit ozonisiertem Wassersprühnebel. Die Abtötung von *P. syringae* auf den Prüfträgern wurde geprüft nach Applikation von 400-500 µl ozonisiertem Wassersprühnebel (0,35 mg/ml) (Behandlung) und demin. Wassersprühnebel (Kontrolle) und ermittelt über die mit Abstrichproben nach einer Kontaktzeit von 20 Minuten festgestellten Anzahl von vermehrungsfähigen Bakterienzellen, in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration im zur Kontamination der Prüffelder verwendeten Inokulum und dem Prüfmaterials des jeweiligen Prüffeldes. Das Inokulum ist vor der Behandlung 16 Stunden auf den Prüffeldern angetrocknet. Ausplattiert wurde 100 µl der 1000 µl, in denen die jeweiligen Abstrichtupfer suspendiert wurden. Die Bakterienkolonien wurden nach 3 Tagen gezählt. N=72

4.2 Viruzide Wirksamkeit

Die viruzide Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels wurde unter Verwendung einer Ozonkonzentration von 0,5 mg/L sowohl *in vitro* als auch auf Oberflächen aus Edelstahl geprüft. Bei der *in vitro* Testung wurde dazu ein Homogenat einer mit dem TMV bzw. ToBRFV-infizierten Pflanze hergestellt, 1:10 (v:v) mit dem ozonierten Wassersprühnebel gemischt und nach einer Kontaktzeit von 20 Minuten auf Blätter der

sensitiven Indikatorpflanze *N. tabacum* var. Xanthi NN inokuliert. Bei der Verwendung von Prüfträgern aus Edelstahl wurde diese zunächst mit dem Pflanzenhomogenat einer virusinfizierten Pflanze kontaminiert, mit ozoniertem Wassersprühnebel behandelt und dann direkt mechanisch auf die Indikatorpflanzen inokuliert.

Eine viruzide Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels konnte *in vitro* Testung weder gegen TMV noch gegen den geregelten Schadorganismus TBRFV dargestellt werden. Die Versuche wurden mit n=16 bzw. n=12 durchgeführt und einmal wiederholt. Auch eine zweimalige Behandlung des Pflanzenhomogenats mit dem ozonierten Wassersprühnebel führte, wie am Beispiel des ToBRFV gezeigt, nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen der Kontrolle und den Behandlungen (Abb. 11). Wie zu erwarten zeigten sich an den physiologisch älteren Blättern der Indikatorpflanzen signifikant mehr nekrotische Lokalläsionen als an den jüngeren.

