

WHFF-Projekt Nr. 2014.02**Anwendung von Pilzmelanin zur Erhöhung der
Dauerhaftigkeit von Holz gegen Holz zerstörende
Pilze****Wissenschaftlicher Schlussbericht****Prof. Dr. F. Schwarze & Dr. M. Schubert**



Materials Science & Technology

November 2015

Abteilung Angewandte Holzforschung

Kontakt:

Prof. Dr. Francis W.M.R. Schwarze
Head Bio-engineered Wood
Applied Wood Materials
Empa Swiss Federal Laboratories for
Materials Testing and Research
Lerchenfeldstrasse 5
CH-9014 St. Gallen
Tel +41 587657247

francis.schwarze@empa.ch

Inhaltsangabe

Vorwort	VI
Zusammenfassung	VII
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	8
1.1 Problembeschreibung.....	8
1.2 Stand des Wissens.....	10
2 VERSUCHSPROGRAMM	14
2.1 Melaninsynthese von Pilzen in Flüssigkultur	15
2.1.1 Screening potenter Melaninproduzenten.....	15
2.1.2 Einfluss der Medienkomposition auf die Melaninproduktion.....	17
2.1.3 Einfluss physikalischer Parameter auf die Melaninproduktion	19
2.2 Charakterisierung des Melanins.....	20
2.2.1 Melaninextraktion & Biochemische Reaktionen	20
2.2.2 UV/VIS-Spektroskopie	21
2.2.3 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie.....	22
2.3 Anwendung von Pilzmelanin im Holzschutz.....	23
2.3.1 Versuche nach EN 113	23
2.3.1.1 Vorbereitung und Applikation der Testschutzmittel.....	27
2.3.1.2 Auswaschungsbeanspruchung nach EN 84.....	28
2.3.1.3 Pilzexposition.....	28
2.3.2 Effekt von Melanin auf das Wachstum holzerstörender Pilze	31
3 ERGEBNISSE & DISKUSSION.....	31
3.1 Melaninsynthese.....	32
3.2 Charakterisierung des Melanins.....	36
3.3 Anwendung von Pilzmelanin im Holzschutz	40
3.3.1 Auswertung Versuch EN 113	40
3.3.2 Effekt von Melanin auf das Wachstum holzerstörender Pilze	53
4 FAZIT.....	54
LITERATURVERZEICHNIS	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chrom- und borhaltige Holzschutzmitteltypen	8
Abbildung 2: Biosyntheseweg der Pigmente (Melanin)	11
Abbildung 3: Abhängigkeit der Melaninproduktion	15
Abbildung 4: Vorkulturen der im EN113-Versuch eingesetzten Prüfpilze	26
Abbildung 5: Prüfkörpern des EN 113 Versuches in der Klimakammer	29
Abbildung 6: Melaninproduktion unter Verwendung diverser Nährmedien	32
Abbildung 7: Extraktionsprodukt aus Flüssigkultur mit <i>A. cepistipes</i>	36
Abbildung 8: Chemische Reaktionen zur Charakterisierung von Melanin	37
Abbildung 9: UV/VIS-Spektren von <i>Armillaria</i> -Arten	38
Abbildung 10: FTIR-Spektroskopie	39
Abbildung 11: Analyse der Interaktionen zwischen Melanin und Kupfersulfat	41
Abbildung 12: Ergebnisse des Wachstumsversuches mit melaninhaltigem MEA	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Arbeiten im WHFF-Projekt 2014.02	14
Tabelle 2: Pilzarten für das Screening eines potenten Melaninproduzenten	17
Tabelle 3: Übersicht über die getesteten Medienkompositionen	18
Tabelle 4: Chemische Reaktionen zur Charakterisierung von Melanin	21
Tabelle 5: Übersicht EN113 - Testschutzmittel und Versuchsbedingungen	24
Tabelle 6: EN113 – Übersicht Prüfkörper Braunfäuleerreger	25
Tabelle 7: EN113 – Übersicht Prüfkörper Weissfäuleerreger	25
Tabelle 8: Übersicht – Ergebnisse Melaninsynthese	34
Tabelle 9: Ergebnisse der Virulenzkontrollen I	40
Tabelle 10: Einfluss von Melanin auf den mittleren Masseverluste (%)	42
Tabelle 11: Ergebnisse <i>C. puteana</i> – Behandlung mit CuSO_4	43
Tabelle 12: Ergebnisse <i>C. puteana</i> – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin	44
Tabelle 13: Ergebnisse <i>R. placenta</i> – Behandlung mit CuSO_4	45
Tabelle 14: Ergebnisse <i>R. placenta</i> – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin	46
Tabelle 15: Ergebnisse <i>G. trabeum</i> – Behandlung mit CuSO_4	47
Tabelle 16: Ergebnisse <i>G. trabeum</i> – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin	48
Tabelle 17: Ergebnisse <i>T. versicolor</i> – Behandlung mit CuSO_4	49
Tabelle 18: Ergebnisse <i>T. versicolor</i> – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin	50
Tabelle 19: <i>T. versicolor</i> – Behandlung mit CuSO_4 / Auswaschungsbeanspruchung	51
Tabelle 20: <i>T. versicolor</i> – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin / Auswaschungsbeanspruchung	52

Vorwort

Der vorliegende Bericht dokumentiert die Ergebnisse des WHFF-Projektes 2014.02 „Anwendung von Pilzmelanin zur Erhöhung der Dauerhaftigkeit von Holz gegen Holz zerstörende Pilze“, welches von der Empa, Abteilung Angewandte Holzforschung zusammen mit der Firma Schilliger Holz AG durchgeführt wurde.

Die im Projektbericht beschriebenen Ergebnisse und Ausführungen basieren weitgehend auf der Masterarbeit „Pilze und Melanin – Synthese und Anwendung“, welche von Frau Annika Stobbe im Rahmen dieses Projektes erfolgreich verfasst wurde.

Folgende Organisationen und Personen waren massgeblich an der Durchführung des Projektes involviert:

- Empa, Abteilung Angewandte Holzforschung: Francis Schwarze, Mark Schubert, Martin Arnold, Markus Heeb, Annika Stobbe
- Schilliger Holz AG: Ernst Schilliger, Tobias Osterwalder
- Fonds zu Förderung der Wald- und Holzforschung

An dieser Stelle möchte sich die Empa, Abteilung Angewandte Holzforschung bei allen Beteiligten für das Engagement, die geleisteten Arbeiten und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Zusammenfassung

Melanine sind strukturell heterogene Makromoleküle, die durch oxidative Polymerisation indolischer oder phenolischer Komponenten gebildet werden und in diversen Organismen aller biologischen Reichen vorkommen. Unter Pilzen ist die Fähigkeit zur Melaninbiosynthese weit verbreitet und ermöglicht ihnen die Überdauerung widriger Umwelteinflüsse. Durch komplexe chemische Eigenschaften, insbesondere die Fähigkeit zur Absorption elektromagnetischer Wellen und die daraus resultierende photoprotektive Wirkung, ermöglicht Melanin verschiedenen Mikropilzen die Anpassung an extreme Habitate – von der antarktischen Kältewüste bis zu den nuklear verseuchten Reaktorruinen von Chernobyl. Dieselben Eigenschaften bedingen ein hohes Potential zur Verwendung von Melanin in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie. Aus diesem Grund besteht großes Interesse an der Nutzung geeigneter Mikroorganismen zur Produktion von Melanin, in der Regel mittels Biotransformation von Tyrosin.

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Melaninproduktion mithilfe verschiedener Pilzarten in Flüssigkultur unternommen. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit Arten der Gattung *Armillaria* in Kulturen mit tyrosinhaltigem Nährmedium erzielt, wobei Melaninkonzentrationen bis 28 g/l im Kulturüberstand erreicht werden konnten. Es wurden explorative Untersuchungen zur Optimierung der Kulturbedingungen durchgeführt und mögliche Einflussfaktoren, die Melaninsynthese betreffend, identifiziert. Die Produktionsleistung weist jedoch starke Schwankungen auf, weshalb weiterführende Versuche zur Optimierung des Produktionsprozesses notwendig sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Anwendbarkeit von Melanin aus *Armillaria* Kulturen als Bestandteil kupferbasierter Holzschutzmittel getestet. Eine wachstumshemmende Wirkung von Melanin auf holzzerstörende Basidiomyceten konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Auch eine positive Wirkung von Melanin auf die Grenzen der Wirksamkeit von Kupfersulfat kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht belegt werden. Um das Anwendungspotential von Melanin im Holzschutz durch eine verbesserte Bindung von Kupfersulfat an Holz abschließend zu beurteilen, sind daher weitere Untersuchungen und eine Optimierung des Applikationsverfahrens erforderlich.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Problembeschreibung

Bis Mitte der Neunziger Jahre wurden Biozide in der Europäischen Union (EU) weitgehend ungeprüft verbreitet/eingeführt und angewendet. Dies änderte sich mit Inkrafttreten der Biozid Produkte-Richtlinie (RL 98/8/EG) am 16. Februar 1998. Mit der Richtlinie schuf die EU ein Instrument zur Bewertung und Zulassung von Biozidprodukten in Europa. Ziel der EU-weit einheitlichen Regelung ist der Schutz von Gesundheit und Umwelt, wobei der Nutzen von Bioziden anerkannt bleibt. Biozidprodukte, deren Wirkstoffe weder notifiziert noch identifiziert wurden, haben ihre Vermarktungsfähigkeit am 14. Dezember 2003 verloren. Seit dieser Frist besteht eine Zulassungspflicht für alle Biozidprodukte. Seit Juli 2012 ist die neue Biozid-Verordnung (EU) No. 528/2012 in Kraft. Diese muss ab September 2013 in allen europäischen Mitgliedstaaten angewendet werden und löst damit die bisher geltende Biozid-Richtlinie ab. Im Vergleich zur „alten“ Richtlinie gibt es einige Neuerungen. Beispielsweise wurde der Anwendungsbereich erweitert und umfasst zukünftig auch Nanomaterialien und mit Biozidprodukte behandelte Waren. Es wurden Ausschlusskriterien formuliert, die die Genehmigung von Wirkstoffen mit bestimmten Eigenschaften, zum Beispiel CMR (Karzinogen, Mutagen, reprotoxisch) oder PBT (Persistent, bioakkumulierend, toxisch) untersagen. Insgesamt hat die Anzahl der zur Verfügung stehenden Holzschutzmittel stark abgenommen (Abb. 1).

Zukunft – Produktgruppen in Europa

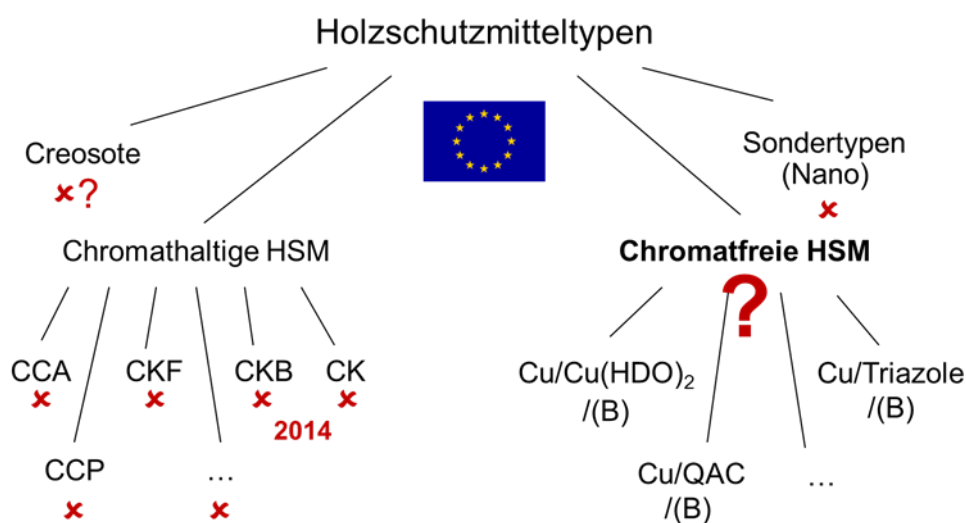


Abbildung 1: Chrom- und borhaltige Holzschutzmitteltypen, die in naher Zukunft entweder verboten bzw. bereits nicht mehr hergestellt werden.

Derzeit werden in der Schweiz Holz für die Gebrauchsklasse 4 mit Chrom-Kupfer (CK-Salzen) und Chrom-Kupfer-Bor-Salzen (CKB-Salzen) imprägniert. Infolge der Diskussion um die öko(toxiko)logischen Auswirkungen des Fixierungsmittels Chrom, der Umsetzung der Richtlinie 98/8/EG über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten und der Umsetzung von REACH (Verordnung EG 1907/2006) über die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe, könnte der Einsatz von chromhaltigen Zubereitungen für die Gebrauchsklasse 4 in Zukunft eingeschränkt oder verboten werden. Die EU Kommission hat den Anhang XIV zu REACH am 17.4.2013 aktualisiert. Chromtrioxid (karzinogen) und Borsäure (reproduktionstoxisch) wurden in der Liste der besonders besorgniserregenden Stoffe (SVHC) gemäss REACH aufgenommen. Die seit 1. Juni 2007 geltende REACH-Verordnung verlangt von Unternehmen, die einen chemischen Stoff in Mengen von mehr als einer Tonne pro Jahr herstellen oder importieren, diesen Stoff in einer zentralen Datenbank registrieren zu lassen. Für gefährliche Stoffe werden im Rahmen einer Risikobewertung die Bedingungen für einen sicheren Umgang ermittelt und mit einem Sicherheitsdatenblatt den Verwendern mitgeteilt. Zugleich sollen durch ein Zulassungsverfahren innovationsfördernde Anreize zur Substitution besonders gefährlicher Stoffe geschaffen werden. Hintergrund von REACH ist die Schaffung eines einheitlichen Rechtssystems für alle Chemikalien.

Erste Hersteller von chromhaltigen Holzschutzmitteln für die Holzimprägnierung in Deutschland, z.B. die Firma Obermeier, verzichten seit kurzem auf Chrom in ihren Formulierungen. Daher muss es gebrauchstaugliche Alternativen z.B. chromfreie Holzschutzmittel mit akkuraten Daten für diesen Einsatz am Markt geben, da es sonst zu Problemen in der Erhaltung der Leitungsnetze kommen kann.

Im Hinblick auf eine möglichst hohe Dauerhaftigkeit von Holz kommen als chromfreie Alternativen etwa Imprägnierungs-Produkte auf Basis organischer Kupferverbindungen und quaternärer Ammoniumverbindungen oder kupfernanobasierte Formulierungen in Frage (Abb. 1). Im Jahr 2005 startete die EMPA mit führenden Holzschutzmittelproduzenten das Forschungsprojekt "Chromfreie Holzschutzmittel". Hauptziel war es dabei, Aussagen über die Langzeitwirksamkeit der Imprägnierung und die Standzeit der Masten zu treffen. Bislang zeigen die Ergebnisse, dass chromfreie Holzschutzmittel gegenüber chromhaltigen signifikante Unterschiede in der Performance aufweisen.

Labor- und Freilandstudien zeigen, dass chromfrei imprägnierte Holzmasten eine höhere Anfälligkeit gegenüber kupfertoleranten, Holz zerstörenden Pilzen besitzen. Nach jetzigem Wissensstand muss damit gerechnet werden, dass die Dauerhaftigkeit

von Holz, das mit chromfreien Holzschutzmitteln imprägniert wird deutlich reduziert ist.

In der Folge und im Rahmen der Umsetzung der neuen Biozid-Richtlinie muss die Industrie ihre Bemühungen verstärken, brauchbare, weniger umweltschädliche Alternativen zu finden.

Der Ansatz der Holz-Melanisierung mit kostengünstigen, eigens synthetisierten Melanin zur Fixierung von Wirkstoffen wie Kupfer an die Holzstruktur, ist ein komplementärer Ansatz und hätte den Vorteil, dass Melanin als organische Alternative nicht toxisch ist und somit keine zusätzliche Bodenbelastung darstellt.

Zielsetzung

Das Ziel des Projektes war die Entwicklung eines innovativen Holzschutzverfahrens gegen Holz zerstörende Pilze auf Basis von Pilzmelanin. Das Projekt war eine Ergänzung des WHFF-Projekt Nr. 2013.04 „Verbesserter Witterungsschutz von Holzoberflächen mittels Pilzmelanin“.

Folgende Teilziele wurden angestrebt:

1. Screening und Selektion von Pilzarten, die *in vitro* grosse Mengen Melanin bilden.
2. Kostengünstige Herstellung von Melanin
3. Demonstration der Applikation von Pilzmelanin zur Erhöhung der biologischen Dauerhaftigkeit von Holz.

1.2 Stand des Wissens

Melanine sind strukturell heterogene Makromoleküle, die durch oxidative Polymerisation phenolischer oder indolischer Komponenten entstehen (Butler & Day, 1998; Eisenman & Casadevall, 2012). Dabei bilden die phenolischen und indolischen Monomere Komplexe mit Proteinen und häufig auch Kohlenhydraten (Butler & Day, 1998). Aufgrund ihrer heterogenen Struktur werden sie in der Regel anhand verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften definiert. Dazu gehören die Unlöslichkeit in Wasser und den meisten organischen und anorganischen Lösungen, die relative Resistenz gegen heisse oder kalte, konzentrierte Säuren, die Bleichwirkung starker Oxidantien wie Wasserstoffperoxid, sowie eine bedingte Löslichkeit in stark alkalischen Lösungen (Butler & Day, 1998). Sie sind hydrophob, negativ geladen und durch das Vorhandensein verschiedener funktioneller Gruppen (je nach Precursor – zum Beispiel Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminogruppen) in der Lage ein breites Spektrum verschiedener Substanzen zu binden (Eisenman & Casadevall, 2012).

In Abhängigkeit von Syntheseweg und Precursor können verschiedene Arten von Melaninen unterschieden werden, von denen in Bezug auf Pilze vor allem DHN- und DOPA-Melanin relevant sind (Butler & Day, 1998; Henson *et al.*, 1999; Eisenman & Casadevall, 2012). Die Synthese von DOPA-Melanin durch Pilze weist starke Ähnlichkeiten zur Melaninsynthese bei Säugetieren auf (Langfelder *et al.*, 2003). Dabei katalysieren Tyrosinasen und/oder Laccasen die Hydroxylierung von Tyrosin oder die Oxidation von 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) zu Dopachinon (Abb. 2). Ausgehend von Dopachinon, einem hoch reaktiven Zwischenprodukt, kommt es durch Oxidation und Hydroxylierung in mehreren Schritten zur Bildung von Dihydroxyindolen, aus denen wiederum durch Polymerisation DOPA-Melanin gebildet werden kann (Bell & Wheeler, 1986; Langfelder *et al.*, 2003). Eine Vielzahl von Pilzen und anderen Mikroorganismen ist in der Lage, DOPA-Melanin aus Tyrosin zu synthetisieren, auch solche, die unter normalen Wachstumsbedingungen kein Melanin bilden (Butler & Day, 1998). Die Melaninsynthese ist somit abhängig vom Vorhandensein eines geeigneten Precursors, der unter Beteiligung verschiedener Enzyme (Tyrosinasen und Laccasen) oxidiert und umgewandelt wird (Bell & Wheeler, 1986).

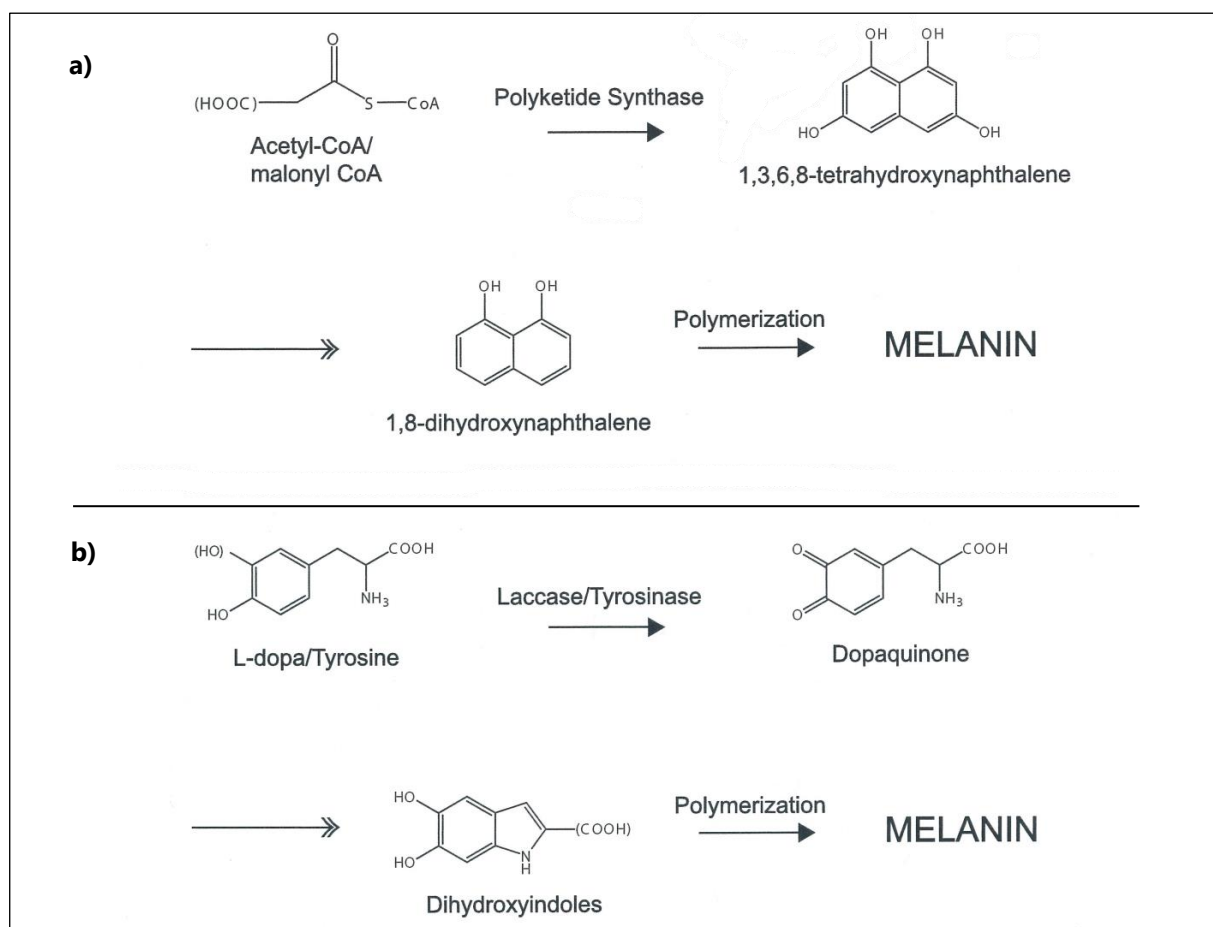


Abbildung 2: Biosyntheseweg der Pigmente **a)** DHN-Melanin und **b)** DOPA-Melanin (Eisenman & Casadevall, 2012).

Aufgrund ihrer molekularen Struktur sind Melanine in der Lage elektromagnetische Wellen vom UV- bis in den Infrarotbereich zu absorbieren, weshalb sie in der Regel dunkelbraun bis schwarz gefärbt erscheinen (Bell & Wheeler, 1986). Melanin-Polymere enthalten Chinone in verschiedenen Oxidationsstufen, darunter freie Radikale in Form von Semichinonen, was mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie nachweisbar ist. Diese sind durch den strukturellen Verbund mit Chinonen und Hydrochinonen stabilisiert. Dadurch können Melanine als physiologischer Redox-Puffer fungieren (Bell & Wheeler, 1986; Butler & Day, 1998; Henson *et al.*, 1999), während sie zugleich auch eine Senke für freie Radikale sind (Butler & Day, 1998). Die einzigartigen Eigenschaften von Melaninen legen ein hohes Anwendungspotential in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie nahe, etwa in der Medizin oder im Umweltschutz (Eisenman & Casadevall, 2012). Hervorzuheben sind dabei die Funktionen von Melanin als Strahlenschutz und natürlicher Akkumulator diverser Substanzen, unter anderem von toxischen Schwermetallen.

Melanin ermöglicht Mikroorganismen die Erschließung extremer Lebensräume mit hoher Strahlungsbelastung (Dadachova & Casadevall 2008). Die Schutzwirkung von Melanin basiert dabei auf einer Kombination physikalischer und chemischer Eigenschaften, durch die eine Nutzung entsprechender Biopolymere als Strahlenschutz in diversen Anwendungsbereichen von Interesse wäre.

Im medizinischen Experimenten etwa konnten melanisierte Nanopartikel erfolgreich eingesetzt werden, um strahlungsbedingte Schäden am Knochenmark zu verhindern, wie sie als Nebenwirkung von Strahlenbehandlungen in der Krebstherapie auftreten (Eisenman & Casadevall, 2012). In einer weiteren Studie wurde eine sowohl prophylaktische als auch mitigative Wirkung von Melanin bei Strahlenexposition nachgewiesen (Kunwar *et al.* 2012). Die Überlebensrate von Mäusen, die einer potentiell tödlichen Bestrahlung (7Gy, whole body irradiation) ausgesetzt wurden, konnte durch die experimentelle Behandlung mit Melanin aus Pilzkulturen mit *Gliocephalotrichum simplex* in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis um bis zu 100% gesteigert werden. Durch die Behandlung konnte die strahlungsinduzierte Schädigung des blutbildenden Systems, sowie das Absterben (Apoptose) von Milzzellen verhindert werden. Darüber hinaus konnte der oxidative Stress im Lebergewebe reduziert und die Produktion entzündungsfördernder Zytokine gehemmt werden (Kunwar *et al.* 2012). Potential für den Einsatz von Melanin zum Schutz vor ionisierender Strahlung besteht nicht nur für die medizinische Anwendung – etwa in der Krebstherapie – sondern auch in Anbetracht der nuklearen Katastrophen der jüngeren Vergangenheit.

Aus den photoprotektiven Eigenschaften von Melaninen ergeben sich weitere Einsatzmöglichkeiten, etwa bei der Herstellung von Hautschutzprodukten oder Kunststoffen (Jalmi *et al.*, 2012). Der Einsatz von Melanin als Komponente in Sonnenschutzmitteln – neben Hautschutzcremes zum Beispiel auch im Glas von Sonnenbrillen – ist bereits etabliert und verbreitet (Riley 1997).

Durch ihre Fähigkeit zur Bindung diverser Substanzen besteht ein hohes Einsatzpotential für Melanine im Bereich der Bioremediation (Eisenman & Casadevall, 2012). Viele Pilzarten sind in der Lage relevante Mengen toxischer Schwermetalle und Radionuklide zu akkumulieren (White & Gadd 1990). Melanine spielen bei der Bindung und Immobilisierung von Schwermetallen und Radionukliden eine wichtige Rolle. In einer ehemaligen Mine in Cornwall konnten in den melanisierten Apothecien eines lichenisierten Acomyceten (*Trapelia involuta*) eine Akkumulation von Uran, Eisen und Kupfer in hoher Konzentration nachgewiesen werden (Purvis *et al.* 2004). Die Bindung von Uran mithilfe von bakteriellem Melanin konnte experimentell sowohl im Labor, als auch in Feldstudien an kontaminierten Böden nachgewiesen werden (Turick *et al.* 2008). In Versuchen mit kontaminiertem Meerwasser konnte Uran mithilfe von Melanin nahezu vollständig gebunden werden (Sakaguchi & Nakajima 1987). Die Kontamination von Böden und Gewässern durch Uran ist ein weltweites Problem – bedingt sowohl durch geologische Gegebenheiten als auch durch anthropogene Ursachen – etwa Bergbau oder den Einsatz anorganischer Düngemittel.

Weitere Einsatzmöglichkeiten für Melanine bestehen bei der Aufbereitung schwermetallkontaminierter Abwässer. In entsprechenden Versuchen mit synthetischem Melanin und Melanin aus menschlichem Haar konnten Blei, Zink, Cadmium und Kupfer an melaninbeschichteten Kunststofffiltern gebunden werden. Eine effektive Bindung von Cadmium und Blei konnte auch in Versuchen mit Sepiamelanin erreicht werden. In diesem Zusammenhang ist es beachtenswert, dass die Fähigkeit von Melaninen zur Sorption von Metall-Ionen in Abhängigkeit von Herkunft und Precursor unterschiedlich ausfallen kann. In Bezug auf die Bindungskapazität von Kupfer-Ionen konnten im direkten Vergleich von Melanin aus *Aureobasidium pullulans* und *Cladosporium resinae* deutliche Unterschiede festgestellt werden (Gadd & Derome 1988). Insofern sind bei der Produktion von Melanin für entsprechende biotechnologische Applikationen neben quantitativen Aspekten auch qualitative Merkmale relevant.

2. Versuchsprogramm

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Arbeiten im WHFF-Projekt 2014.02

Arbeitspaket		Inhalt	Durchgeführte Arbeiten
1	Grundlagen und Bereitstellung von Probenmaterial	aktueller Wissensstand (<i>Eigenleistung</i>)	- Laufende Sichtung der relevanten wissenschaftlichen Literatur
		Vorversuche (<i>Eigenleistung</i>)	- Erste Vorauswahl an Pilzstämmen
		Holzproben	- Beschaffung und Zuschnitt (2 Holzarten)
		Versuchsplanung	- Definition Versuchsvarianten - Planung spezifische Inkubationsverfahren zur Melaninproduktion - Planung Versuchsreihen zur Holz-Melanisierung
2	Screening und Melaninproduktion	Pilzkulturen (<i>Eigenleistung</i>)	- Selektion, Beschaffung und Anzucht geeigneter Pilzstämmen
		Selektion eines potenten Melaninproduzenten	- Screening verschiedener Pilzstämmen
		Bestimmung wichtiger Produktionsparameter	- Photometrische Bestimmung des Melaningehaltes - Tests verschiedener Medienkompositionen - Untersuchungen wichtiger physikalischer Parameter (Temperatur, pH, etc.)
		ergänzende Melaninproduktion	- Upscaling der Melaninproduktion (1L Arbeitsvolumen)
3	Charakterisierung	Biochemische Charakterisierung des Pilzmelanins	- Ausfällung und Reinigung des produzierten Melanins - Charakterisierung mittels UV/VIS Spektroskopie - FTIR-atr Analyse
		Kupfer-Melaninkomplex	- Interaktion zwischen Melanin und Kupfersulfat mittels UV/VIS Spektroskopie und FTIT-atr
4	Biologische Dauerhaftigkeit	Pilzwidrige Wirkung von Melanin	- Melanisiertes Holz ohne Kupfersulfat. Prüfmethode nach EN 113. 2 Holzarten (Buche, Kiefersplint) Variante 1: Ohne Alterungsbeanspruchung Variante 2: Auswaschungsbeanspruchung (EN 84)
		Einfluss auf die Grenzkonzentration von Kupfersulfat	- Einfluss des Melanins auf die Wirkung von Kupfersulfat. Prüfmethode EN 113 (2 Holzarten (Buche, Kiefersplint) Variante 1: Ohne Alterungsbeanspruchung Variante 2: Auswaschungsbeanspruchung (EN 84)
5	Projektleitung/ Administration	Datenauswertung, Berichterstattung	- laufende Datenauswertung und -dokumentation - Zwischenbericht per April 2015

2.1 Melaninsynthese von Pilzen in Flüssigkultur

Die Melaninproduktion hängt sehr stark von verschiedenen Faktoren ab (Abb. 3). Zum einen ist die Melaninproduktion von der eingesetzten Pilzart (Inokulum) abhängig. Zum anderen hat das verwendete Medium und damit verbunden die zugeführten Nährstoffe (Precursor) einen Einfluss auf die produzierte Melaninmenge. Und zuletzt spielen die physikalischen Parameter wie Temperatur, pH-Wert etc. eine grosse Rolle. Um die Einflüsse der 3 Faktoren zu quantifizieren wurden verschiedenen Untersuchungen durchgeführt.

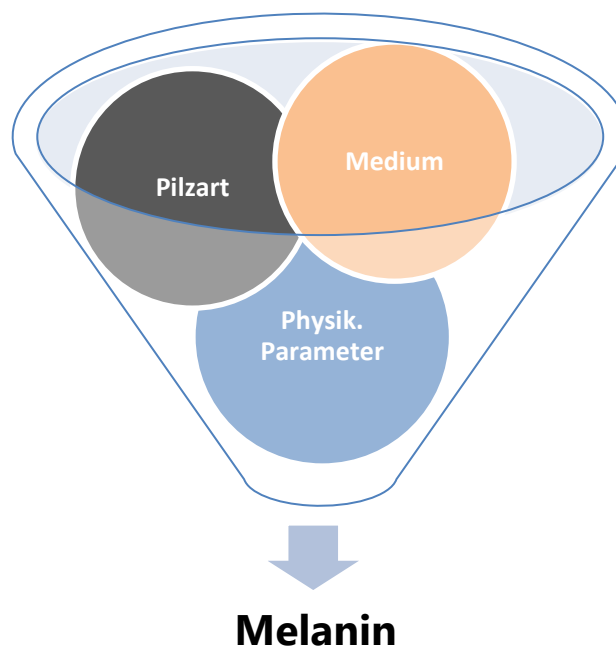


Abbildung 3: Abhängigkeit der Melaninproduktion von den Systemen Pilz, Medium und physikalische Parameter.

2.1.1 Screening potenter Melaninproduzenten

Im ersten Schritt der Untersuchungen wurden verschiedene Pilzarten, sowohl Asco- als auch Basidiomyceten in Bezug auf ihr Potential zur extrazellulären Melaninsynthese in Flüssigkultur getestet. Die Auswahl der Arten erfolgte basierend auf feldmykologischen Beobachtungen und Literaturrecherchen. Für das Screening wurden zum einen Pilzarten aus der Stammkulturrensammlung der Empa verwendet und zum anderen neue Arten aus Wildaufsammlungen in Kultur genommen (Tab. 2).

Zur Verifizierung der verwendeten Arten und vor allem der eigens isolierten Kulturen wurden molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. DNS-Extraktion und PCR erfolgten nach Protokoll mit dem Extraktions- und PCR Kit „Extract-NAMP™ Plant PCR“ von Sigma. Die PCR erfolgte mit dem Thermocycler (Biometra Personal Thermocycler) unter Verwendung der Standardprimer ITS1 und ITS4 (White *et al.*, 1990).

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert und mittels Nucleotide Blast Search (Programm: megablast) mit Sequenz-Datenbanken von NCBI (National Centre for Biotechnology Information) abgeglichen.

Melaninsynthese

Die Inkubation erfolgte in Flüssigkulturen mit jeweils 300ml tyrosinhaltigem Nährmedium in 500ml Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler bei 120rpm und einer Temperatur von 26°C. Alle Arten und die jeweilige Herkunft der Kulturen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Alle Pilze wurden auf MEA (20 g l⁻¹ Malzextrakt, 20 g l⁻¹ Agar von Oxoid) bei Zimmertemperatur vorkultiviert. Die Inokulation der Flüssigkulturen erfolgte an der Sterilbank. Standardmässig wurden dafür je 6 flächig mit Myzel bewachsene Agarpellets (Ø 1 cm) von der Vorkultur abgestochen, nach Möglichkeit aus dem im Wachstum befindlichen Randbereich der Kultur. Die Evaluierung der Melaninproduktion erfolgte mittels photometrischer Messungen, in der Regel einmal wöchentlich.

Die Quantifizierung des Melaningehaltes (g/l) im Kulturüberstand erfolgte in Anlehnung an die bei (Hoti & Balaraman, 1993; Inamdar *et al.*, 2014) beschriebene Vorgehensweise. Dafür wurden Proben (200µl) aus dem Kulturüberstand entnommen. Der Schüttler wurde jeweils etwa eine Stunde vor der Probenahme abgestellt, damit sich Biomasse und andere Partikel vom Überstand absetzen. In einigen Fällen waren dennoch grössere Mengen Biomasse in den Proben enthalten, weshalb diese nach Bedarf vor der weiteren Bearbeitung zentrifugiert wurden (4000 rpm, 60 Sekunden). Je 100µl der Probe wurden mit Pufferlösung (pH 13) im Mischungsverhältnis 1:10 in 1ml Kunststoffküvetten gegeben. Bei älteren Kulturen mit Melaningehalten über 0,6 g/l (entspricht Absorptionswerten >1) erfolgte eine zusätzliche 1:10 (insg. 1:100) Verdünnung der Probe. Die Bestimmung des Melaningehaltes erfolgte mittels spektrophotometrischer Messungen (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer) bei einer Wellenlänge von 475nm und anschliessendem Vergleich mit einer Standardkurve für synthetisches Melanin (Sigma Aldrich) als Referenz.