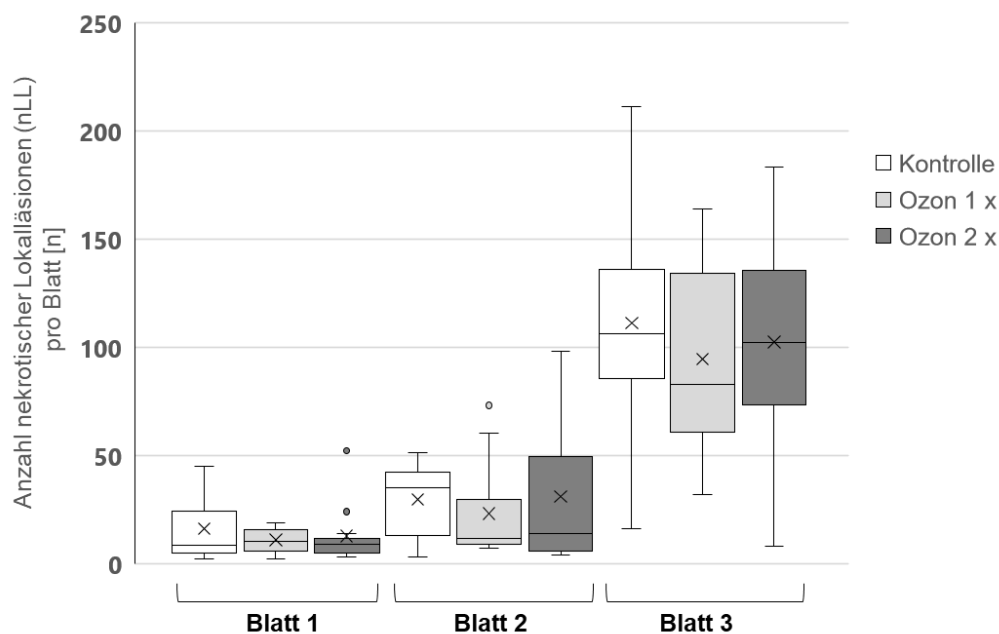


Abb. 11: Anzahl nekrotischer Lokalläsionen (nLL) auf der Indikatorpflanze *N. tabacum* var. Xanthi NN nach mechanischer Inokulation eines Pflanzenhomogenates einer Tomato brown rugose fruit virus-infizierten Pflanze in Abhängigkeit von der Behandlung dieses Homogenates mit ozoniertem Wassersprühnebel (1:10, v:v) mit einer Ozonkonzentration von 0,5 mg/L. Die Behandlung wurde dabei einmal (Ozon 1x) oder zweimal (Ozon 2 x) vorgenommen. Von jeder Probe wurden drei Aliquote auf eine Indikatorpflanze inokuliert, auf das jüngste voll ausdifferenzierte Blatt (Blatt 1) und die folgenden beiden Älteren (Blatt 2 und Blatt 3). n=12

Diese im Rahmen der *in vitro* Testung erzielten Ergebnisse bestätigten sich bei der Verwendung von Prüfträgern. Bei diesem Versuchsdesign wurden Edelstahlträger mit dem Homogenat einer TMV-infizierten Tabakpflanze kontaminiert und nach einer über Nacht Inkubation bei Raumtemperatur mit ozoniertem Wassersprühnebel behandelt (Abb. 12). Diese Edelstahlträger wurden dann 20 Minuten nach der Behandlung auf jeweils drei Blätter einer sensitiven Indikatorpflanze inokuliert. Die Anzahl der nekrotischen Lokalläsionen an den Indikatorpflanzen divergierte nicht signifikant zwischen den Kontrollen und der Behandlung (Abb. 13).



Abb. 12: Prüfträger aus Edelstahl, kontaminiert mit einem TMV-infizierten Pflanzenhomogenat

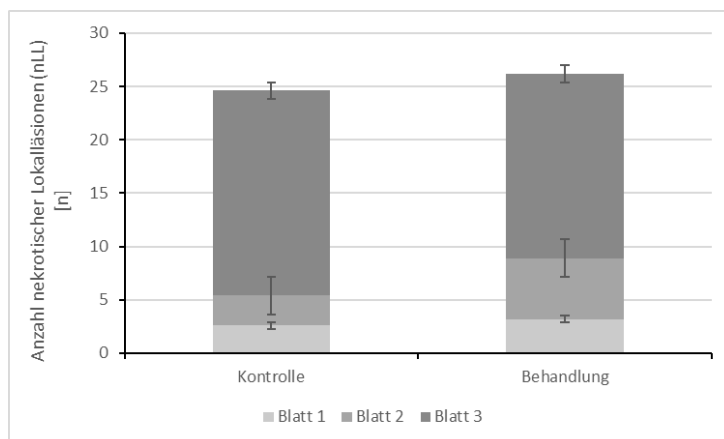


Abb. 13: Mittelwert der Anzahl nekrotischer Lokalläsionen (nLL) auf der Indikatorpflanze *N. tabacum* var. Xanthi NN nach mechanischer Inokulation eines mit Tobacco mosaic virus kontaminierten Edelstahlträgers in Abhängigkeit von der Behandlung mit ozoniertem Wassersprühnebel mit einer Ozonkonzentration von 0,5 mg/L. Der Sprühnebel wurde dabei oberflächenbedeckend ausgebracht. Jeder Träger wurde auf drei Blätter einer Indikatorpflanze inokuliert, auf das jüngste voll ausdifferenzierte Blatt (Blatt 1) und die folgenden beiden älteren (Blatt 2 und Blatt 3). n=8

4.3 Bakterizide Wirksamkeit

Die bakterizide Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels wurde zunächst *in vitro* gegen *Pectobacterium* spp., *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* und *Xanthomonas campestris* geprüft. Dazu wurde die jeweilige Bakteriensuspension 1:1 (v:v) und 1:9 (v:v) mit ozoniertem Wassersprühnebel mit einer Ozonkonzentration von 0,35 mg/L und/oder 0,5 mg/L gemischt und nach einer Verweilzeit von 20 Minuten ausplattiert.

Die in die Prüfung einbezogenen pflanzenschädigenden Bakterien konnten in der *in vitro* Testung alle vollständig oder nahezu vollständig durch den ozonierten Wassersprühnebel abgetötet werden. In den Abbildungen 14 und 15 ist beispielhaft das Ergebnis für *Ralstonia* spp. dargestellt. Bereits bei einer Ozonkonzentration von 0,05 mg/L wurden diese Bakterien vollständig abgetötet.