Tabelle 2: Pilzarten für das Screening eines potenten Melaninproduzenten

Nr.	Isolat Kennzeichnung	Pilzklasse	Herkunft
1	<i>Armillaria cepistipes</i>	Basidiomycet	Empa
2	<i>Armillaria ostoyae</i>	Basidiomycet	Isolat
3	<i>Armillaria cf borealis</i>	Basidiomycet	Isolat
4	<i>Armillaria gallica</i>	Basidiomycet	Isolat
5	<i>Inonotus obliquus</i>	Basidiomycet	Empa
6	<i>Xylaria polymorpha</i>	Ascomycet	Isolat
7	<i>Xylaria hypoxylon</i>	Ascomycet	Isolat
8	<i>Xylaria longipes</i>	Ascomycet	Isolat
9	<i>Daldinia fissa</i>	Ascomycet	Empa
10	<i>Daldinia loculata</i>	Ascomycet	Empa
11	<i>Daldinia concentrica</i>	Ascomycet	Empa
12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ascomycet	Empa
13	<i>Alternaria alternata</i>	Ascomycet	Empa
14	<i>Gliocephalotrichum simplex</i> 249.91	Ascomycet	CBS
15	<i>Gliocephalotrichum simplex</i> 511.81	Ascomycet	CBS
16	<i>P. fortunii</i>	Ascomycet	Empa

Empa=Stammkulturensammlung der Empa

CBS=Centraalbureau voor Schimmelcultures

Isolat=Für diese Studien selbst isolierte Pilze

2.1.2 Einfluss der Medienkomposition auf die Melaninproduktion

Rezeptur und Bezeichnung aller verwendeten Nährmedien sind in der tabellarischen Übersicht (Tab. 3) aufgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Melaninproduktion verschiedener Asco- und Basidiomyceten unter Verwendung des tyrosinhaltigen Nährmediums T im Vergleich zu Nährmedium M mit Malzextrakt getestet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der ersten Versuche wurde in den folgenden Versuchsansätzen standardmässig das tyrosinhaltige Nährmedium verwendet. Dieses entspricht in seiner Zusammensetzung der Rezeptur von Jalmi *et al.* (2012).

In einem weiteren Ansatz wurden Kulturen mit *Armillaria* Arten, *D. concentrica* und *X. polymorpha* unter Verwendung holzbasierter Nährmedien im Vergleich zum

Standardmedium T getestet. Bei der Auswahl der zu verwendenden Holzarten wurden die natürlichen Substratpräferenzen der untersuchten Pilzarten berücksichtigt. Die Informationen hierzu wurden aus Literaturangaben bspw. Breitenbach & Kränzlin (1984) bezogen. Getestet wurden jeweils zwei Varianten pro Pilz und Holzart, wobei das Holz in der einen Variante in Form grober Sägespäne dem Nährmedium direkt zugefügt wurde, während in der zweiten ein durch vorheriges Auskochen der Sägespäne gewonnener Extrakt verwendet wurde. Zusätzliche Varianten der holzbasierten Nährmedien wurden mit geringen Mengen Kupfersulfat angesetzt.

Tabelle 3: Übersicht über die getesteten Medienkompositionen

Bezeichnung	Rezeptur
T	Pepton (1%), D-Glucose (1%); Hefeextrakt (0,1%), KH ₂ PO ₄ (0,05%), MgSO ₄ x 7H ₂ O (0,02%), FeSO ₄ x 7H ₂ O (0,01%), CuSO ₄ (0,0005%), Tyrosin (2,5%)
M	Malzextrakt (2%)
MLH	Malzextrakt (2%), Laubholzspäne (Buche, 100g/l)
MLH+C	Malzextrakt (2%), Laubholzspäne (Buche, 100g/l), CuSO ₄ (0,0005%)
MLHE	Malzextrakt (2%), Extrakt aus Laubholzspänen (Buche, 100g/l)
MLHE+C	Malzextrakt (2%), Extrakt aus Laubholzspänen (Buche, 100g/l), CuSO ₄ (0,0005%)
MNH	Malzextrakt (2%), Nadelholzspäne (Kiefer, 100g/l)
MNH+C	Malzextrakt (2%), Nadelholzspäne (Kiefer, 100g/l), CuSO ₄ (0,0005%)
MNHE	Malzextrakt (2%), Extrakt aus Nadelholzspänen (Kiefer, 100g/l)
MNHE+C	Malzextrakt (2%), Extrakt aus Nadelholzspänen (Kiefer, 100g/l), CuSO ₄ (0,0005%)

Vorkultur und Inokulum

In Bezug auf das Inokulum wurden verschiedene Faktoren hinsichtlich ihres potentiellen Einflusses auf die Melaninproduktion untersucht. Um zu testen, ob die Menge des Ausgangs-Inokulums relevant ist, wurden Kulturen von *A. cepistipes* und *A. ostoyae* vergleichsweise mit 3, 6 und 12 Agarpellets beimpft. In weiteren Ansätzen wurden Kulturen von *A. cepistipes*, *A. ostoyae* und *D. loculata* mit Flüssiginokulum (FI) beimpft, und im direkten Vergleich mit standardmässig inokulierten Kulturen getestet. Das Flüssiginokulum wurde aus Flüssigkulturen älterer und jüngerer Vorkulturen mit demselben Kulturmedium entnommen.

2.1.3 Einfluss physikalischer Parameter auf die Melaninproduktion

Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings wurden *A. cepistipes* und *A. ostoyae* für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. In mehreren Versuchsansätzen wurde der Einfluss der Faktoren Temperatur, pH-Wert und Rotationsgeschwindigkeit auf die Melaninproduktion beider Arten in tyrosinhaltigem Nährmedium getestet.

pH-Wert

Um zu testen, ob die Melaninsynthese durch Einstellen eines bestimmten pH-Wertes begünstigt werden kann, wurden je vier Kulturen mit *A. cepistipes* und *A. ostoyae* angesetzt und über einen Zeitraum von drei Wochen inkubiert. Die pH-Werte von je drei Kulturen wurden auf pH 4, pH 6 und pH 8 eingestellt, indem bei der Herstellung des Nährmediums (T) das Wasser durch entsprechende Pufferlösung (Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine) ersetzt wurde. Zusätzlich wurde je eine Vergleichskultur mit unverändertem Nährmedium T angesetzt, der pH-Wert liegt hier bei pH 6. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die pH-Werte im Kulturüberstand mittels pH-Meter gemessen.

Temperatur

Die Inkubation der Kulturen erfolgte standardmässig bei 26°C. Um einen möglichen Effekt der Temperatur auf die Melaninsynthese zu testen, wurde ein Ansatz mit Vergleichskulturen von *A. cepistipes* und *A. ostoyae* über einen Zeitraum von drei Wochen bei 22°C inkubiert.

Rotationsgeschwindigkeit

Die Inkubation der Kulturen erfolgte in Erlenmeyer-Kolben auf einem Rotationsschüttler bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 120rpm. Bei der Kultivierung von Pilzen in Flüssigkulturen ist das Schütteln notwendig, um eine ausreichende Durchmischung der Kultur und damit eine optimale Masse- und Temperaturverteilung sowie eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (Tang *et al.* 2007). Zugleich bedingt es jedoch auch die Entstehung von Scherkräften, die wiederum das Pilzwachstum beeinträchtigen können (Tang *et al.* 2007). Das Ausmass der Scherkräfte ergibt sich aus der Grösse der Kulturgefässe und der Rotationsgeschwindigkeit. Um einen möglichen Einfluss unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeiten auf die Melaninproduktion zu testen, wurde die Rotationsgeschwindigkeit in einem weiteren Versuchsansatz mit *A. cepistipes* und *A. ostoyae* auf 80rpm reduziert.

2.2 Charakterisierung des Melanins

2.2.1 Melaninextraktion & Biochemische Reaktionen

Melaninextraktion

Melanin wurde aus den Flüssigkulturen verschiedener *Armillaria* Arten, sowie aus Kulturen mit verschiedenen Ascomyceten extrahiert. Die Melaninextraktion erfolgte nach der von Zhang *et al.* (2006) beschriebenen Methodik. Hierfür wurde der Überstand aus den verschiedenen Flüssigkulturen durch Zugabe von 10 M NaOH auf pH 13 eingestellt und 15 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach Trennung der Biomasse vom melaninhaltigen Überstand erfolgte eine Entproteinierung durch Zugabe von Chloroform (0,2ml auf 100ml Kulturüberstand). Zur Ausfällung des Melanins wurde der pH-Wert durch Zugabe von 5M HCl auf pH 2 abgesenkt. Durch neuerliches Zentrifugieren (30 Minuten bei 4000 rpm) wurde das ausgefällte Melanin vom Überstand getrennt, anschliessend in zwei Schritten mit 100% Methanol und 70% Ethanol gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde an der Luft getrocknet.

Biochemische Reaktionen

Standardverfahren zur chemischen Charakterisierung von Melanin basieren auf dem Test verschiedener chemischer Reaktionen (Fava *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2006; Sajjan *et al.*, 2010). Geprüft wurden neben der Löslichkeit in Wasser und verschiedenen organischen und anorganischen Lösungen auch die Ausfällung aus alkalischer Lösung durch Zugabe von Salzsäure, die Bleichwirkung starker Oxidantien wie Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit, sowie die charakteristische Ausflockung polyphenolischer Verbindungen durch Zugabe von Eisen(III)-chlorid. Die Löslichkeit wurde durch Zugabe von je 0,01 g des extrahierten Pigments in 1 ml der jeweiligen Lösung getestet. Als Stammlösung für die weiteren Reaktionen wurden 0,02 g des extrahierten Pigments in 2 ml pH 13 Puffer (Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine) gelöst, die jeweiligen Mischungsverhältnisse von Stammlösung und Testsubstanz sind der tabellarischen Übersicht (Tab. 4) zu entnehmen.

Die für Melanine charakteristischen Reaktionen sind aus oben benannten Literaturquellen sowie internen Vorversuchen an der EMPA bekannt und können als Referenzen zur Beurteilung des extrahierten Pigments herangezogen werden.

Tabelle 4: Chemische Reaktionen zur Identifikation und Charakterisierung von Melanin

Test	Testsubstanz	Verhältnis Stammlösung/ Testsubstanz	Reaktion
Wasserlöslichkeit	H ₂ O _{dem}	-	nicht löslich
Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln	Ethanol	-	nicht löslich
	Chloroform	-	nicht löslich
	Aceton	-	nicht löslich
	NaOH (10M)	-	Löslich
Ausfällung aus alkalischer Lösung durch HCl	HCl (5M)	1:4 (200:800µl)	positiv (Ausfällung)
Reaktion mit Oxidantien	H ₂ O ₂	1:2 (200:400µl)	Entfärbung
	NaOCl	1:2 (200:400µl)	Entfärbung
Polyphenol Reaktion mit FeCl ₃	FeCl ₃	1:2 (200:400µl)	positiv (Ausflockung)

2.2.2 UV/VIS-Spektroskopie

Melanine weisen ein charakteristisches Absorptionsspektrum auf, dass zur ihrer Identifikation und Charakterisierung herangezogen werden kann (Bell & Wheeler, 1986). Der Grad der Absorption ist am höchsten im UV-Bereich und nimmt mit zunehmender Wellenlänge stetig ab. Dies manifestiert sich in einem markanten Absorptionspeak im Bereich zwischen 200 und 300 nm (Selvakumar *et al.*, 2008; Sajjan *et al.*, 2010). Die Abnahme der Absorption mit zunehmender Wellenlänge im sichtbaren Spektralbereich erfolgt nahezu linear (Bell & Wheeler, 1986). Im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 600 nm ergibt der Auftrag der log-transformierten Absorptionswerte gegen die entsprechenden Wellenlängen eine absteigende Gerade, die ebenfalls zur Identifikation von Melanin herangezogen wird (Selvakumar *et al.*, 2008; Sajjan *et al.*, 2010). Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren erfolgte für den Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm mittels Spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer). Dafür wurde die wie zuvor beschrieben hergestellte Stammlösung im Verhältnis 1:100 mit Pufferlösung (pH 13) verdünnt.

2.2.3 Fourier Transform Infrarot Spektroskopie (ATR-FTIR)

Neben dem UV/VIS Spektrum kann auch das Absorptionsverhalten im Infrarotbereich zur Identifikation und Charakterisierung von Melanin genutzt werden. Die Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie ist ein gängiges Verfahren zur strukturellen Analyse von Melaninen, das detaillierte Informationen über deren funktionelle Gruppen liefert (Sajjan *et al.*, 2010). Referenzen zur Interpretation der Spektren finden sich in verschiedenen Publikationen zur Charakterisierung von Melanin aus Pilzen und anderen Mikroorganismen (Zhang *et al.*, 2006; Selvakumar *et al.*, 2008; Sajjan *et al.*, 2010; Jalmi *et al.*, 2012).

Die Untersuchungen wurden mit einem ATR-FTIR Spektrometer (BioRad FTS 6000, Digilab) im Wellenzahlenbereich von 600 cm⁻¹ bis 4000 cm⁻¹ (single reflection diamond ATR mode, P/N 10.500 series, golden gate, 32 scans, 4 cm⁻¹ Auflösung) durchgeführt. Als Referenz zum direkten Vergleich wurde ein IR-Spektrum von Sepia Melanin (Sigma) herangezogen.

Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Spektren untereinander wurden diese entweder über den zu vergleichenden Bereich oder über den gesamten Bereich des Spektrums vektornormiert (Schubert *et al.*, 2012). Dazu wird ein Spektrum als Vektor angesehen, dessen Koordinaten durch die Datenpunkte im betrachteten Spektralbereich gebildet werden. Bei einer Vektornormierung wird jede Koordinate y_i (Absorptionswert) des Vektors durch seinen Betrag dividiert:

$$x_i = \frac{y_i}{\sqrt{\sum_{j=1}^n (y_j)^2}}$$

Damit ist die Summe der Quadrate aller normierten Funktionswerte x_i 1 (Euklidische Norm):

$$\sum_{i=1}^n (x_i)^2 = 1$$

2.3 Anwendung von Melanin im Holzschutz

In einem in Anlehnung an das Prüfverfahren für Holzschutzmittel nach EN 113 durchgeführten Versuch sollte die Eignung von Melanin für den Einsatz im Holzschutz getestet werden. Dafür wurden Holzprüfkörper aus Kiefern- und Buchenholz mit kupferbasierten Testschutzmitteln in unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen jeweils in den Varianten mit und ohne Melanin imprägniert und anschliessend einer viermonatigen Pilzexposition durch verschiedene holzerstörende Basidiomyceten ausgesetzt. Über den Vergleich der mittleren Masseverluste in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung (Konzentration von Kupfersulfat in den Varianten mit und ohne Melanin) sollte zum einen der potentielle Einfluss von Melanin auf das Wachstum und den Holzabbau durch die jeweiligen Prüfpilze untersucht werden. Zum anderen sollte getestet werden, ob in Ausnutzung der Fähigkeit von Melanin zur Kupferbindung die Grenzkonzentration der Wirksamkeit von Kupfersulfat verringert werden kann. In einem weiteren Teilversuch, bei dem ein Teil der Prüfkörper einer zusätzlichen Auswaschungsbehandlung unterzogen wurde, sollte zudem ein potentieller Effekt von Melanin auf die Bindung beziehungsweise Auswaschbarkeit von Kupfersulfat und somit auf die Dauerhaftigkeit der Schutzwirkung getestet werden. Das im Versuch verwendete Melanin wurde aus Flüssigkulturen mit *A. cepistipes* gewonnen.

2.3.1 Versuche nach EN 113

Die dem Versuch zugrunde liegende Methodik entspricht dem in der Europäischen Norm 113 beschriebenen Prüfverfahren zur Beurteilung der Wirksamkeit von Holzschutzmitteln gegenüber holzerstörenden Basidiomyceten. Das Verfahren ermöglicht das Ermitteln der Grenzkonzentration, ab der anfällige Holzarten nach der Tränkung mit dem betreffenden Schutzmittel unter definierten Versuchsbedingungen als ausreichend geschützt angesehen werden können. Die Kriterien für die Auswahl, sowie die Behandlung der zu verwendenden Holzprüfkörper, die Auswahl und Kultivierung der Prüfpilze, wie auch das Applikationsverfahren für die zu prüfenden Testsubstanzen, sind in der EN 113 genau festgelegt. Eine Übersicht über die verschiedenen Behandlungsvarianten, Versuchsaufbau und -bedingungen wird in den Tabellen 5-7 gegeben und im Folgenden erläutert.

Tabelle 5: Übersicht EN113 - Testschutzmittel und Versuchsbedingungen

Prüfmethode	EN 113		
Holzarten	Braunfäuleerreger: Weissfäuleerreger:	Kiefernspint Buche	(mittlere Rohdichte: 498,67 kg/m³) (mittlere Rohdichte: 667,73 kg/m³)
Prüfpilze	Braunfäuleerreger: Weissfäuleerreger:	Coniophora puteana (EMPA 62) Rhodonia placenta (EMPA 229) Gloeophyllum trabeum,(EMPA 100) Trametes versicolor (EMPA 159)	
Testschutzmittel	Variante 1: Variante 2:	Kupfersulfat (CuSO4 x 5 H2O) Kupfersulfat (CuSO4 x 5 H2O) Melanin	
Prüfkonzentrationen	Kupfersulfat: Melanin:	4.00 – 2.00 – 1.00 – 0.50 – 0.25 – 0.00 %G 0.2 g/l	
Lösungsmittel	Kupfersulfat: Melanin:	H2Odem Wässrige Lösung aus Kulturüberstand von A. cepistipes in Flüssigkultur	
Applikationsverfahren	Variante 1: Variante 2:	Volltränkung gemäss EN 113 Volltränkung gemäss EN 113 in 2 Schritten: 1. melaninhaltige wässrige Lösung 2. Kupfersulfatlösung	
Prüfzustand	Kiefer: Buche:	1. im Originalzustand 1. im Originalzustand 2. nach Auswaschungsbeanspruchung (nach EN 84)	
Anzahl Stichproben	4x pro Behandlungsgruppe		
Expositionsdauer	16 Wochen		
Inkubationsbedingunge	22 ± 1°C; 70 ± 5 % rel. Luftfeuchte		

Tabelle 6: EN113 – Übersicht Prüfkörper Braunfäuleerreger

	PE (e ₁)						SK (e ₃)	
Prüfpilz	<i>C. puteana</i> 62		<i>R. placenta</i> 229		<i>G. trabeum</i> 100		-	
CuSO ₄	-	+ M	-	+ M	-	+ M	-	+ M
4.00	1-4	25-28	49-52	73-76	97-100	121-124	145-148	169-172
2.00	5-8	29-32	53-56	77-80	101-104	125-128	149-152	173-176
1.00	9-12	33-36	57-60	81-84	105-108	129-132	153-156	177-180
0.50	13-16	37-40	61-64	85-88	109-112	133-136	157-160	181-184
0.25	17-20	41-44	65-68	89-92	113-116	137-140	161-164	185-188
0.00	21-24	45-48	69-72	93-96	117-120	141-144	165-168	189-192
VK (e _{2,2})	193-198		199-204		205-210			

Übersicht der Prüfkörper (Kiefernspint) für den Versuch mit verschiedenen Braunfäuleerregern nach Behandlungsgruppen (Konzentration CuSO₄ in %G in den Varianten mit und ohne Melanin (M)). e₁ = behandelte Prüfkörper mit Pilzexposition (PE); e_{2,2} = unbehandelte Kontrollprüfkörper zur Kontrolle der Virulenz (VK); e₃ = Sterilkontrollen (behandelte Prüfkörper zur Berechnung der Korrekturwerte (C) für den Masseverlust der behandelten Prüfkörper e₁).