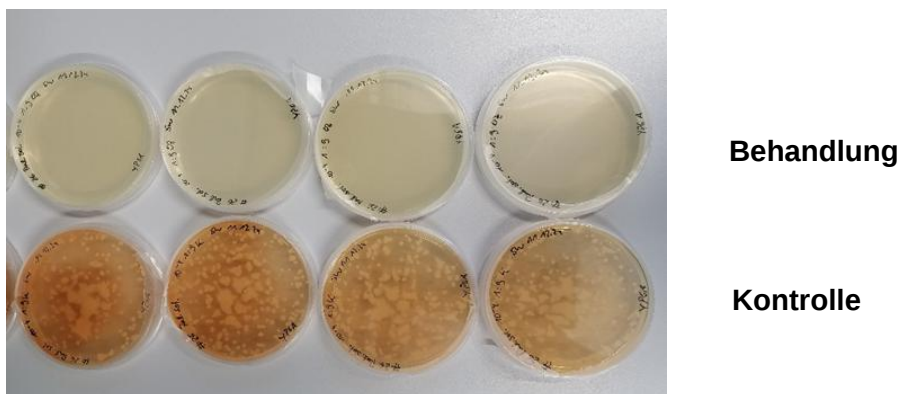


Abb. 14: Petrischalen mit YPGA-Medium nach Ausplattierung einer *R. solanacearum* (AGQB#26) Suspension in Abhängigkeit von deren Behandlung mit ozoniertem Wassersprühnebel. Die Ausplattierung erfolgte 20 Minuten nach der Zugabe. Oben: Behandlung mit ozoniertem Wassersprühnebel (0,05 mg/L Ozon), Unten: Kontrolle, Behandlung mit Wassersprühnebel

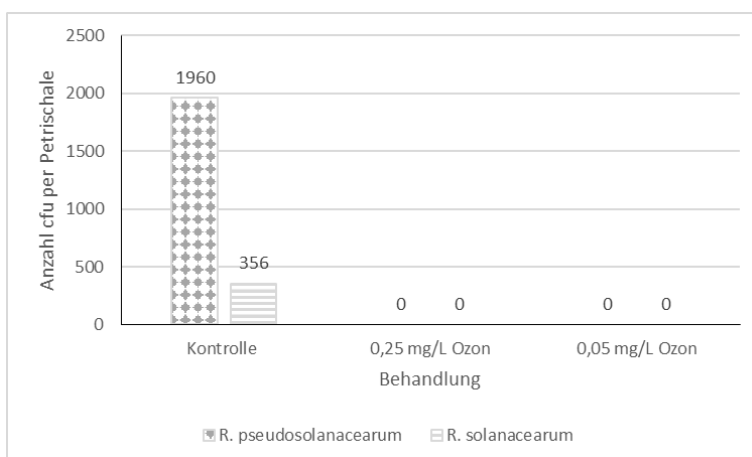


Abb. 15: Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel *in vitro* in Abhängigkeit von der Bakterienart (*R. solanacearum*, AGQB#26 bzw. *R. pseudosolanacearum*, AGQB#103) und der Ozonkonzentration. Dargestellt ist der Mittelwert der colony forming units (cfu) per Petrischale. n: 5

Die Behandlung von *R. pseudosolanacearum* kontaminierten Oberflächen aus Edelstahl und Kunststoff mit ozoniertem Wassersprühnebel führte zu einer fast vollständigen Hygienisierung (Abb. 16). Auffällig ist die relativ geringe Anzahl der koloniebildenden Einheiten in den nur mit Wassersprühnebel behandelten Kontrollen bezogen auf die Anzahl der zur Kontamination verwendeten Bakterien. Für Quarantäneorganismen wie *R. pseudosolanacearum* gelten hohen Anforderungen an eine Hygienisierung. Daher stellt sich die Frage nach einem gegebenenfalls möglichen Verbleib von vermehrungsfähigen Bakterienzellen. Werden die Bakterien nur physikalisch von den Oberflächen abgespült und sind damit auf den mittels Abklatschprobe geprüften Keimträgern nicht mehr vorhanden, verbleiben aber vermehrungsfähig im Abtropfwasser? Das Versuchsdesign wurde dahingehend so modifiziert, dass sowohl die Prüfträger als auch das ablaufende Behandlungswasser auf vermehrungsfähige Zellen des jeweiligen bakteriellen Krankheitserregers untersucht wurden (Abb. 7).

Für alle untersuchten Bakterienarten (Tab. 1) konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Wassersprühnebel zu einer physikalische Abreicherung von Bakterien von den Oberflächen der Prüfträger führt. In dem Abschwemmwasser der Kontroll-Prüfträger wurde im Vergleich zur Oberfläche des Kontroll-Prüfträgers jeweils ein Vielfaches an Bakterien nachgewiesen (Abb. 17). So waren hinsichtlich *R. solanacearum* direkt an den Kontroll-Prüfträgern aus Edelstahl bzw. Kunststoff im Mittel 376 bzw. 202 Bakterienzellen nachzuweisen, im korrespondierenden Abschwemmwasser im Mittel 2102 bzw. 2285 Bakterienzellen. Die Behandlung mit ozoniertem Wassersprühnebel führte zu einer fast vollständigen Hygienisierung der Prüfträger und des Abschwemmwassers. An insgesamt drei Edelstahl-Prüfträgern und in Abschwemmwasser eines dieser Prüfträger konnte nach der Behandlung jeweils eine Bakterienzelle nachgewiesen werden; bei Kunststoffprüfträgern war das Abschwemmwasser aller Prüfträger frei von Bakterien, während an vier Prüfträger Bakterien überlebten – an zwei Trägern jeweils eine, und an zwei weiteren zwei bzw. 79 vermehrungsfähige Bakterienzellen. Diese antibakterielle Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels ließ sich sowohl bei hoher als auch niedriger Bakterienlast auf den Prüfträger zeigen (Abb. 18). Eine vollständige Abtötung der Bakterien auf den Prüfträgern und im Abschwemmwasser konnte nur bei niedriger Bakterienlast gezeigt werden. Bei hoher Bakterienlast hingegen verblieben nach der Behandlung im Abschwemmwasser eines Edelstahlprüfträgers wenige Bakterien. Bei den Kunststoffträger zeigte sich nur eine deutliche Reduktion der Bakterienlast auf den Prüfträgern, wie auch im Abschwemmwasser.

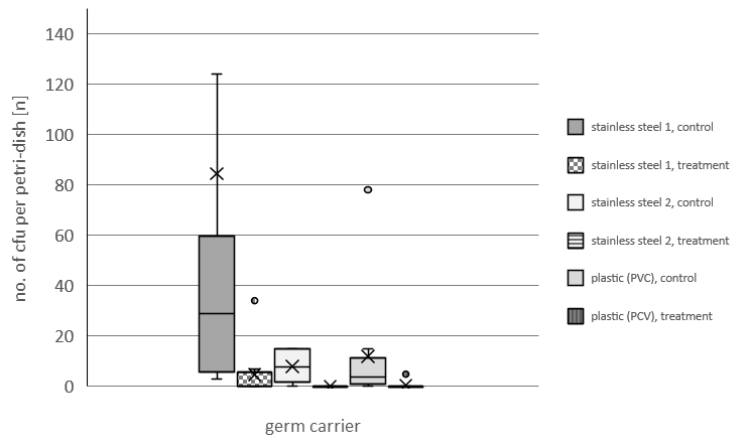


Abb. 16: Abtötung von *Ralstonia pseudosolanacearum* auf Oberflächen nach Behandlung der Keimträger mit ozoniertem Wassersprühnebel (0,5 mg/L). Dargestellt sind die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Petrischale. Zur Kontamination wurden $4,6 \times 10^5$ Zellen/Träger verwendet und mit 400-500 μ l ozoniertem Wassersprühnebel bzw. Wassersprühnebel (Kontrolle) behandelt. Die Keimträger wurden nach einer Kontaktzeit von 20 Minuten dreimal in eine Petrischale abgeklatscht, vom Abtropfwasser wurden 100 μ l ausplattiert. Die Bakterienkolonien wurden nach 3 Tagen gezählt. N=50 {stainless steel (n=10), stainless steel 2 (n=5) und plastic (PVC) (n=10)}