Tabelle 7: EN113 – Übersicht Prüfkörper Weissfäuleerreger

	Originalzustand				Auswaschungsbeanspruchung			
	PE (e ₁)		SK (e ₃)		PE (e ₁)		SK (e ₃)	
Prüfpilz	<i>T. versicolor</i> 159		-		<i>T. versicolor</i> 159		-	
CuSO ₄	-	+ M	-	+ M	-	+ M	-	+ M
4.00	211-214	235-238	259-262	283-286	A211-214	A235-238	A259-262	A283-286
2.00	215-218	239-242	263-266	287-290	A215-218	A239-242	A263-266	A287-290
1.00	219-222	243-246	267-270	291-294	A219-222	A243-246	A267-270	A291-294
0.50	223-226	247-250	271-274	295-298	A223-226	A247-250	A271-274	A295-298
0.25	227-230	251-254	275-278	299-302	A227-230	A251-254	A275-278	A299-302
0.00	231-234	255-258	279-282	303-306	A231-234	A255-258	A279-282	A303-306
VK (e _{2,2})	207-312							

Übersicht der Prüfkörper (Buche) für den Versuch mit *T. versicolor* (WF) nach Behandlungsgruppen (Konzentration CuSO₄ in %G, Varianten mit und ohne Melanin (M), sowie mit und ohne Auswaschungsbeanspruchung). e₁ = behandelte Prüfkörper mit Pilzexposition (PE); e_{2,2} = unbehandelte Kontrollprüfkörper zur Kontrolle der Virulenz (VK); e₃ = Sterilkontrollen (behandelte Prüfkörper zur Berechnung der Korrekturwerte (C) für den Masseverlust der behandelten Prüfkörper e₁).

Prüfpilze

Obligatorische Prüfpilze nach EN 113 sind unabhängig von der Art des zu testenden Schutzmittels *Coniophora puteana* (Braunfäuleerreger, im Folgenden BF) und *Trametes versicolor* (Weissfäuleerreger, im Folgenden WF). Weitere obligatorische Pilze die unter Berücksichtigung des Testschutzmittels ausgewählt wurden sind *Rhodonía placenta* und *Gloeophyllum trabeum* (beide BF). Die Vorkultur der Prüfpilze erfolgte etwa einen Monat vor Versuchsbeginn auf MEA (Malzextrakt 4%, Agar 2,5%) bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und $70 \pm 5\%$ rel. Luftfeuchte in der Klimakammer.

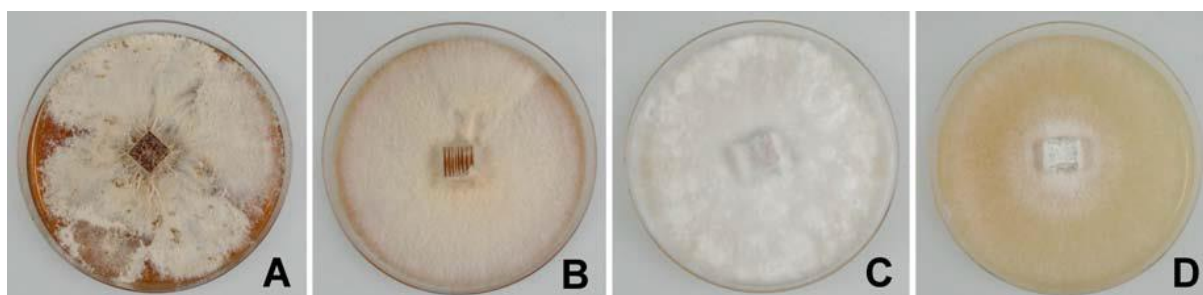


Abbildung 4: Vorkulturen der im EN113-Versuch eingesetzten Prüfpilze. **A:** *C. puteana* **B:** *G. trabeum* **C:** *R. placenta* **D:** *T. versicolor*.

Auswahl und Vorbereitung der Prüfkörper

Prüfholzarten nach EN 113 sind Kiefer (*Pinus sylvestris*) stellvertretend für Nadel- und Buche (*Fagus sylvatica*) stellvertretend für Laubhölzer. Die Auswahl der Holzarten erfolgte entsprechend der Prüfvorschrift in Abhängigkeit von den Prüfpilzen, für die BF-Pilze (*C. puteana*, *R. placenta* und *G. trabeum*) wurden Prüfkörper aus KiefernSplint, für *T. versicolor* (WF) aus Buchenholz verwendet. Bei der Auswahl der Prüfkörper aus Kiefernholz ist auf eine möglichst gleichmässige Jahrringbreite (2,5 – 8 Jahrringe je 10 mm) zu achten. Der Spätholzanteil darf einen Anteil von maximal 30 Prozent der Gesamtbreite jedes Jahrrings nicht überschreiten. Darüber hinaus müssen die Prüfkörper frei von Rissen, Verfärbungen oder Schäden jeglicher Art sein. Da für die Prüfung nach EN 113 ausschliesslich KiefernSplintholz zu verwenden ist, wurde an allen Prüfkörpern beidseitig Kern-Splint-Reagenz aufgetragen, wobei sich Kernholzanteile nach kurzer Einwirkzeit intensiv dunkel rot verfärben, während im Splintbereich lediglich eine orange Färbung eintritt. Auf diese Weise können Prüfkörper mit Kernholzanteil zuverlässig erkannt und ausgesondert werden.

Auch bei der Auswahl der Prüfkörper aus Buchenholz wurde auf eine gleichmässige Jahrringbreite mit 2 – 6 Jahrringen je 10 mm, sowie einen gleichmässigen Faserverlauf geachtet. Alle Prüfkörper waren frei von Thyllen, Verfärbungen und Rotkern.

Für jede Behandlungsgruppe wurden pro Prüfpilzart 4 Prüfkörper (e_1) für die Behandlung mit dem jeweiligen Schutzmittel, sowie 4 weitere als unbehandelte Kontrollprüfkörper ($e_{2.1}$) ausgewählt. Zusätzlich wurden je 6 unbehandelte Prüfkörper ($e_{2.2}$) zur Kontrolle der Virulenz dem Angriff des jeweiligen Prüfpilzes ausgesetzt. Pro Behandlungsgruppe wurden zusätzliche 4 Prüfkörper (e_3) ohne Pilzexposition einer ansonsten identischen Behandlung wie die behandelten Prüfkörper (e_1) unterzogen. Dafür wurden sie nach der Tränkung mit dem Schutzmittel und der anschliessenden Konditionierung für die Dauer der 16wöchigen Inkubationszeit in ein unbeimpftes Versuchsgefäß eingebracht. Über die Masseänderungen dieser Sterilkontrollen kann der Korrekturwert (C) für Masseänderungen der behandelten Prüfkörper (e_1) berechnet werden, die auf andere Einflüsse als Holzabbau durch den Pilz zurückzuführen sind. Zur Ermittlung des Volumens und späterer Berechnung der mittleren Rohdichte der Prüfkörper wurden diese der Länge, Breite und Höhe nach vermessen. Anschliessend wurden die nummerierten Prüfkörper im Trockenschrank bei 103°C über mindestens 20 Stunden darrgetrocknet, im Exsikkator auf Silikagel auf Zimmertemperatur abgekühlt und zur Bestimmung der Anfangstrockenmasse m_0 auf 0,01g genau gewogen. Zur Trockenhaltung wurden die Prüfkörper bis zur Schutzmittelapplikation im Exsikkator gelagert.

2.3.1.1 Vorbereitung und Applikation der Testschutzmittel

Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) wurde in einer Reihe abgestufter Konzentrationen (0.25 – 0.50 – 1.00 – 2.00 – 4.00 %G) in entionisiertem Wasser gelöst. Melaninhaltiger Kulturüberstand aus Flüssigkulturen von *A. cepistipes* wurde mit Glaswolle filtriert, mit entionisiertem Wasser auf die erforderliche Menge verdünnt und anschliessend autoklaviert. Der Melaningehalt des Kulturüberstands wurde photometrisch bestimmt und lag nach der Verdünnung bei etwa 0,2 g/l. Die Applikation des Schutzmittels erfolgte mithilfe einer Vakuumpumpe. Dafür wurden die Prüfkörper in zwei durch ein Metallsieb getrennten Lagen kreuzweise in 2000 ml Bechergläser eingebaut und mit Bleiwürfeln beschwert, um ein Aufschwimmen bei Zugabe der Flüssigkeit zu verhindern. Nach Zugabe der Holzschutzmittellösung wurden die Tränkgefäße in Vakuumgefäßen untergebracht und der Druck mithilfe der Vakuumpumpe für 20 Minuten auf 0,7 kPa verringert. Nach Aufhebung des Vakuums wurden die Prüfkörper für weitere zwei Stunden in der Holzschutzmittellösung belassen, anschließend entnommen, durch leichtes Abtupfen mit Filterpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreit und erneut gewogen, um die Masse m_1 zur Berechnung der Schutzmittelaufnahme zu ermitteln.

Die Schutzmittelapplikation für die Behandlungsgruppe mit Melanin wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das Holz mit der melaninhaltigen wässrigen Lösung, danach mit der Kupfersulfatlösung behandelt. Zwischen beiden Schritten wurden die Prüfkörper mindestens drei Tage lang bei 40°C im Trockenschrank getrocknet, um die neuerliche Schutzmittelaufnahme zu optimieren. Der pH-Wert der melaninhaltigen wässrigen Lösung wurde durch Zugabe von NaOH (10M) auf pH 10 eingestellt, um das enthaltene Melanin optimal in Lösung zu bringen und dadurch die Aufnahme ins Holz zu optimieren.

Trocknen und Konditionieren der Prüfkörper

Die Prüfkörper wurden nach Behandlungsgruppen und Schutzmittelkonzentrationen getrennt in flachen Schalen auf Glasbänkchen gelagert. Diese wurden nach Prüfvorschrift zunächst für zwei Wochen geschlossen gehalten, ab der dritten Woche halb und ab der vierten Woche ganz geöffnet. Um das Aufkommen von Schimmelpilzen zu vermeiden, wurde in jedes Gefäß eine kleine Schale mit Xylol eingebracht. Während der vierwöchigen Trocknungszeit wurden die Prüfkörper zweimal wöchentlich gewendet, um eine gleichmässige Trocknung zu gewährleisten.

2.3.1.2 Auswaschungsbeanspruchung nach EN 84

Eine zusätzliche Behandlungsgruppe der Buchenholzprüfkörper wurde vor der Pilzexposition durch *T. versicolor* einer Auswaschungsbeanspruchung nach EN 84 ausgesetzt. Die Auswaschung erfolgte nach der vierwöchigen Trocknung der Prüfkörper nach demselben Prinzip wie die Schutzmittelapplikation, mittels Vakuumpumpe und mit je 100ml H₂O dem. pro Prüfkörper. Nach der Auswaschung wurden die Prüfkörper für zwei Wochen im Wasser belassen, wobei das Wasser täglich gewechselt wurde. Nach der Wässerung wurden die Proben für zwei Wochen bei Zimmertemperatur getrocknet.

2.3.1.3 Pilzexposition

Die Inokulation der Versuchsgefäße (Kolleschalen) mit MEA erfolgte zwei Wochen vor Versuchsbeginn, um zu gewährleisten, dass sich die Pilze zum Zeitpunkt des Prüfkörpereinbaus noch in der aktiven Entwicklungsphase befinden, der Nährboden jedoch bereits vollständig mit Myzel überwachsen ist. Die Prüfkörper wurden vor Einbau in die Kolleschalen gassterilisiert. In jedes Versuchsgefäß wurde ein steriles Glasbänkchen als Unterlage für die Prüfkörper eingebracht, auf den je einen behandelten Prüfkörper (e₁)

und ein unbehandelter Kontrollprüfkörper ($e_{2.1}$) platziert wurden. Pro Prüfpilzart wurden 6 unbehandelte Kontrollprüfkörper ($e_{2.2}$) zur Kontrolle der Virulenz jeweils zu zweit in weitere Versuchsgefäße eingebaut. Die Sterilkontrollen (e_3) zur Berechnung des Korrekturwertes (C) für den Masseverlust der behandelten Prüfkörper (e_1) wurden ebenfalls paarweise in unbeimpfte Kolleschalen eingebracht. Der Agarnährboden in den Versuchsgefäßen für die Sterilkontrollen wurde mit 0,1% Carbendazin versetzt, um Kontaminationen durch Schimmelpilze oder Bakterien zu verhindern. Alle Arbeiten wurden an der Sterilbank durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 16 Wochen bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und $70 \pm 5 \%$ rel. Luftfeuchte in der Klimakammer.



Abbildung 5: A, B: Kolleflaschen mit Prüfkörpern des EN 113 Versuches in der Klimakammer. **C:** Prüfkörper aus Buchenholz zur Kontrolle der Virulenz von *T. versicolor* gegen Ende der 16wöchigen Inkubationszeit.

Auswertung der Ergebnisse

Nach Ende der 16wöchigen Pilzexposition wurden die Prüfkörper aus den Versuchsgefäßen entnommen, von anhaftendem Myzel gesäubert und zur Feststellung der Masse m_2 zur Bestimmung der Holzfeuchte gewogen. Zuvor wurde der prozentuale Deckungsgrad des Myzelbewuchses auf der Prüfkörperoberfläche notiert (0 = 0%; 1 = 0- 10%; 2 = 10-25%; 3 = 25-50%; 4 = >50%; 5 = 100%). Die gesäuberten Prüfkörper wurden eine Woche offen bei Zimmertemperatur und anschliessend etwa 20 Stunden im Ofen bei 103°C darretrocknet. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur im Exsikkator wurden die Endtrockenmasse m_3 durch neuerliches Wiegen festgestellt. Der Masseverlust jedes Prüfkörpers wird als Differenz der Anfangs- und Endtrockenmasse berechnet ($m_0 - m_3$). Der mittlere prozentuale Masseverlust der behandelten Kontrollprüfkörper e_3 (Sterilkontrollen) jeder Behandlungsgruppe dient als Korrekturwert C, der zur Berechnung des korrigierten prozentualen Masseverlustes der Prüfkörper e_1 benötigt wird.

Der Mindestmasseverlust für alle verwendeten Prüfpilze liegt bezogen auf die Versuchslaufzeit von 16 Wochen bei mindestens 20%. Für die Evaluation der Wirksamkeit des Schutzmittels in der jeweiligen Konzentration des Wirkstoffes, ist jeder behandelte Prüfkörper e_1 mit einem Masseverlust unter 3% auszusondern, wenn der Masseverlust des unbehandelten Kontrollprüfkörpers $e_{2,1}$ geringer ist als der in der Prüfvorschrift angegebene Mindestwert von 20%. Auszusondern sind auch Prüfkörper, die eine abnorme End-Feuchte (mehr als 80% oder weniger als 25%) oder Anzeichen von Kontaminationen durch Bakterien oder Schimmel aufweisen.

Für die Gültigkeit der Daten einer Prüfkonzentration und Pilzart müssen die Ergebnisse von mindestens drei behandelten Prüfkörpern auswertbar sein. Der Schutz durch das untersuchte Holzschutzmittel bei einer bestimmten Konzentration gilt als ausreichend, wenn der korrigierte mittlere Masseverlust der entsprechenden Prüfkörper weniger als 3,0% der Anfangstrockenmasse beträgt und höchstens ein Prüfkörper der entsprechenden Behandlungsgruppe einen Masseverlust erlitten hat, der mehr als 3,0%, aber weniger als 5,0% beträgt.

Die Grenze der Wirksamkeit des Schutzmittels wird ausgedrückt durch die niedrigste Konzentration, die sich nach den genannten Kriterien als ausreichend für den Schutz des Holzes erwiesen hat, sowie die nächstniedrigere der geprüften Konzentrationen, durch die kein ausreichender Schutz der Prüfkörper mehr gegeben war.

2.3.2 Effekt von Melanin auf das Wachstum holzerstörender Pilze

In Ergänzung zum EN 113 Versuch, wurde ein Wachstumsversuch mit den zuvor verwendeten Prüfpilzen *C. puteana*, *R. placenta*, *G. trabeum* und *T. versicolor* durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob das Wachstum der entsprechenden Pilze durch Zugabe von Melanin beeinflusst werden und so gegebenenfalls eine wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden kann.

Der Versuch erfolgte in zwei Varianten mit unterschiedlicher Melaninkonzentration des Nährmediums (MEA mit 2% Malzextrakt und 2% Agar von Merck). Die eine Variante enthielt 0,2g/l Melanin, was der Konzentration der im EN113-Versuch verwendeten Lösung entspricht. Die Melaninkonzentration der zweiten Variante war mit 2g/l 10fach höher.

Um das Melanin in Lösung zu bringen wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von NaOH (10M) auf 8,5 eingestellt. Der pH-Wert der Kontrollen mit MEA ohne Melanin wurde ebenfalls auf 8,5 eingestellt. Pro Pilz und Variante wurden je 5 Petrischalen beimpft. Dabei wurde je eine Vorkultur zum Beimpfen von je einer Platte jeder Variante (MEA + 2g/l Melanin, MEA + 0,2 g/l Melanin, Kontrolle mit MEA ohne Melanin) verwendet. Die Inkubation erfolgte in der Klimakammer bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$; 70 ± 5 % relativer Luftfeuchte über 20 Tage – das Pilzwachstum wurde dabei zweimal wöchentlich überprüft und fotografisch dokumentiert.

3. Ergebnisse & Diskussion

3.1 Melaninsynthese

Durch die wöchentlichen Messungen des Melaningehaltes in den verschiedenen Kulturen, war es möglich die Entwicklung der Produktion zu beurteilen und zu vergleichen. Da die Produktion in allen Kulturen zunächst gering war und nach der ersten Woche nur marginale Mengen Melanin nachweisbar waren (siehe Tabelle 8), wurden die Kulturen zur vorläufigen Beurteilung ihrer Eignung für die Melaninproduktion über einen Zeitraum von mindestens 21 Tagen inkubiert. Die Inkubationszeit wurde verlängert, wenn die Zunahme der Melaninmenge innerhalb der letzten Woche auf eine weiter steigende Produktion hindeutete.

Die Medienkomposition hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Melaninproduktion. In den Versuchen mit verschiedenen Nährmedien war eine geringe Melaninproduktion auch in den Flüssigkulturen ohne Tyrosin nachweisbar (DHN-Syntheseweg). Dennoch wurden die weitaus höchsten Melaninmengen mit dem tyrosinhaltigen Medium (T) erzeugt. Bei Vorhandensein von Tyrosin als Precursor, wird dieses via DOPA-Syntheseweg in DOPA-Melanin umgewandelt (Abb. 2). In Abbildung 6 ist am Beispiel von *A. cepistipes* die Abhängigkeit der Melaninmenge von dem verwendeten Medium dargestellt.