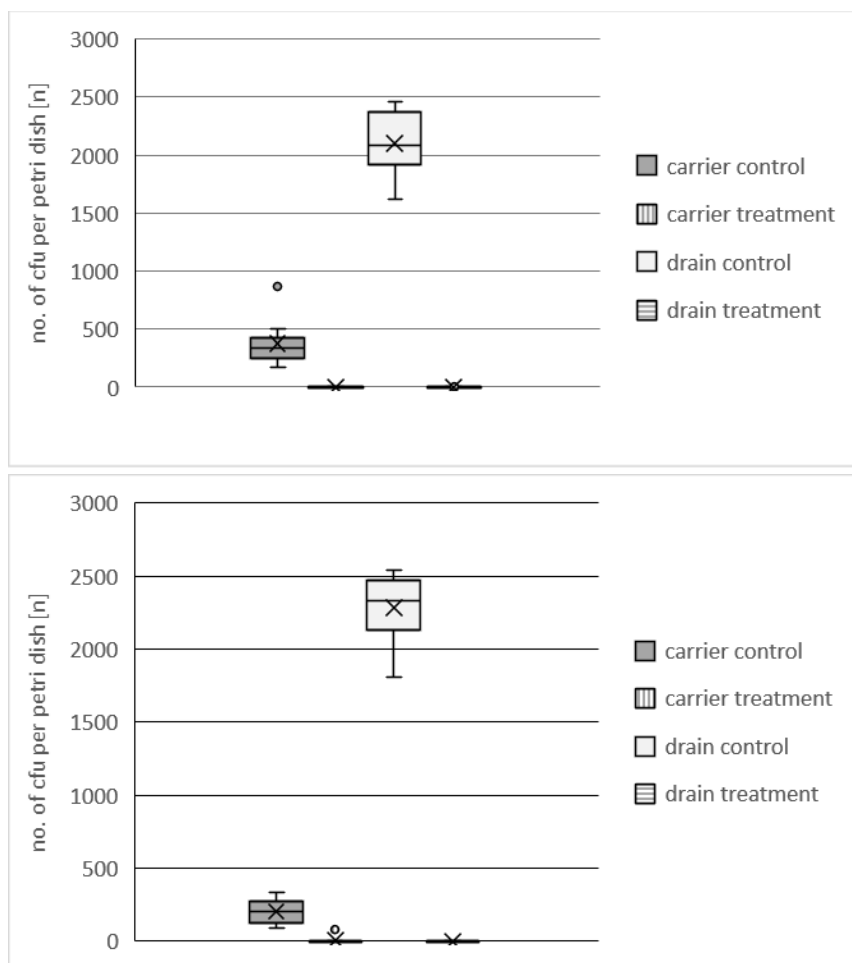


Abb. 17: Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel (0,5 mg/L Ozon) zur Dekontamination von *R. solanacearum* Proben-trägern aus Edelstahl (oben) und Kunststoff (unten). Zur Kontamination wurden $4,4 \times 10^7$ Zellen/Träger verwendet. Die Proben-träger (carrier) wurden nach der Behandlung dreimal in eine Petrischale mit Nährmedium abgeklatscht und zudem 100 μ l des Abschmammwassers (drain) ausplattiert. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der colony forming units (cfu) je Petrischale. n=10

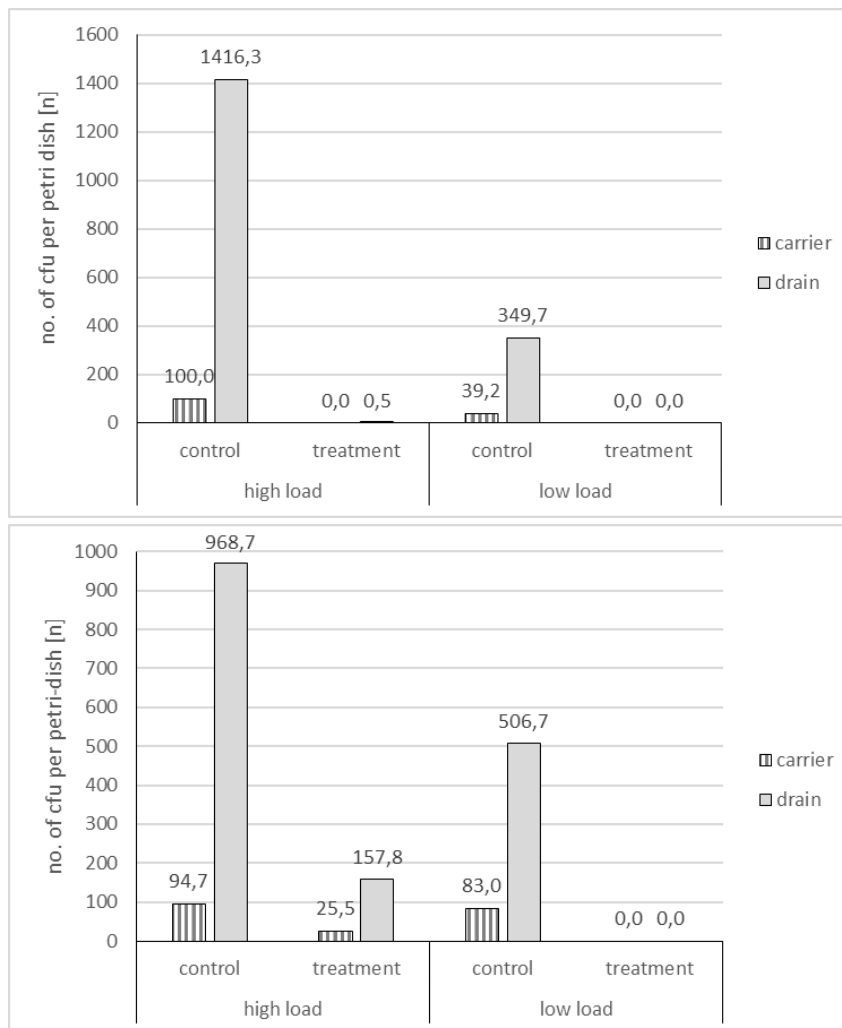


Abb. 18: Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel zur Dekontamination von *R. pseudosolanacearum* Probensträgern aus Edelstahl (oben) und Kunststoff (unten) in Abhängigkeit von der Bakterienlast. Zur Kontamination wurden $6,6 \times 10^7$ Zellen/Träger (hohe Last) bzw. $2,0 \times 10^7$ Zellen/Träger (niedrige Last) verwendet. Die Probensträger wurden nach der Behandlung dreimal in eine Petrischale mit Nährmedium abgeklatscht und zudem 100 µl des Abschwemmwassers (drain) ausplattiert. Dargestellt ist jeweils die mittlere Anzahl der colony forming units (cfu) je Petrischale. n=6.

Die desinfizierende Wirksamkeit erwies sich für *P. carotovora*-Prüfträgern ebenfalls als sehr hoch, wenngleich Unterschiede in Bezug auf das Oberflächenmaterial bestehen (Tab. 3). So war *P. carotovora* vollständig auf Trägern aus Glas und PVC und dem korrespondierenden Abschwemmwasser abzutöten (Wirksamkeit >99,9%). Bei den offenenporigen Holzträgern konnte mit einer durchschnittlichen Wirksamkeit auf den Trägern von 94,6% und 99,9% im Abtropfwasser ein sehr gutes Desinfektionsergebnis erzielt werden. Die Streuung in der Anzahl der auf dem Nährmedium ausgewachsenen Bakterienkolonien, insbesondere bei den Kontrollen, ist jedoch beachtlich (Abb. 19).

Tab. 3: Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel zur Dekontamination von *Pectobacterium carotovora* von Oberflächen aus Kunststoff, Holz und Glas. Die Kontamination wurde dabei mit 2×10^2 bis $4,5 \times 10^6$ Bakterien/cm² Trägeroberfläche vorgenommen. Die Probenträger wurden nach der Behandlung in eine Petrischale mit Nährmedium abgeklatscht und 100 µl des Abschwemmwassers ausplattiert, die Anzahl der auswachsenden Bakterienkolonien ermittelt und die Wirksamkeit jeweils im Bezug zu mit Wassersprühnebel behandelten Prüfrägern berechnet. Kunststoff (n=27), Holz (n=20), Glas (n=27)

Material	Wirksamkeit [%]	
	Träger	Abschwemmwasser
Kunststoff (PVC)	99,99	99,95
Holz	94,62	99,90
Glas	99,97	99,85

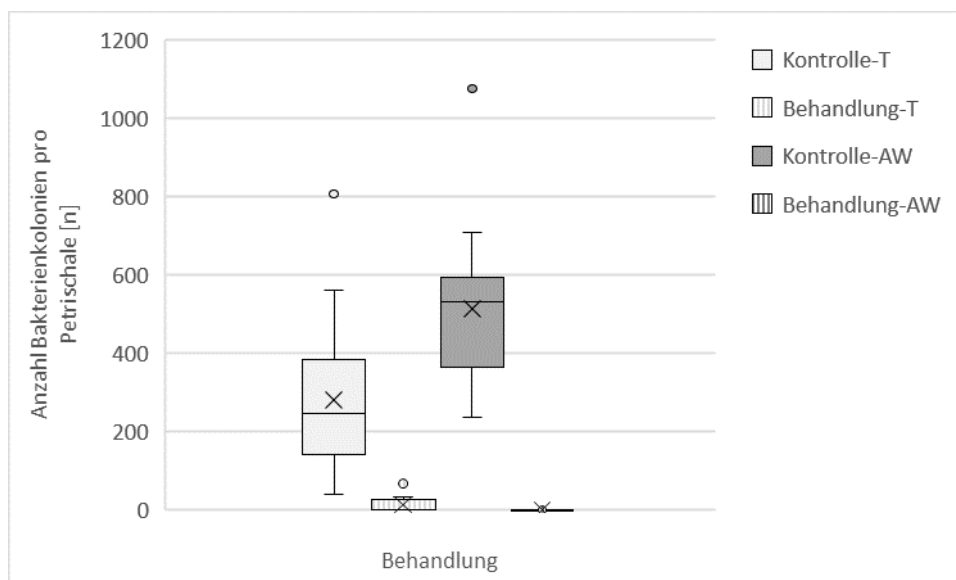


Abb. 19: Anzahl Bakterienkolonien nach Applikation von ozoniertem Wassersprühnebel (Behandlung) bzw. Wassersprühnebel (Kontrolle) auf mit *P. carotovora* kontaminierten Trägern aus Holz. Es wurde die Anzahl der colony forming units (cfu) nach Abklatschen der Träger (T) und nach Ausplattieren des Abtropfwassers (AW) ermittelt. n=20