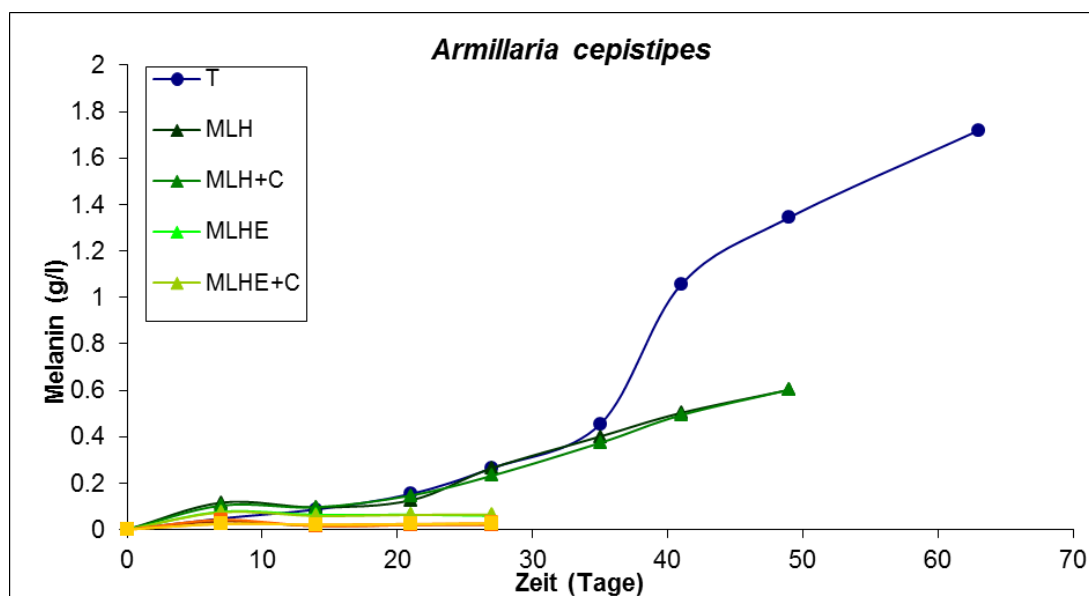


Abbildung 6: Melaninproduktion unter Verwendung diverser Nährmedien im Vergleich zum tyrosinhaltigen Nährmedium T. MLH/MNH = Malzextrakt+Laub-/Nadelholzspäne; MLHE/MNHE = Malzextrakt+Extrakt aus Laub-/Nadelholzspänen; +C = + Kupfersulfat

Im Rahmen mehrerer Versuchsansätze mit Kulturen von *A. cepistipes* und *A. ostoyae* wurde der Einfluss verschiedener chemischer und physikalischer Parameter auf die Melaninsynthese untersucht. Die getesteten Inkubationstemperaturen betrugen 22°C und 26°C. Die *Armillaria*-Arten synthetisierten jeweils höhere Melaninmengen bei der höheren Inkubationstemperatur von 26°C.

Neben der Inkubationstemperatur wurde auch der Einfluss verschiedener pH-Werte vom sauren bis in den alkalischen Bereich (pH4, pH6 und pH8) getestet. Das Optimum für die Melaninsynthese mit verschiedenen Bakterien liegt nach Angaben in verschiedenen Publikationen mit Werten zwischen pH7 und pH7.5 in der Regel im neutralen bis leicht alkalischen Bereich (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006; Sajjan *et al.*, 2010). Dagegen schildern Surwase *et al.* (2012) eine Zunahme der Melaninproduktion mit *Brevundimonas* sp. bei pH-Werten im sauren Bereich, was die Autoren primär darauf zurückführen, dass die Löslichkeit von Tyrosin, das als Precursor für die Melaninsynthese dient, mit zunehmenden pH-Werten im neutralen und alkalischen Bereich abnimmt. Im Gegensatz zu Bakterien sind die meisten Pilze auf ein eher saures Milieu spezialisiert – insofern war anzunehmen, dass niedrigere pH-Werte nicht nur der Löslichkeit des Tyrosins, sondern auch dem Pilzwachstum zugutekommen. Unter den hier getesteten Versuchsbedingungen konnte die Melaninsynthese durch Einstellen des pH-Wertes weder bei *A. ostoyae* noch bei *A. cepistipes* positiv beeinflusst werden – im Gegenteil fiel die Produktion in allen drei Testvarianten deutlich geringer aus, als in den jeweiligen Vergleichskulturen mit unverändertem pH-Wert. Mit pH 6 weist das verwendete Nährmedium T von sich aus einen leicht sauren pH-Wert auf, der durch die Pilze im Laufe der dreiwöchigen Inkubationszeit auf etwa pH5 abgesenkt wurde. Als dritter Einflussfaktor neben Temperatur und pH-Wert wurde der Einfluss unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeiten auf die Melaninsynthese durch *A. cepistipes* und *A. ostoyae* getestet. Die Inkubation auf dem Rotationsschüttler ist notwendig, um eine ausreichende Durchmischung der Flüssigkulturen und damit eine optimale Masse- und Temperaturverteilung sowie eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (Tang *et al.* 2007). Letztere beeinflusst neben Wachstum, Morphologie und Nährstoffaufnahme auch die Biosynthese von Sekundärmetaboliten.

Das Schütteln der Kulturen bedingt jedoch gleichzeitig die Entstehung von Scherkräften, was zu Verletzungen der Hyphen, morphologischen Veränderungen des Myzels und veränderten Wachstumsraten in Bezug auf die Produktion von sowohl Biomasse als auch Sekundärmetaboliten führen kann (Tang *et al.* 2007). Als Ausgangsgeschwindigkeit wurde zu Beginn der Untersuchungen eine Rotationsgeschwindigkeit von 120rpm gewählt, was den bei Jalmi *et al.* (2012)

angegebenen Kulturbedingungen für die Melaninproduktion mit *G. simplex* entspricht. Die Melaninproduktion von *A. cepistipes* und *A. ostoyae* fiel bei 120rpm deutlich höher aus als bei 80rpm inkubierten Vergleichskulturen. Potentiell negative Auswirkungen verstärkter Scherkräfte scheinen hier durch die gleichzeitige Verbesserung der Sauerstoffversorgung und Durchmischung der Kultur kompensiert zu werden.

Neben der Medienkomposition und den physikalischen Kulturbedingungen spielt auch die verwendete Pilzart eine grosse Rolle in der Melaninsynthese. Im Rahmen des Screenings mit verschiedenen, sowohl phylogenetisch als auch ökologisch diversen Pilzarten, erwiesen sich verschiedene *Armillaria* Arten als die potentesten Kandidaten für die Melaninproduktion in Flüssigkultur mit tyrosinhaltigem Nährmedium bei 26°C und 120rpm (ohne pH-Einstellung). Die Ergebnisse des Screening sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Im Zuge wiederholter Versuchsansätze wurden teils starke Schwankungen der Produktionsleistung gleicher Kulturen trotz identischer Kulturbedingungen festgestellt. Die Ursachen hierfür sind unklar, allerdings deuten die hier gemachten Beobachtungen darauf hin, dass das Alter der Vorkulturen ein wesentlicher Einflussfaktor sein könnte, was bei künftigen Versuchsansätzen berücksichtigt werden sollte.

Tabelle 8: Übersicht – Ergebnisse Melaninsynthese

Art	Melaningehalt (g/l) nach 7 Tagen	Melaningehalt (g/l) nach 21 Tagen	max. Melaningehalt (g/l), (Inkubation (Tage))
<i>Alternaria alternata</i>	0,087	0,228	0,228 (28)
<i>Armillaria borealis</i>	0,061	0,870	11,584 (97)
<i>Armillaria cepistipes</i>	0,048	1,218	27,984 (161)
<i>Armillaria gallica</i>	0,055	0,211	0,591 (49)
<i>Armillaria ostoyae</i>	0,131	0,957	24,802 (153)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,043	0,066	0,190 (73)
<i>Daldinia concentrica</i>	0,174	0,106	1,781 (73)
<i>Daldinia fissa</i>	0,039	0,121	0,180 (42)
<i>Daldinia loculata</i>	0,028	0,577	0,833 (34)
<i>G. simplex</i> 249.91	0,037	0,433	0,602 (81)
<i>G. simplex</i> 511.81	0,080	0,660	1,157 (45)
<i>Inonotus obliquus</i>	0,023	0,053	0,053 (21)
<i>Phialocephala fortunei</i>	0,003	0,024	0,024 (21)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	0,036	0,040	0,072 (73)
<i>Xylaria longipes</i>	0,004	0,198	0,322 (56)
<i>Xylaria polymorpha</i>	0,027	0,171	0,387 (34)

Innerhalb des Inkubations-Zeitraums von 153-161 Tagen konnten maximale Melaninmengen von knapp 28 g/l mit *A. cepistipes* und 25 g/l mit *A. ostoyae* erreicht werden. Im Durchschnitt ergibt sich daraus eine wöchentliche Produktion von 1,22 bzw. 1,09 g/l.

Die eingesetzte Menge Tyrosin (25g/l) konnte in den entsprechenden Kulturen somit vollständig in Melanin umgewandelt werden. Bei verschiedenen holzabbauenden Pilzen erfolgt der extrazelluläre Abbau pflanzlicher Phenole mithilfe von Laccasen und Tyrosinasen, oft in Kombination mit weiteren Enzymen. Dieselben Enzyme katalysieren die Oxidation und Umwandlung der phenolischen Metabolite in neue Polymere, darunter auch Melanine (Bell & Wheeler, 1986). *Armillaria*-Arten sind bekannt grosse Mengen an extrazelluläre Laccasen und vor allem Tyrosinasen zu bilden.

Jalmi *et al.* (2012) erreichten mit einem Stamm von *G. simplex* eine maximale Ausbeute von 6,6 g/l – nach Angaben der Autoren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der maximale Wert, der für einen genetisch nicht modifizierten Organismus bis dato veröffentlicht wurde. Die von Jalmi *et al.* (2012) publizierte maximale Menge von 6,6 g/l konnte hier in den Versuchen mit *Armillaria* um ein Mehrfaches übertroffen werden – allerdings bei einer Inkubationszeit von insgesamt 23 Wochen. Umgerechnet ergibt sich daraus eine wöchentliche Produktion von gut 1,2 g/l Melanin (*A. cepistipes*), was weniger als 20% der von Jalmi *et al.* (2012) mit *G. simplex* erzielten Menge entspricht, die nach einer Inkubationszeit von lediglich 6 Tagen erreicht wurde.

Positiv zu bewerten ist dagegen die vollständige Umsetzung des als Precursor eingesetzten Tyrosins. In den Versuchen mit *G. simplex* wurden Nährmedien derselben Zusammensetzung verwendet, wobei die produzierte Menge Melanin lediglich 25% der eingesetzten Menge Tyrosin entsprach. Da der Einsatz von Tyrosin einen wesentlichen Kostenfaktor bei der Melaninproduktion darstellt, ist eine möglichst vollständige Umsetzung im Sinne der Wirtschaftlichkeit erstrebenswert.

3.2 Charakterisierung des Melanins

Die Melaninextraktion erfolgte aus Kulturen von *A. cepistipes*, *A. borealis*, *A. ostoyae*, zwei Stämmen von *G. simplex*, *X. polymorpha* und *D. concentrica*. Bei den tyrosinhaltigen Kulturen kam es im zweiten Schritt der Extraktion unter Zugabe von Salzsäure zur Ausfällung von schwarz gefärbtem Pigment, das sich in Form einzelner Partikel als kleiige Masse am Grund des Zentrifugenbehälters absetzte (Abb. 7).

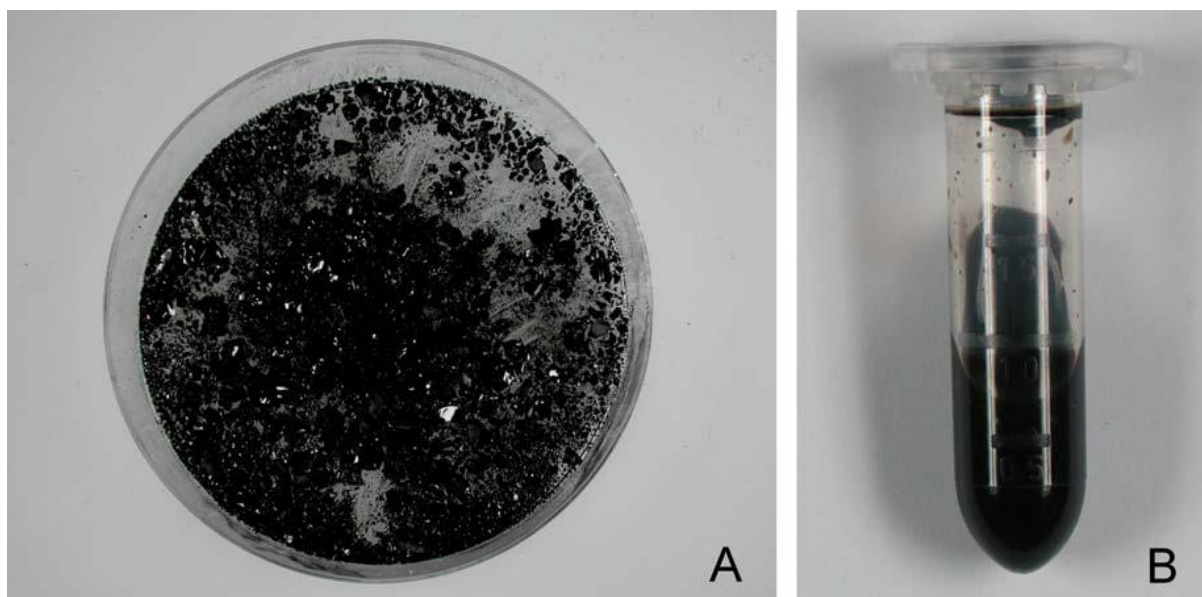


Abbildung 7: **A:** Extraktionsprodukt aus Flüssigkultur mit *A. cepistipes*. **B:** Stammlösung für die chemische Charakterisierung mit 0,2 g des extrahierten Pigments in 2 ml Pufferlösung (pH 13).

Die Proben aus sämtlichen Kulturen verhielten sich bei den folgenden Reaktionstests entsprechend der chemischen Eigenschaften von Melanin. Das Pigment war unlöslich in Wasser, Ethanol, Chloroform und Aceton – löslich hingegen in NaOH.

Bei Zugabe von HCl zur melaninhaltigen Stammlösung kam es in allen Fällen zu einer Ausfällung des Pigmentes. Die Zugabe starker Oxidantien (H_2O_2 und NaOCl_3) führte zu einer Entfärbung der Lösung, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben aus *Armillaria*- und den verschiedenen Ascomyceten-Kulturen festzustellen war. Die Reaktion mit H_2O_2 erfolgte bei Melanin aus Ascomyceten sehr schnell und unter starker Schaumbildung – bei Melanin aus *Armillaria* erfolgte eine sichtbare Entfärbung erst nach mehreren Stunden, was auf eine höhere Resistenz hindeutet. Ein weiterer Unterschied zwischen Melanin aus *Armillaria* und Melanin aus den verschiedenen Ascomyceten zeigte sich bei Zugabe von Chloroform, bei der das *Armillaria*-Melanin sich am Grund des Behälters absetzte, während das Ascomyceten-

Melanin offenbar eine geringere Dichte aufwies und sich daher an der Oberfläche der Flüssigkeit absetzte.

Bei Zugabe von FeCl_3 kam es bei allen Proben zur charakteristischen bräunlichen Ausfällung (Polyphenolreaktion). Insgesamt stützen die Ergebnisse der Reaktionstests bei allen Proben die Identifikation des extrahierten Pigmentes als Melanin.

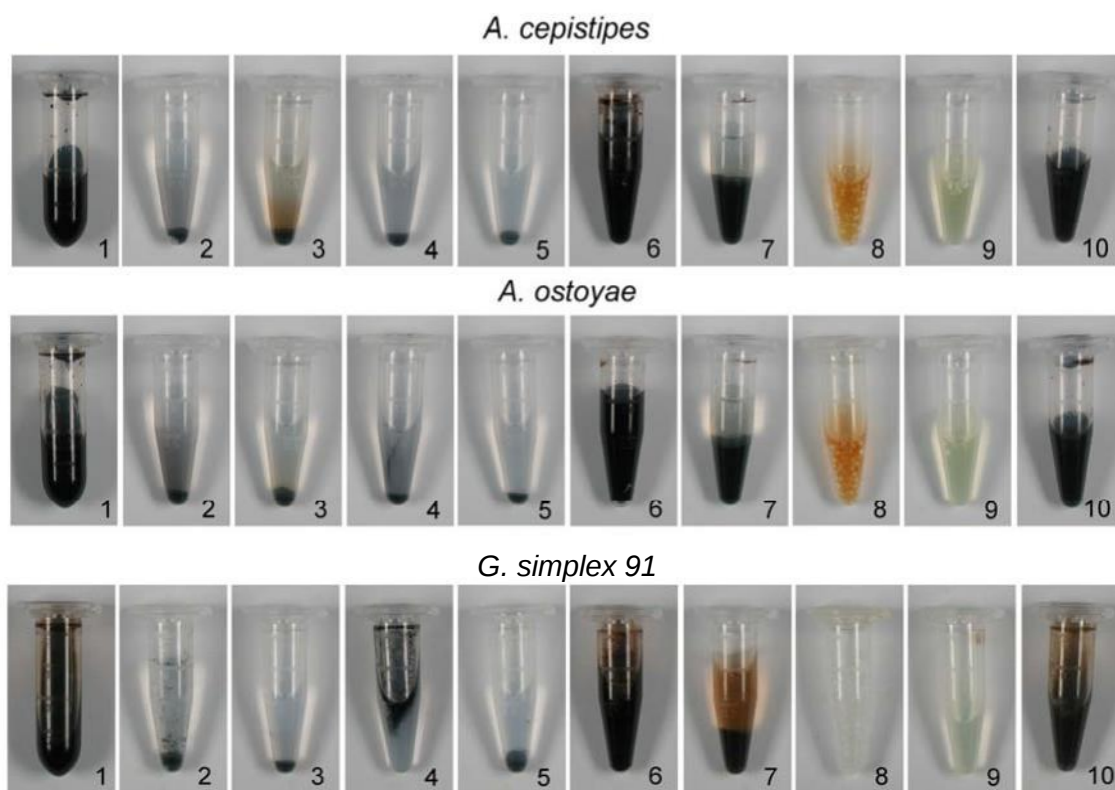


Abbildung 8: Chemische Reaktionen zur Charakterisierung von Melanin. 1 = Stammlösung, 2 = Wasser, 3 = Ethanol, 4 = Chloroform, 5 = Aceton, 6 = NaOH, 7 = HCl, 8 = H_2O_2 , 9 = NaOCl_3 , 10 = FeCl_3

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren aller Proben zeigen die für Melanine typischen Absorptionsgrade mit deutlichem Peak im UV-Bereich zwischen 200 und 300nm und linear abnehmenden Absorptionswerten mit zunehmender Wellenlänge. Der Auftrag der log-transformierten Absorptionswerte gegen die Wellenlänge zeigt die charakteristische absteigende Gerade (Abb. 9). Diese können sich in Bezug auf den Neigungswinkel unterscheiden, was jedoch keine Rückschlüsse auf strukturelle Unterschiede zwischen Melaninen aus unterschiedlichen Pilzkulturen erlaubt, da auch die Oxidation von Melaninen den genauen Verlauf des Absorptionsspektrums beeinflusst. Die Unterschiede der Absorptionsspektren von Melanin aus ein und derselben Pilzart können daher je nach Grad der Oxidation ebenso gross sein wie die

Unterschiede zwischen Melaninen unterschiedlicher Organismen (Bell & Wheeler, 1986; Fava *et al.*, 1993).

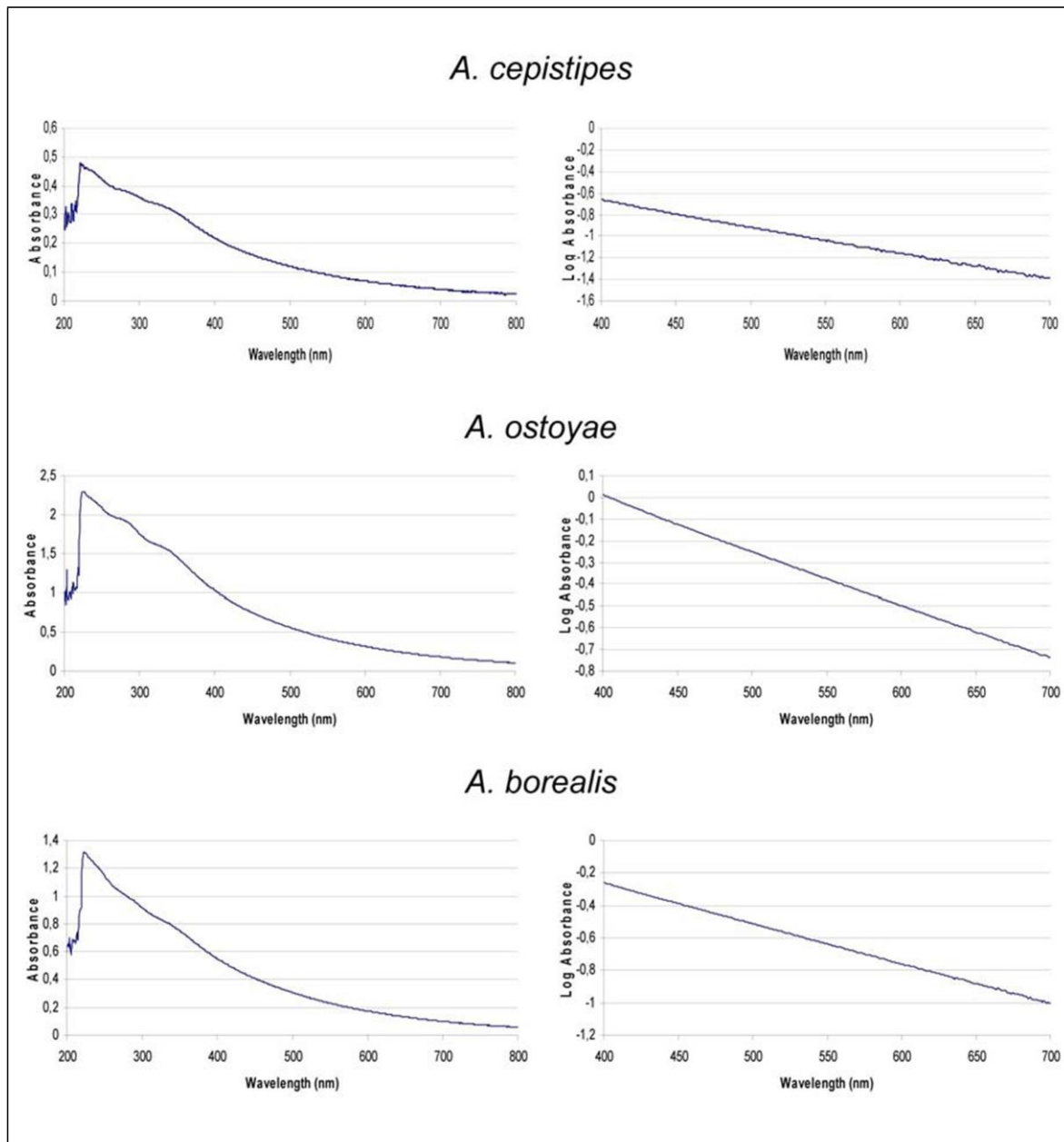


Abbildung 9: UV/VIS-Spektren von *Armillaria*-Arten

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (ATR-FTIR)

Im Vergleich mit dem Referenzspektrum von Sepia-Melanin von Sigma Aldrich zeigt sich ein hoher Grad an Ähnlichkeit mit Peaks in denselben Wellenzahlbereichen (Abb. 10). Geringfügige Abweichungen können sowohl durch die strukturelle Heterogenität von Melaninen im Allgemeinen als auch durch Unreinheiten des extrahierten Pigmentes bedingt sein.

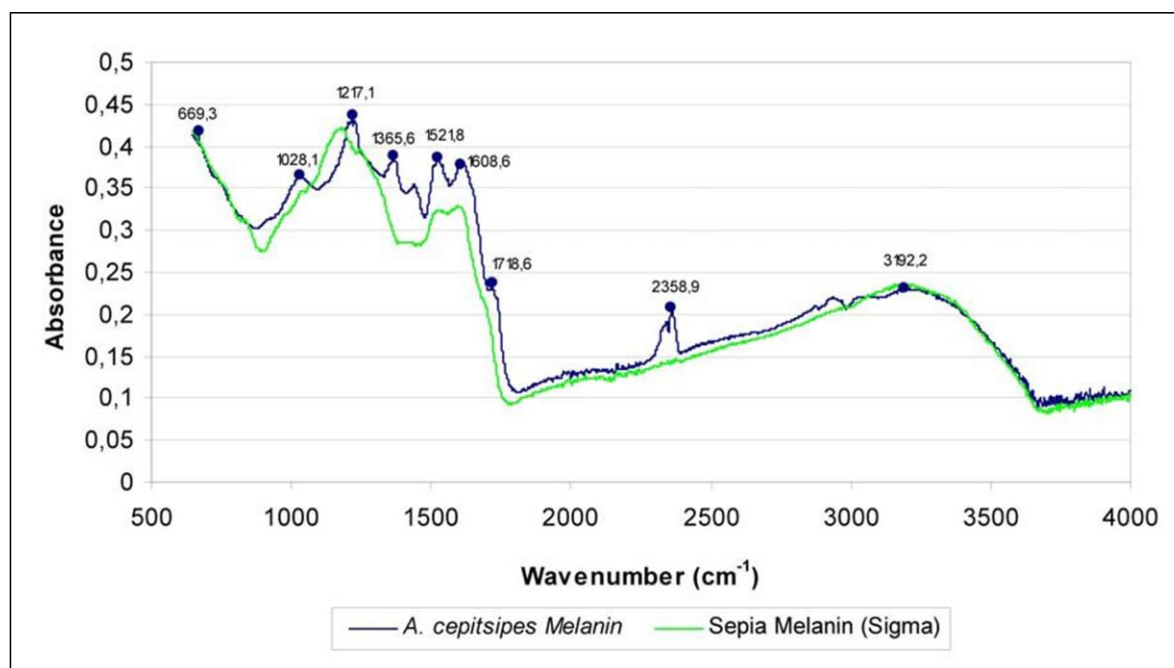


Abbildung 10: FTIR-Spektroskopie. Vergleich der Spektren von Sepiamelanin (Sigma Aldrich) und Melanin aus Flüssigkultur mit *A. cepistipes*.

Die starken Absorptionsbanden im Bereich um 3200 cm^{-1} korrelieren mit den Angaben von (Zhang *et al.*, 2006; Selvakumar *et al.*, 2008; Sajjan *et al.*, 2010; Jalmi *et al.*, 2012) und werden dort jeweils -OH und/oder -NH -Streckschwingungen zugeordnet.

Die Absorptionsbanden im Bereich um 1700 cm^{-1} können den Carbonyl- und Carboxylgruppen (C=O - und -COOH -Streckschwingungen) zugeordnet werden. Die starken Banden im Bereich von 1500 und 1600 sind für die C=C -Streckschwingungen der aromatischen Ringe verantwortlich, während die Bande bei 1028 cm^{-1} nach Selvakumar *et al.* (2008) auf C-H -Streckschwingungen der Aromaten zurückzuführen sind.

3.3 Anwendung von Pilzmelanin im Holzschutz

3.3.1 Auswertung Versuch EN 113

Gültigkeit der Ergebnisse

Der mittlere Masseverlust der Prüfkörper $e_{2,2}$ zur Kontrolle der Virulenz lag bei allen Prüfpilzen über dem Mindestwert von 20%, womit eine wesentliche Voraussetzung für die Gültigkeit der Ergebnisse erfüllt ist. Bei den Virulenzkontrollen für *G. trabeum* wurde der Mindestwert zwar im Mittel, jedoch nur für einen von jeweils zwei Prüfkörpern in jeder Kolleflasche erreicht, was bei der Interpretation der Ergebnisse kritisch berücksichtigt werden sollte.

Tabelle 9: Ergebnisse der Virulenzkontrollen

<i>R. placenta</i> 229			<i>T. versicolor</i> 159		
PK Nr	MV(%)	Pilzbewuchs	PK Nr	MV(%)	Pilzbewuchs
199	43,09	5	307	30,13	3
200	39,58	5	308	28,68	4
201	28,88	5	309	16,30	4
202	24,75	5	310	24,90	5
203	18,90	5	311	23,76	4
204	30,22	5	312	26,91	3
Mittelwert	30,90		Mittelwert	25,11	

<i>G. trabeum</i> 100			<i>C. puteana</i> 62		
PK Nr	MV(%)	Pilzbewuchs	PK Nr	MV(%)	Pilzbewuchs
205	2,87	0	193	47,46	5
206	41,50	5	194	42,58	5
207	2,37	0	195	36,18	5
208	39,90	5	196	45,55	5
209	15,00	2	197	35,34	5
210	46,56	4	198	43,26	5
Mittelwert	24,70		Mittelwert	41,73	

Masseverluste der Prüfkörper $e_{2,2}$ zur Kontrolle der Virulenz der verwendeten Prüfpilze. Im Mittel wurde der erforderliche Mindestwert von 20% bei allen Prüfpilzen erreicht.

Bei allen Prüfpilzen mussten einzelne Prüfkörper ausgesondert werden, da der Masseverlust des unbehandelten Kontrollprüfkörpers unter dem erforderlichen Mindestwert von 20% lag. Die Daten der entsprechenden Prüfkörper sind in den

Ergebnistabellen aufgeführt (kursiv gedruckt und grau hervorgehoben), wurden jedoch bei der Berechnung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Auf die Beurteilung der Grenzen der Wirksamkeit des Schutzmittels hat dies jedoch keinen Einfluss, da die erforderliche Anzahl gültiger Parallelprüfkörper in der jeweils niedrigsten Konzentration mit ausreichender Schutzwirkung in allen Fällen erreicht wurde.

Auswertung Grenzen der Wirksamkeit

Neben der direkten Wirkung von Melanin auf das Wachstum holzerstörender Basidiomyceten, sollte im vorgestellten Versuch nach EN113 auch der Einfluss von Melanin auf die Grenzen der Wirksamkeit von Kupfersulfat getestet werden. Eine Vielzahl funktioneller Gruppen befähigt Melanine zur Biosorption bzw. Bindung verschiedener Metall-Ionen.

Mittels UV/VIS Spektroskopie wurde die Interaktion zwischen dem produzierten pilzlichen Melanin und verschiedenen Kupfersulfat Konzentrationen analysiert. In Kombination mit Melanin kommt es zu einer deutlichen Erhöhung und Verschiebung der Kupfersulfat-Spektren (Abb. 11). Dies ist ein Indikator für eine chemische Reaktion zwischen Melanin und Kupfersulfat, welche zu einem Melanin-Kupfersulfat Komplex geführt haben könnte.

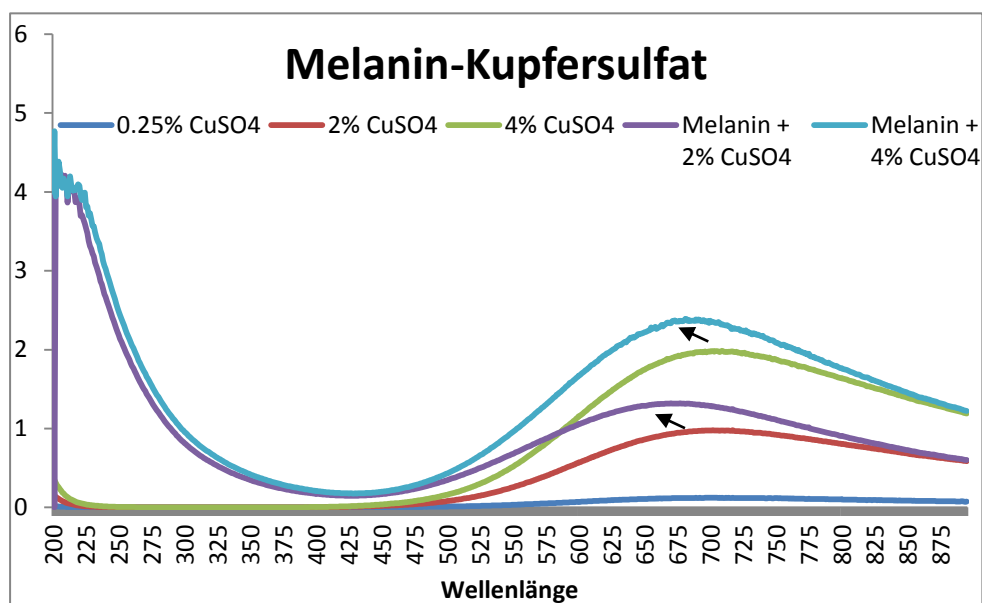


Abbildung 11: Analyse der Interaktionen zwischen Melanin und Kupfersulfat mittels UV/VIS Spektroskopie

Allerdings konnten die Grenzen der Wirksamkeit von Kupfersulfat gegen holzerstörende Basidiomyceten durch Zugabe von Melanin nach der hier angewandten Methode nicht positiv beeinflusst werden. Die Ergebnisse des Versuches sind in der Tabelle 10 zusammengefasst, detaillierte Ergebnistabellen für die einzelnen Prüfpilze und Behandlungen folgen mit den Tabellen 11 bis 20.

Tabelle 10: Einfluss von Melanin auf den mittleren Masseverluste Holzart ?(%)

Prüfpilz	<i>C. puteana</i> 62		<i>R. placenta</i> 229		<i>G. trabeum</i> 100	
Prüfzustand	Original		Original		Original	
Prüf-Konzentration	CuSO ₄	CuSO ₄ +Melanin	CuSO ₄	CuSO ₄ +Melanin	CuSO ₄	CuSO ₄ +Melanin
4,00	0,73	0,55	0,35	0,68	0,31	0,49
2,00	0,00	0,55	0,70	1,49	0,00	0,30
1,00	0,05	0,78	0,74	11,91	0,21	0,17
0,50	4,58	30,14	12,94	17,15	0,00	0,11
0,25	31,64	34,74	23,33	17,42	0,00	0,34
0,00	49,38	46,89	13,47	22,95	31,29	1,69

Prüfpilz	<i>T. versicolor</i> 159		<i>T. versicolor</i> 159	
Prüfzustand	Original		Nach Auswaschungsbeanspruchung	
Prüf-Konzentration	CuSO ₄	CuSO ₄ +Melanin	CuSO ₄	CuSO ₄ +Melanin
4,00	0,91	1,87	0,12	0,22
2,00	0,44	0,58	0,08	0,14
1,00	0,03	0,21	0,27	0,12
0,50	0,05	0,10	0,03	0,32
0,25	0,21	1,03	0,26	0,33
0,00	19,88	35,77	7,50	17,10

Zusammenfassung der Ergebnisse des EN113-Versuches: mittlere korrigierte Masseverluste (%) durch Pilzexposition mit den verschiedenen Prüfpilzen in Abhängigkeit von Behandlung und Schutzmittelkonzentration im Vergleich.

Für *C. puteana* lag die Grenze der Wirksamkeit sowohl in der Variante mit, als auch in der Variante ohne Melanin zwischen 0,50 und 1,00% CuSO₄. Bei *R. placenta* lag die Grenze der Wirksamkeit in der Variante mit Melanin um eine Konzentrationsstufe höher als in der Behandlungsgruppe ohne Melanin. Nur bei *G. trabeum* sprechen die Ergebnisse für eine leichte pilzhemmende Wirkung von Melanin auch ohne Zugabe von Kupfersulfat. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses sollte jedoch das Ergebnis der Virulenzkontrollen für *G. trabeum* berücksichtigt werden, bei denen 3 von 6 Prüfkörpern (je einer in jedem der drei Versuchsgefäße) nach der Pilzexposition ebenfalls nur geringfügige Masseverluste aufwiesen. Für *T. versicolor* konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen mit und ohne Melanin festgestellt werden, weder bei den Prüfkörpern im Originalzustand, noch nach Auswaschungsbeanspruchung. In allen Varianten konnte der Holzabbau durch den Pilz bereits mit der niedrigsten Konzentration an Kupfersulfat unterdrückt werden. Melanin allein erwies sich dagegen als wirkungslos, was ebenfalls durch die Ergebnisse der Untersuchungen zum Effekt von Melanin auf das Wachstum holzerstörender Pilze bestätigt wurde (Siehe Kapitel 3.3.2).

Tabelle 11: Ergebnisse *C. puteana* – Behandlung mit CuSO_4

Behandlung								Kontrolle	
Schutzmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme		Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
		Lösungsmittel g/PK	CuSO_4 kg/m ³						
4,00	1	13,67	29,24	-2,51	-3,45	0,94	0	41,62	5
	2	14,86	31,63	-2,99		0,46	2	42,60	5
	3	14,89	31,78	-3,21		0,24	0	39,00	5
	4	13,22	28,96	-2,18		1,27	0	41,44	5
	Mittelwert	14,16	30,40	-2,72		0,73		41,17	
2,00	5	14,97	15,78	-1,89	-1,29	0,00	0	50,21	5
	6	14,91	15,61	-1,86		0,00	0	63,08	5
	7	14,17	15,13	-1,48		0,00	2	50,74	5
	8	13,75	14,48	-1,27		0,02	0	0,99	4
	Mittelwert	14,68	15,51	-1,74		0,00		54,68	
1,00	9	13,27	7,17	-0,51	-0,58	0,07	1	55,77	5
	10	14,22	7,44	-0,52		0,06	4	58,54	5
	11	13,97	7,56	-0,56		0,02	0	52,57	5
	12	14,73	7,73	-0,69		0,00	0	3,86	4
	Mittelwert	13,82	7,39	-0,53		0,05		55,63	
0,50	13	14,29	3,84	-0,23	0,11	0,00	0	51,88	5
	14	14,07	3,73	0,77		0,66	4	51,64	5
	15	14,83	3,91	17,76		17,65	5	4,99	1
	16	13,37	3,62	-0,10		0,00	2	48,09	5
	Mittelwert	14,14	3,78	4,55		4,58		39,15	
0,25	17	13,47	1,83	37,82	0,60	37,21	5	1,28	1
	18	13,34	1,80	32,78		32,18	5	45,21	5
	19	14,42	1,91	56,05		55,44	5	1,73	5
	20	14,05	1,84	2,34		1,74	4	43,74	5
	Mittelwert	13,82	1,85	32,25		31,64		22,99	
0,00	21	14,33	0,00	51,55	0,33	51,22	5	49,72	5
	22	14,22	0,00	54,67		54,34	5	49,19	5
	23	13,48	0,00	45,03		44,71	5	44,14	5
	24	12,87	0,00	47,60		47,27	5	49,17	5
	Mittelwert	13,73	0,00	49,71		49,38		48,05	

Tabelle 12: Ergebnisse *C. puteana* – Behandlung mit CuSO₄ und Melanin.