4.4 Fungizide Wirksamkeit

Die fungizide Wirksamkeit des ozonierten Wassersprühnebels wurde unter Verwendung der Krankheitserreger *F. oxysporum* ssp. *lycopersicum* und *Alternaria alternata* geprüft. *In vitro* konnte *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersicum* abgetötet werden, nicht jedoch *A. alternata*.

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse bestätigend, waren auch mit *A. alternata* kontaminierte Träger aus Edelstahl und Kunststoff (Polypropylen) nicht durch den ozonierten Wassersprühnebel zu dekontaminieren.

Eine Wirkung des ozonierten Wassersprühnebels gegen *F. oxysporum* ssp. *lycopersicum* konnte weder bei Verwendung der Träger aus Metall, noch Kunststoff und Holz festgestellt werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede – auch keine Tendenzen - zwischen der Kontrolle und der Behandlung. Dabei wurde der Versuch mit jeweils 20 Trägern pro Trägermaterial dreimal durchgeführt.

5. Fazit

Mit der mobilen Sprüheinheit konnten wir unter Verwendung einer Fein-Hohlkegeldüse ozonierten Wassersprühnebel mit 0,35 bis 0,6 mg/L ausbringen. Der Prototyp verfügte weder über Einstellmöglichkeiten bzgl. der Ozonkonzentration, noch über eine Anzeige der aktuellen Ozonkonzentration im Wassersprühnebel. Letztgenannte musste jeweils manuell über ein colorimeterisches Verfahren ermittelt werden. Der zu produzierende Demonstrator (TRG 8) bzw. die Nullserie (TRG 9) sollte unbedingt um eine Anzeige der Ozonkonzentration ergänzt werden. Die Mindestanforderung wäre eine Anzeige, dass eine noch zu definierende Mindestkonzentration nicht erreicht ist.

Eine inaktivierende Wirkung gegen Pflanzenkrankheitserreger aus der Gruppe der Bakterien und Pilze konnte zuverlässig und reproduzierbar gezeigt werden: *in-vitro* und auf im Gartenbau häufig verwendete Oberflächen aus Holz, Kunststoff (Polystyrol, Polypropylen und Polyvinylchlorid), Metall (Edelstahl, Rohstahl) und Glas. Erfolgreich inaktiviert werden konnten der ökonomisch bedeutende pilzliche Erreger *Fusarium oxysporum* und die bakteriellen Erreger *Pectobacterium carotovora*, *P. periformis*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia pseudosolanacearum* und *R. solanacearum*; die beiden letztgenannten sind geregelte Schadorganismen in der EU. Zur Inaktivierung von stabilen Pflanzenviren, wie solchen aus der Gattung *Tobamovirus*, ist das Verfahren nicht geeignet. Ob eine zufriedenstellende Desinfektionsleistung für weniger stabile Pflanzenviren wie beispielsweise das Cucumber mosaic virus (CMV), Grapevine fan leaf virus (GFLV) oder Tomato spotted wilt virus (TSWV) zu erzielen ist, wäre mit weiteren Versuchen abzuklären.

Bemerkenswert ist, dass die sehr gute Desinfektionswirkung gegenüber den pflanzenschädigenden Bakterien unterschiedlicher Gattungen mit sehr niedrigen Ozonkonzentration von < 0,6 ppm zu erzielen ist. Die Desinfektionsleistung ist nicht nur abhängig von der Pathogengattung bzw. -art, sondern insbesondere auch von der

Oberflächenart und Beschaffenheit. So zeigten bereits Shelobolina et al. (2018), dass die Inaktivierung von *Pseudomonas aeruginosa* - einem human- und tierpathogenen Bakterium, das häufig nosokomiale Infektionen hervorruft und gegen viele Antibiotika resistent ist - auf einer porösen Keramikoberfläche signifikant schwieriger ist als auf Kunststoffmaterialien und Glas. Die Autoren verwendeten ozoniertes Wasser mit einer vergleichsweise hohen Konzentration von 2, 5 und 7 mg/L Ozon und einer Expositionszeit von 20 Minuten.