Behandlung										Kontrolle	
Schutzmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme		Aufnahme		Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
		Lösungsmittel g/PK	CuSO ₄ kg/m ³	Lösungsmittel g/PK	Melanin g/m ³						
4,00	25	14,85	32,71	13,97	153,87	-4,15	-4,09	0,00	1	39,77	5
	26	13,58	29,47	11,53	125,09	-2,57		1,52	0	41,06	5
	27	14,28	31,12	12,82	139,70	-4,50		0,00	0	43,47	5
	28	13,42	29,37	12,52	137,02	-3,43		0,66	4	40,41	5
	Mittelwert	14,03	30,67	12,71	138,92	-3,66		0,55		41,18	
2,00	29	13,79	14,84	13,29	143,04	-2,02	-2,10	0,08	1	4,74	5
	30	13,81	15,17	13,31	146,25	-1,98		0,12	4	53,62	5
	31	13,18	14,19	12,32	132,63	-1,32		0,78	2	55,99	4 - 5
	32	13,33	14,65	12,39	136,19	-1,37		0,73	3	55,86	4 - 5
	Mittelwert	13,44	14,67	12,67	138,36	-1,55		0,55		55,16	
1	33	13,42	7,26	12,85	138,97	-0,10	-1,33	1,22	5	53,62	5
	34	13,61	7,35	13,04	140,84	-1,24		0,09	1	55,99	5
	35	13,32	7,44	12,75	142,39	-0,55		0,78	4	55,86	5
	36	13,12	7,30	12,56	139,79	-0,31		1,02	4	39,73	5
	Mittelwert	13,37	7,34	12,80	140,50	-0,55		0,78		51,30	
0,50	37	13,23	3,61	13,33	145,67	35,92	-0,57	36,49	5	52,31	5
	38	13,03	3,64	13,00	145,12	29,62		30,19	5	40,66	5
	39	13,45	3,66	13,43	146,20	28,56		29,13	5	38,03	5
	40	13,09	3,56	12,90	140,14	24,17		24,74	5	41,16	5
	Mittelwert	13,20	3,62	13,17	144,28	29,57		30,14		43,04	
0,25	41	12,63	1,71	12,71	137,81	28,54	-0,52	29,07	5	35,92	5
	42	14,28	1,89	13,85	146,44	30,25		30,78	5	56,66	5
	43	13,85	1,88	13,47	146,04	40,39		40,91	5	50,45	5
	44	12,88	1,74	12,13	130,76	37,66		38,19	5	40,00	5
	Mittelwert	13,41	1,80	13,04	140,26	34,21		34,74		45,76	
0,00	45	0,00	0,00	12,79	138,21	47,95	-0,58	48,53	5	44,04	5
	46	0,00	0,00	12,54	134,78	52,49		53,07	5	47,05	5
	47	0,00	0,00	12,93	141,40	46,55		47,13	5	52,88	5
	48	0,00	0,00	11,04	124,19	38,25		38,83	5	55,12	5
	Mittelwert	0,00	0,00	12,33	134,65	46,31		46,89		49,77	

Tabelle 13: Ergebnisse *R. placenta* – Behandlung mit CuSO_4

Behandlung								Kontrolle	
Schuttmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme		Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
		Lösungsmittel g/PK	CuSO_4 kg/m ³						
4,00	49	14,34	30,37	-3,53	-3,45	0,00	0	0,81	0
	50	13,80	29,78	-3,20		0,25	0	0,00	0
	51	13,94	29,21	-3,10		0,35	0	54,76	4
	52	14,44	30,69	-3,56		0,00	0	0,00	0
	Mittelwert	13,94	29,21	-3,10		0,35		54,76	
2,00	53	13,61	14,58	-1,04	-1,29	0,25	0	59,20	5
	54	14,68	15,32	-1,32		0,00	0	1,71	3
	55	13,38	14,22	0,00		1,29	0	44,44	5
	56	14,97	15,73	-0,73		0,56	1	43,64	5
	Mittelwert	14,84	61,19	-0,59		0,70		49,10	
1,00	57	15,15	7,83	0,25	-0,58	0,84	4	52,41	5
	58	14,45	7,46	1,48		2,06	4	48,65	5
	59	13,98	7,37	-0,51		0,08	0	38,93	4
	60	14,52	7,66	-0,72		0,00	0	40,00	5
	Mittelwert	14,53	7,58	0,13		0,74		45,00	
0,50	61	14,09	3,69	23,01	0,11	22,89	5	53,32	5
	62	14,02	3,71	-0,12		0,00	0	54,64	5
	63	14,55	3,77	1,53		1,42	0	0,55	0
	64	13,90	3,67	16,04		15,93	5	50,05	5
	Mittelwert	14,00	3,69	12,98		12,94		52,67	
0,25	65	13,10	1,74	27,26	0,60	26,66	5	35,63	4
	66	14,18	1,89	25,00		24,40	5	39,77	5
	67	14,39	1,92	21,97		21,37	5	26,06	5
	68	15,15	1,95	21,52		20,91	5	39,04	5
	Mittelwert	14,21	1,87	23,94		23,33		35,12	
0,00	69	14,11	0,00	27,93	0,33	27,61	5	26,98	5
	70	13,82	0,00	0,46		0,13	0	35,79	3
	71	13,01	0,00	26,00		25,67	4	29,30	4
	72	14,04	0,00	0,79		0,46	0	52,62	3
	Mittelwert	13,75	0,00	13,80		13,47		36,17	

Tabelle 14: Ergebnisse *R. placenta* – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin

Behandlung										Kontrolle	
Schutzmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme Lösungsmittel g/PK	CuSO ₄ kg/m ³	Aufnahme Lösungsmittel g/PK	Melanin g/m ³	Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
4,00	73	15,47	31,93	13,10	135,20	-4,06	-4,09	0,03	0	40,00	5
	74	14,09	29,49	11,17	116,89	-2,30		1,79	2	43,86	5
	75	14,81	31,61	14,54	155,18	-3,84		0,25	0	54,60	5
	76	14,24	30,02	13,84	145,88	-3,46		0,63	0	43,61	4
	Mittelwert	14,65	30,76	13,16	138,29	-3,41		0,68		45,52	
2,00	77	13,77	15,11	12,99	142,55	-1,79	-2,10	0,31	0	0,45	0
	78	14,55	15,58	13,50	144,53	-0,54		1,56	4	46,51	5
	79	14,23	15,25	13,64	146,17	-0,68		1,42	3	49,11	5
	80	14,30	15,54	12,32	133,88	-2,12		0,00	0	3,75	0
	Mittelwert	14,39	15,41	13,57	145,35	-0,61		1,49		47,81	
1,00	81	14,11	7,67	14,22	154,58	13,39	-1,33	14,72	5	44,49	5
	82	12,86	7,07	11,92	131,03	15,56		16,88	5	41,40	5
	83	13,77	7,37	13,09	140,08	-0,49		0,83	0	58,89	4
	84	13,10	7,19	12,53	137,55	13,89		15,22	4	57,26	5
	Mittelwert	13,46	7,32	12,94	140,81	10,59		11,91		50,51	
0,50	85	14,44	3,81	14,25	150,25	18,00	-0,57	18,57	5	41,86	5
	86	13,15	3,55	12,29	132,55	12,18		12,75	5	37,80	5
	87	13,37	3,65	13,12	143,19	16,30		16,87	5	38,46	5
	88	12,68	3,57	12,38	139,37	19,85		20,42	5	39,29	5
	Mittelwert	13,41	3,64	13,01	141,34	16,58		17,15		39,35	
0,25	89	13,58	1,83	13,36	144,07	12,75	-0,52	13,28	5	36,25	5
	90	13,80	1,86	13,54	145,81	16,21		16,74	5	31,76	5
	91	14,14	1,89	13,69	146,15	22,49		23,02	5	36,80	5
	92	13,28	1,81	13,08	142,55	16,11		16,64	5	41,23	5
	Mittelwert	13,70	1,85	13,42	144,65	16,89		17,42		36,51	
0,00	93	0,00	0,00	13,19	142,15	19,16	-0,58	19,74	5	39,81	4
	94	0,00	0,00	14,32	154,22	23,12		23,70	5	35,73	5
	95	0,00	0,00	13,14	140,04	32,11		32,69	5	42,12	5
	96	0,00	0,00	12,64	137,77	15,10		15,68	5	35,50	5
	Mittelwert	0,00	0,00	13,32	143,55	22,37		22,95		38,29	

Tabelle 15: Ergebnisse *G. trabeum* – Behandlung mit CuSO_4

Behandlung								Kontrolle	
Schuttmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme		Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
		Lösungsmittel g/PK	CuSO_4 kg/m ³						
4,00	97	14,38	29,52	-2,87	-3,45	0,58	0	37,71	5
	98	13,87	29,61	-3,28		0,17	0	38,76	5
	99	13,40	28,31	-2,95		0,50	0	33,75	5
	100	14,28	29,97	-3,58		0,00	0	26,24	5
	Mittelwert	13,98	29,35	-3,17		0,31		34,11	
2,00	101	14,97	15,38	-1,83	-1,29	0,00	0	30,96	5
	102	14,36	14,76	-1,48		0,00	0	32,10	5
	103	14,89	15,35	-1,93		0,00	0	41,07	5
	104	13,40	14,09	-1,40		0,00	0	32,50	5
	Mittelwert	14,41	14,90	-1,66		0,00		34,16	
1,00	105	14,58	7,37	-0,66	-0,58	0,00	0	35,52	5
	106	14,82	7,67	-0,65		0,00	0	38,41	5
	107	14,46	7,39	0,54		1,12	0	38,38	5
	108	13,37	7,27	-0,72		0,00	0	40,37	5
	Mittelwert	14,31	7,43	-0,37		0,21		38,17	
0,50	109	14,48	3,69	-0,11	0,11	0,00	0	40,31	5
	110	13,76	3,57	0,00		0,00	0	41,45	5
	111	14,42	3,79	-0,22		0,00	0	23,54	4
	112	13,35	3,54	-0,20		0,00	0	31,04	5
	Mittelwert	14,00	3,65	-0,13		0,00		34,08	
0,25	113	13,31	1,78	0,10	0,60	0,00	0	47,32	4
	114	13,10	1,78	0,30		0,00	0	33,33	5
	115	13,44	1,79	-0,10		0,00	1	38,48	5
	116	14,68	1,90	0,23		0,00	0	30,58	3
	Mittelwert	13,63	1,81	0,13		0,00		37,43	
0,00	117	13,32	0,00	39,57	0,33	39,24	5	33,79	5
	118	12,86	0,00	27,32		26,99	5	24,72	5
	119	14,67	0,00	38,03		37,70	5	19,87	5
	120	13,91	0,00	21,54		21,22	4	31,70	5
	Mittelwert	13,69	0,00	31,61		31,29		27,52	

Tabelle 16: Ergebnisse *G. trabeum* – Behandlung mit CuSO₄ und Melanin

Behandlung										Kontrolle	
Schutzmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme		Aufnahme		Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
		Lösungsmittel g/PK	CuSO ₄ kg/m ³	Lösungsmittel g/PK	Melanin g/m ³						
4,00	121	13,29	29,81	12,39	138,97	-3,49		0,60	0	39,86	5
	122	14,37	31,09	13,45	145,51	-4,82	-4,09	0,00	0	28,77	5
	123	13,34	28,93	12,32	133,58	-3,19		0,90	0	38,53	5
	124	13,15	29,09	13,07	144,56	-3,64		0,45	0	5,03	2
	Mittelwert	13,54	29,73	12,81	140,65	-3,78		0,49		28,05	
2,00	125	12,82	14,33	12,53	140,08	-1,53		0,57	0	40,40	5
	126	13,55	14,89	12,00	131,88	-1,96	-2,10	0,14	0	36,88	5
	127	13,21	14,35	12,80	139,03	-1,79		0,31	0	35,32	5
	128	13,07	14,56	12,57	139,99	-1,91		0,19	0	36,29	5
	Mittelwert	13,16	14,53	12,48	137,74	-1,80		0,30		37,22	
1,00	129	13,67	7,44	13,37	145,53	-1,15		0,17	0	42,54	5
	130	13,47	7,36	12,82	140,13	-1,16	-1,33	0,17	0	1,78	0
	131	13,70	7,51	13,03	142,82	-1,26		0,07	0	1,02	0
	132	13,43	7,42	12,90	142,53	-1,31		0,02	0	3,04	0
	Mittelwert	13,67	7,44	13,37	145,53	-1,15		0,17		42,54	
0,50	133	13,76	3,74	13,65	148,59	-0,65		0,00	0	17,99	2
	134	13,02	3,62	12,42	138,05	-0,40	-0,57	0,17	0	36,31	5
	135	13,94	3,76	13,71	148,05	-0,58		0,00	0	8,79	1
	136	13,14	3,68	12,24	137,20	-0,51		0,06	0	28,59	5
	Mittelwert	13,08	3,65	12,33	137,63	-0,46		0,11		32,45	
0,25	137	12,59	1,77	12,35	139,03	-0,30		0,22	3	41,42	5
	138	13,70	1,88	13,56	149,25	-0,23	-0,52	0,29	1	41,44	5
	139	13,22	1,80	12,74	139,14	0,00		0,52	0	36,52	5
	140	12,66	1,77	12,93	144,88	-0,21		0,31	0	39,60	5
	Mittelwert	13,04	1,81	12,90	143,07	-0,19		0,34		39,75	
0,00	141	0,00	0,00	13,42	147,55	1,73		2,31	0	40,59	5
	142	0,00	0,00	13,21	146,27	0,97	-0,58	1,55	0	21,91	3
	143	0,00	0,00	13,51	149,62	0,71		1,29	0	35,92	5
	144	0,00	0,00	12,54	139,90	1,05		1,63	0	11,65	0
	Mittelwert	0,00	0,00	13,17	145,84	1,11		1,69		27,52	

Tabelle 17: Ergebnisse *T. versicolor* – Behandlung mit CuSO_4

Behandlung								Kontrolle	
Schuttmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme Lösungsmittel g/PK	CuSO_4 kg/m ³	Masseverlust %	Korrekturwert	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
4,00	211	12,51	26,09	-0,99	-2,39	1,41	0	22,51	4
	212	12,91	26,98	-1,32		1,08	0	25,37	4
	213	12,64	26,45	-1,22		1,17	0	21,47	4
	214	12,91	26,95	-2,40		0,00	0	24,02	4
	Mittelwert	12,74	26,62	-1,48		0,91		23,34	
2,00	215	12,64	13,19	-1,02	-1,31	0,29	0	27,61	4
	216	12,66	13,19	-0,92		0,40	0	26,83	4
	217	12,44	12,97	-0,69		0,62	1	25,79	4
	218	12,66	13,19	-0,85		0,46	1	16,13	4
	Mittelwert	12,58	13,11	-0,88		0,44		26,74	
1,00	219	12,54	6,55	-0,38	-0,39	0,01	1	14,21	1
	220	12,76	6,62	-0,55		0,00	1	22,56	4
	221	12,86	6,68	-0,38		0,01	2	23,65	4
	222	12,62	6,58	-0,31		0,08	2	25,04	4
	Mittelwert	12,75	6,63	-0,41		0,03		23,75	
0,50	223	12,69	3,31	0,00	-0,04	0,04	0	14,34	1
	224	12,49	3,26	0,00		0,04	1	29,42	3
	225	12,65	3,29	0,08		0,12	1	25,51	3
	226	12,55	3,28	-0,08		0,00	1	21,48	3
	Mittelwert	12,56	3,28	0,00		0,05		25,47	
0,25	227	12,68	1,66	0,31	0,05	0,26	1	26,88	4
	228	12,63	1,64	0,31		0,26	1	28,54	4
	229	12,91	1,68	0,15		0,10	1	17,52	4
	230	12,94	1,69	0,15		0,10	1	25,17	4
	Mittelwert	12,75	1,66	0,26		0,21		26,86	
0,00	231	12,83	0,00	26,50	0,21	26,28	5	28,59	4
	232	12,69	0,00	25,35		25,14	5	16,78	4
	233	12,76	0,00	12,85		12,64	4	24,78	4
	234	12,74	0,00	15,66		15,45	3	20,47	3
	Mittelwert	12,76	0,00	20,09		19,88		22,66	

Tabelle 18: Ergebnisse *T. versicolor* – Behandlung mit CuSO₄ und Melanin

Behandlung										Kontrolle	
Schuttmittel-Konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme		Aufnahme		Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
		Lösungsmittel g/PK	CuSO ₄ kg/m ³	Lösungsmittel g/PK	Melanin g/m ³						
4,00	235	12,39	25,75	12,25	127,28	-1,69		1,49	0	26,52	4
	236	12,61	26,38	12,33	128,95	-1,19	-3,18	1,99	0	19,22	3
	237	12,59	26,29	12,07	126,04	-1,39		1,79	0	23,98	4
	238	12,79	26,72	12,27	128,15	-0,85		2,33	0	25,85	3
	Mittelwert	12,59	26,25	12,20	127,16	-1,31		1,87		25,45	
2,00	239	12,72	13,28	12,24	127,83	-1,15		0,65	1	24,53	4
	240	12,74	13,24	12,22	127,03	-1,30	-1,80	0,50	0	21,80	3
	241	12,66	13,22	12,20	127,41	-1,22		0,58	1	24,15	4
	242	12,44	13,01	12,61	131,84	-1,20		0,60	1	22,54	4
	Mittelwert	12,64	13,19	12,32	128,53	-1,22		0,58		23,26	
1,00	243	12,69	6,63	12,41	129,65	-0,78		0,04	2	23,93	4
	244	12,58	6,53	12,62	131,11	-0,60	-0,82	0,22	0	24,42	3
	245	12,45	6,48	12,53	130,35	-0,52		0,30	2	29,11	4
	246	12,41	6,48	12,42	129,75	-0,52		0,30	2	25,95	4
	Mittelwert	12,53	6,53	12,50	130,22	-0,61		0,21		25,85	
0,50	247	12,78	3,33	12,48	129,99	-0,31		0,07	1	25,83	3
	248	12,83	3,34	12,60	131,35	-0,24	-0,39	0,15	2	25,83	4
	249	12,78	3,32	12,59	130,75	-0,32		0,07	1	23,07	3
	250	12,62	3,29	12,56	131,02	0,08		0,46	2	15,58	2
	Mittelwert	12,80	3,33	12,56	130,70	-0,29		0,10		24,91	
0,25	251	12,52	1,62	11,99	124,44	0,23		0,48	0	24,81	2
	252	12,57	1,63	11,88	123,57	0,99	-0,25	1,23	2	25,08	3
	253	12,55	1,64	12,00	125,44	0,69		0,93	2	26,17	3
	254	12,56	1,64	12,01	125,48	1,21		1,46	2	33,26	3
	Mittelwert	12,55	1,63	11,97	124,73	0,78		1,03		27,33	
0,00	255	0,00	0,00	12,10	126,39	36,52		36,91	5	27,12	3
	256	0,00	0,00	12,16	125,85	33,28	-0,40	33,68	5	25,23	4
	257	0,00	0,00	12,53	130,01	32,12		32,51	5	32,80	4
	258	0,00	0,00	12,43	129,46	39,57		39,97	4	26,73	3
	Mittelwert	0,00	0,00	12,31	127,93	35,37		35,77		27,97	

Tabelle 19: Ergebnisse *T. versicolor* – Behandlung mit CuSO_4 / Auswaschungsbeanspruchung

Behandlung								Kontrolle	
Schutzmittel- konzentration %G	PK Nr.	Aufnahme Lösungsmittel g/PK	CuSO_4 (kg/m ³) kg/m ³	Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	Masseverlust %	Pilzbewuchs
4,00	211A	13,17	27,49	0,83	0,67	0,16	1	29,18	4
	212A	13,26	27,66	0,75		0,08	1	25,34	3
	213A	12,87	26,85	0,49		0,00	1	14,50	3
	214A	13,11	27,34	0,81		0,14	1	26,41	4
	Mittelwert	13,18	27,50	0,80		0,12		26,98	
2,00	215A	12,69	13,24	0,70	0,76	0,00	1	15,96	3
	216A	12,50	13,03	1,23		0,48	1	16,00	3
	217A	12,93	13,50	0,64		0,00	0	25,32	4
	218A	12,38	12,94	0,91		0,16	0	28,19	3
	Mittelwert	12,66	13,22	0,78		0,08		26,76	
1,00	219A	12,73	6,64	0,79	0,79	0,00	1	27,05	4
	220A	12,87	6,72	0,71		0,00	1	25,64	4
	221A	12,96	6,77	1,70		0,91	1	25,60	4
	222A	12,69	6,61	0,94		0,15	0	26,33	4
	Mittelwert	12,81	6,68	1,04		0,27		26,16	
0,50	223A	12,84	3,35	0,72	0,84	0,00	0	26,09	3
	224A	12,82	3,34	0,80		0,00	1	26,99	3
	225A	12,89	3,36	0,93		0,10	1	26,85	4
	226A	13,02	3,40	0,88		0,04	1	14,92	4
	Mittelwert	12,85	3,35	0,82		0,03		26,64	
0,25	227A	13,07	1,70	0,98	0,72	0,26	0	25,53	3
	228A	13,07	1,70	0,98		0,26	0	28,90	4
	229A	12,71	1,66	1,02		0,30	0	26,93	3
	230A	12,68	1,65	0,95		0,23	0	23,91	5
	Mittelwert	12,88	1,68	0,98		0,26		26,32	
0,00	231A	12,64	0,00	8,85	0,96	7,89	3	24,41	3
	232A	12,71	0,00	8,05		7,09	4	27,12	4
	233A	12,61	0,00	9,44		8,48	2	25,86	3
	234A	12,62	0,00	7,51		6,55	3	26,52	4
	Mittelwert	12,65	0,00	8,46		7,50		25,98	

Tabelle 20: Ergebnisse *T. versicolor* – Behandlung mit CuSO_4 und Melanin / Auswaschungsbeanspruchung

Behandlung										Kontroll	
Schuttmittel- %G	PK Nr.	Aufnahme Lösungsmittel g/PK	CuSO ₄ kg/m ³	Aufnahme Lösungsmittel g/PK	Melanin g/m ³	Masseverlust %	Korrekturwert %	Korrigierter Masseverlust %	Pilzbewuchs	MV(%) %	Pilzbewuchs
4,00	235A	12,73	26,53	12,06	125,69	0,69	0,50	0,19	1	27,17	3
	236A	12,77	26,63	12,06	125,74	0,71		0,21	1	23,65	4
	237A	12,72	26,51	12,08	125,89	0,68		0,19	0	24,00	4
	238A	12,90	26,95	12,19	127,33	0,79		0,29	1	21,98	4
	Mittelwert	12,78	26,66	12,10	126,16	0,72		0,22		24,20	
2,00	239A	12,71	13,29	12,20	127,54	0,71	0,57	0,14	0	22,53	3
	240A	12,71	13,22	12,24	127,34	0,71		0,14	1	22,24	3
	241A	12,70	13,26	12,29	128,35	0,71		0,14	2	13,93	2
	242A	12,66	13,23	12,26	128,09	0,77		0,20	1	14,16	1
	Mittelwert	12,71	13,26	12,22	127,44	0,71		0,14		22,38	
1,00	243A	12,65	6,61	12,24	127,82	0,69	0,63	0,06	1	29,20	3
	244A	13,18	6,89	12,79	133,70	0,67		0,04	1	26,58	4
	245A	13,07	6,81	12,69	132,21	0,83		0,20	1	26,94	4
	246A	12,87	6,72	12,44	129,94	0,82		0,19	1	26,47	3
	Mittelwert	12,94	6,76	12,54	130,92	0,75		0,12		27,30	
0,50	247A	12,72	3,32	12,30	128,42	0,86	0,63	0,24	0	28,32	3
	248A	12,68	3,31	12,32	128,66	0,88		0,26	1	26,55	4
	249A	12,41	3,24	12,38	129,16	1,26		0,64	0	25,79	3
	250A	12,35	3,22	11,84	123,57	0,78		0,15	0	23,58	3
	Mittelwert	12,54	3,27	12,21	127,45	0,95		0,32		26,06	
0,25	251A	12,76	1,66	12,31	128,37	0,87	0,92	0,00	0	31,96	4
	252A	12,74	1,66	12,29	128,27	0,95		0,03	0	28,46	4
	253A	12,67	1,65	12,21	127,51	2,05		1,13	0	28,16	4
	254A	12,92	1,68	12,71	132,57	1,07		0,16	0	24,74	3
	Mittelwert	12,77	1,67	12,38	129,18	1,23		0,33		28,33	
0,00	255A	0,00	0,00	12,91	134,79	17,58	0,83	16,75	3	29,10	4
	256A	0,00	0,00	12,77	133,31	16,42		15,59	4	28,56	4
	257A	0,00	0,00	12,80	133,85	16,37		15,55	3	17,23	2
	258A	0,00	0,00	12,13	126,47	21,32		20,50	5	30,46	3
	Mittelwert	0,00	0,00	12,65	132,10	17,92		17,10		26,34	

3.3.2 Effekt von Melanin auf das Wachstum holzerstörender Pilze

Im Wachstumsversuch mit den Prüfpilzen des EN113-Versuches konnte kein Einfluss von Melanin auf das Pilzwachstum festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen des vorherigen Kapitels (3.3.1).

Die Entwicklung des Myzels verlief bei allen Prüfpilzen in beiden Testvarianten (0,2 g/l Melanin und 2 g/l Melanin) sowie bei den Kontrollen mit MEA ohne Melanin gleichmäßig und ohne auffällige Unterschiede. In allen Fällen war der Nährboden am Ende der Inkubationszeit nahezu vollständig überwachsen (Abb. 12). Eine wachstumshemmende Wirkung von Melanin auf holzerstörende Basidiomyceten konnte somit nicht nachgewiesen werden.

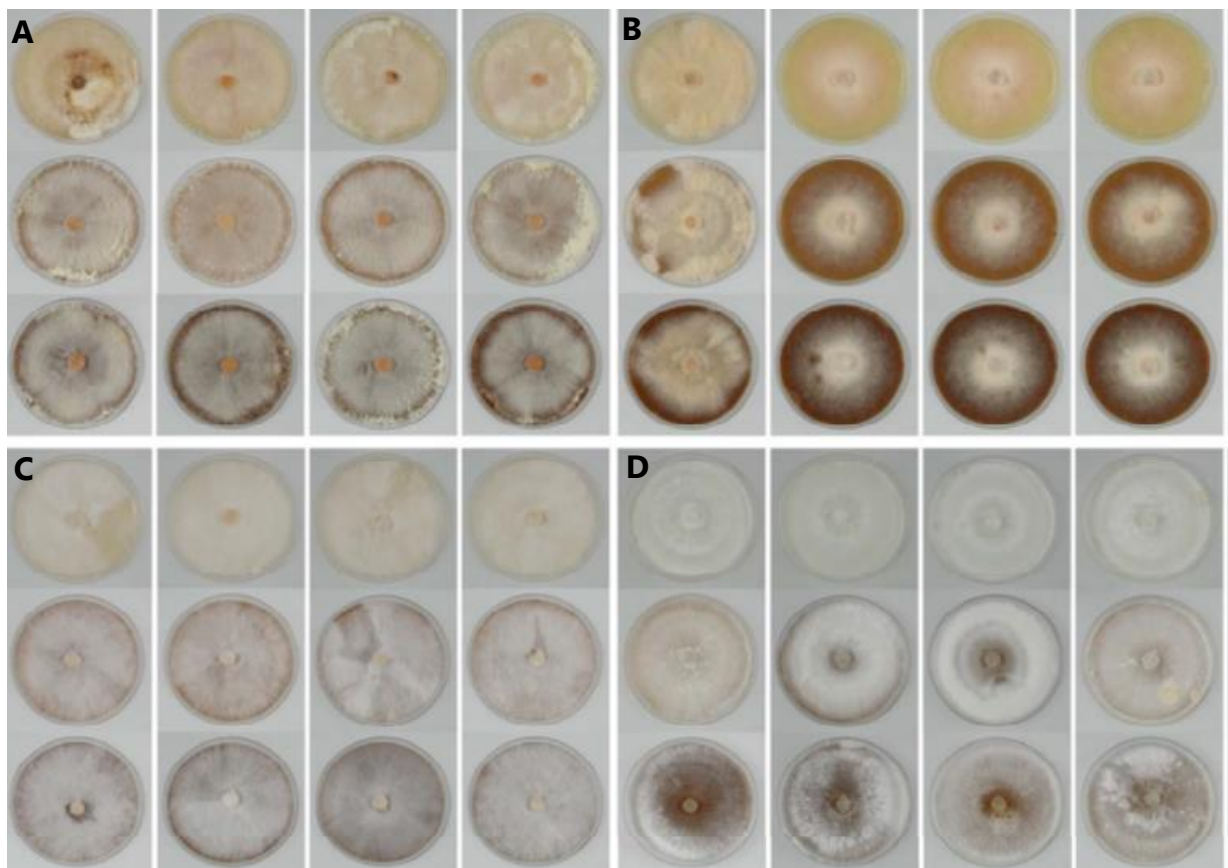


Abbildung 12: Ergebnisse des Wachstumsversuches mit melaninhaltigem MEA. **A:** *C. puteana* **B:** *G. trabeum* **C:** *R. placenta*. **D:** *T. versicolor*. Die jeweils oberste Platte in jeder Reihe ist die Kontrolle ohne Melanin, die mittlere die Variante mit 0,2 g/l Melanin und die unterste die Variante mit 2 g/l Melanin.

Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Flüssigkulturen mit verschiedenen Pilzarten Melanin produziert. Dabei wurden die mit Abstand besten Ergebnisse mit Arten der Gattung *Armillaria* erzielt, insbesondere mit *A. cepistipes* und *A. ostoyae*. Beide Arten waren dabei in der Lage Melanin auf Basis unterschiedlicher Nährmedien über verschiedene Synthesewege zu bilden. Zur Produktion grösserer Mengen kam es jedoch nur unter Verwendung des tyrosinhaltigen Nährmediums. Dabei wurden auf diesem Wege durch Biotransformation von Tyrosin deutlich höhere Melaninkonzentrationen (g/l) erzielt, als in anderen Arbeiten zur Melaninbiosynthese mit verschiedenen Mikroorganismen. Die als Precursor eingesetzte Menge Tyrosin konnte dabei vollständig umgesetzt werden. Als wesentlicher Nachteil im Vergleich zu anderen Organismen erwies sich dabei jedoch die Länge der zur Produktion benötigten Inkubationszeit. Bezogen auf die Produktionsleistung pro Zeiteinheit scheinen *Armillaria* Arten nach vorliegenden Ergebnissen für die Melaninproduktion somit weniger geeignet zu sein als verschiedene andere Mikroorganismen. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es hinsichtlich der Fähigkeit zur Melaninbiosynthese eine erhebliche innerartliche Variationsbreite geben kann – wie sich im Rahmen dieser Arbeit etwa in Bezug auf *G. simplex* bestätigt hat. Somit könnten durch weitere Untersuchungen von *Armillaria* Stämmen verschiedener Herkünfte möglicherweise potentere Kandidaten für die Biotransformation von Tyrosin gefunden werden. Bei den explorativen Untersuchungen zur Optimierung der Kulturbedingungen konnten die besten Ergebnisse mit einer Inkubationstemperatur von 26°C und einer Rotationsgeschwindigkeit des Schüttlers von 120rpm erzielt werden. Das Einstellen der pH-Werte durch Verwendung entsprechender Pufferlösungen hatte dagegen unabhängig vom jeweiligen Wert einen deutlich negativen Einfluss, sowohl auf das Pilzwachstum, als auch auf die Melaninproduktion. Im Zuge wiederholter Versuchsansätze wurden teils starke Schwankungen der Produktionsleistung gleicher Kulturen trotz identischer Kulturbedingungen festgestellt. Die Ursachen hierfür sind unklar, allerdings deuten die hier gemachten Beobachtungen darauf hin, dass das Alter der Vorkulturen ein wesentlicher Einflussfaktor sein könnte, was bei künftigen Versuchsansätzen berücksichtigt werden sollte.

Im Rahmen des Versuches nach EN113 zum Einsatz von Melanin als Bestandteil kupferbasierter Holzschutzmittel konnte keine Verbesserung der Schutzwirkung von Kupfersulfat durch Melanin nachgewiesen werden. Lediglich die Ergebnisse des Versuches mit *G. trabeum* sprechen für eine leichte hemmende Wirkung von Melanin,

was durch den ergänzend durchgeführten Wachstumsversuch mit den EN 113-Prüfpilzen auf melaninhaltigen Nährmedien jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Insgesamt konnte sowohl in den Holzschutz-Versuchen nach EN 113 und in den Wachstumstest weder ein positiver Einfluss von Melanin auf die Wirksamkeit des Schutzmittels noch eine wachstumshemmende Wirkung von Melanin gegen Basidiomyceten festgestellt werden.

Literaturverzeichnis

- Bell AA, Wheeler MH. 1986.** Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* **24**(1): 411-451.
- Breitenbach J, Kränzlin F. 1984.** Pilze der Schweiz. 2. Aufl. Luzern: Verlag Mykologia.
- Butler MJ, Day AW. 1998.** Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44**(12): 1115-1136.
- Dadachova E, Casadevall A. 2008.** Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. In: *Current opinion in microbiology* **11**(6): 525-531.
- Eisenman H, Casadevall A. 2012.** Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**(3): 931-940.
- Fava F, Gioia DD, Marchetti L. 1993.** Characterization of a pigment produced by *Pseudomonas fluorescens* during 3-chlorobenzoate co-metabolism. *Chemosphere* **27**(5): 825-835.
- Gadd GM, De Rome L. 1988.** Biosorption of copper by fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**(6): 610-617.
- Henson JM, Butler MJ, Day AW. 1999.** The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 447-471.
- Hoti SL, Balaraman K. 1993.** Formation of melanin pigment by a mutant of *Bacillus thuringiensis* H-14. *Journal of General Microbiology* **139**(10): 2365-2369.
- Inamdar S, Joshi S, Bapat V, Jadhav J. 2014.** Innovative use of *Mucuna monosperma* (Wight) callus cultures for continuous production of melanin by using statistically optimized biotransformation medium. *Journal of Biotechnology* **170**: 28-34.
- Jalmi P, Bodke P, Wahidullah S, Raghukumar S. 2012.** The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**(2): 505-512.
- Kunwar A, Adhikary B, Jayakumar S; Barik A. Chattopadhyay S, Raghukumar S, Priyadarsini KI. 2012.** Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model. In: *Toxicology and applied pharmacology* **264**(2): 202-211.
- Lagunas-Muñoz VH, Cabrera-Valladares N, Bolívar F, Gosset G, Martínez A. 2006.** Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* **101**(5): 1002-1008.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. 2003.** Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* **38**(2): 143-158.
- Purvis OW, Bailey EH, McLean J, Kasama T, Williamson BJ. 2004.** Uranium Biosorption by the Lichen *Trapelia involuta* at a Uranium Mine. In: *Geomicrobiology Journal* **21**(3): 159-167.
- Riley PA. 1997.** Molecules in Focus: Melanin. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29**(11): 1235-1239.

- Sajjan S, Kulkarni G, Yaligara V, Kyoung L, Karegoudar TB. 2010.** Purification and physiochemical characterization of melanin pigment from *Klebsiella* sp GSK. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**(11): 1513-1520.
- Sakaguchi T, Nakajima A. 1987.** Accumulation of uranium by biopigments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **40**(2): 133-141.
- Schubert M, Engel J, Thöny-Meyer L, Schwarze FWMR, Ihssen J. 2012.** Protection of wood from microorganisms by laccase-catalyzed iodination. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(20): 7267-7275.
- Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, Raaman N. 2008.** Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**(10): 2125-2131.
- Surawase SN, Jadhav SB, Phugare SS, Jadhav, JP. 2012.** Optimization of melanin production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. *3 Biotech* **3**(3): 187-194.
- Tang YJ, Zhu LW, Li HM, Li DS. 2007.** Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors - Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technology & Biotechnology* **45**(3): 221-229.
- Turick CE, Knox AS, Leverette CL, Kritzas YG. 2008.** *In situ* uranium stabilization by microbial metabolites. *Journal of Environmental Radioactivity* **99** (6): 890-899.
- White C, Gadd GM. 1990.** Biosorption of Radionuclides by Fungal Biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **49** (4): 331-343.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- Zhang J, Cai J, Deng Y, Chen Y, Ren G. 2006.** Characterization of melanin produced by a wild--type strain of *Bacillus cereus*. *Frontiers of Biology in China* **33**(1): 42-45.