Die Desinfektionsleistung von ozoniertem Wasser ist von verschiedenen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und organischen Bestandteilen abhängig (von Sonntag und von Gunten, 2012). Wir haben die Untersuchungen standardisiert mit demineralisiertem Wasser bei 20-24°C und ohne weitere organische oder anorganische Verschmutzung der Keimträgeroberflächen durchgeführt. Praxisübliche Verschmutzungen sollten bei der Weiterentwicklung (Demonstrator, Nullserie) berücksichtigt und deren möglicher Einfluss auf die Dekontamination geprüft werden.

Grundsätzlich hat die mobile Sprüheinheit ein großes Potential zur Desinfektion verschiedenster Oberflächen in der gärtnerischen Produktion. Vorteile gegenüber anderen Verfahren liegen in der räumlich flexiblen Einsetzbarkeit, des sehr niedrigen Verbrauchs an Ressourcen (insb. Wasser und Energie) und darin, dass es sich weder um einen Gefahrstoff handelt, noch bei oder während der Anwendung unerwünschte Bei- oder Nebenprodukte entstehen.

6. Literatur

Anonymous (2012) Pflanzenschutzgesetz vom 6. Februar 2012 (§2 Nr. 2).

Bandte M, Ehlers J, Nourinejhad Zarghani S, Büttner C (2024) A Combined Cleaning and Disinfection Measure to Decontaminate Tire Treads from Tomato Brown Rugose Fruit Virus. *Hygiene*, 4(3), 269-281.

Ibanoglu S (2023) Applications of ozonation in the food industry. In: *Non-Thermal Food Processing Operations*. Elsevier, pp. 55–91.

Khadre MA, Yousef AE, Kim JG (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of food science*, 66(9), 1242-1252.

Lim S, Shi JL, von Gunten U, McCurry DL (2022) Ozonation of organic compounds in water and wastewater: A critical review. *Water Research*, 213, 118053.

Patil S, Bourke P (2012) Ozone processing of fluid foods. In: *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods* (pp. 225-261). Academic Press.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, 3(3), 430-439.

Shelobolina ES, Walker DK, Parker AE, Lust DV, Schultz JM, Dickerman GE (2018) Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Formed under High Shear Stress on Various Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces by a Continuous Flow of Ozonated Water. *Biofouling* 34, 826–834.

Stoev SD (2024) Food Security and Foodborne Mycotoxicoeses - What Should Be the Adequate Risk Assessment and Regulation? *Microorganisms*, 12(3), 580.

von Sonntag C, von Gunten U (2012) Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment. <https://library.oapen.org/handle/20.500.12657/43794>.

Angefertigte und in Bearbeitung befindlichen Qualifikationsarbeiten

- Moritz Albrecht: "Entwicklung eines Verfahrens zur Prüfung der Wirksamkeit von ozonisiertem Wasser zur Desinfektion von Oberflächen in der gärtnerischen Produktion am Beispiel des bakteriellen Krankheitserregers *Pseudomonas syringae*", abgeschlossen
- Dominik Frömmel: „Hygienisierung von Oberflächen im gärtnerischen Umfeld mit ozoniertem Wasser am Beispiel des bakteriellen Krankheitserregers *Pectobacterium carotovorum*“, in Begutachtung

Fachbeiträge in Fachzeitschriften

Es ist geplant die Ergebnisse in einer Fachzeitschrift zu veröffentlichen.

Fachbeiträge (Vortrag, Poster u.a.) auf Fachkonferenzen

- 79. ALVA-Jahrestagung, Österreich
 - Albrecht, M., Wohlfahrt, S., Rumbou, A., Büttner, C., Bandte, M.: Entwicklung eines Verfahrens zur Prüfung der Wirksamkeit von ozonisiertem Wasser zur Desinfektion von Oberflächen in der gärtnerischen Produktion am Beispiel des bakteriellen Krankheitserregers *Pseudomonas syringae*, Vortrag
 - Frömmel, D., Albrecht, M., Wohlfahrt, S., Roumpou, A., Büttner, C., Bandte, M.: Hygienisierung von Oberflächen im gärtnerischen Umfeld mit ozonisiertem Wasser am Beispiel des bakteriellen Krankheitserregers *Pectobacterium carotovorum*, Poster
- 64. Deutsche Pflanzenschutztagung, Deutschland
 - Frömmel, D., Wohlfahrt S., Rumbou, A., Büttner, C., Bandte, M.: Dekontamination von gärtnerischen Oberflächen - Potential von ozoniertem Wassersprühnebel, Posterbeitrag angenommen
 - Albrecht, M., D., Wohlfahrt S., Rumbou, A., Büttner, C., Bandte, M.: Dekontamination von gärtnerischen Oberflächen - Entwicklung eines standardisierten Verfahrens zur Prüfung der Wirksamkeit von ozoniertem Wassersprühnebel, Posterbeitrag angenommen