

**Untersuchungen**  
**zur Bildung von Kupferoxalat**  
**am Beispiel von *Poria placenta***

**Abschlussarbeit**

zur Erlangung des Grades eines  
Bachelor of Science (B. Sc.) an der  
Hochschule für nachhaltige Entwicklung Eberswalde  
Fachbereich Holzingenieurwesen  
Studiengang Holztechnik

eingereicht von: Claudia Lenz  
geboren am: 01. August 1985 in Frankfurt (Oder)

Betreuer: 1. Frau Prof. Dr. Silke Lautner  
2. Herr Dr. Eckhard Melcher

Eberswalde, 23. April 2015

## Bibliografische Angaben

Lenz, Claudia: Untersuchungen zur Bildung von Kupferoxalat am Beispiel von *Poria placenta*.- 2015. 73 Seiten, 33 Abbildungen, 9 Tabellen, 6 Seite Anlagen. Hochschule für nachhaltige Entwicklung Eberswalde, Fachbereich Holzingenieurwesen, Bachelorarbeit

## Kurzreferat

Bestimmte Braunfäule-erregende Basidiomyceten sind befähigt Kupferoxalat, aus mit Holzschutzmittel imprägniertem Holz, auszufällen. In dieser Arbeit wird die Ausfällung von Kupferoxalat aus dem wasserlöslichen, kupferbasierten Holzschutzmittel Kupfersulfat im Zusammenhang mit dem Basidiomycet *Poria placenta* an *Pinus sylvestris* L. untersucht. Gegenstand der Untersuchungen sind licht- und rasterelektronenmikroskopische Analysen im Hinblick auf die *in situ* Ausfällung von Kupferoxalat.

## **Danksagung**

Zu Beginn möchte ich Frau Prof. Dr. Silke Lautner für die Unterstützung und die Nutzung des Holzbiologie-Labors danken sowie für die fachlichen Kommentare und Anregungen zu dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt ihr für die Ermöglichung zur Teilnahme an der WSE-Conference in Edinburgh, Schottland 2014 im Rahmen dieses Projekts. Während der Konferenz ergaben sich interessante Gespräche mit anderen Teilnehmerinnen und Teilnehmern mit sehr hilfreichen Verweisen zu weiterführender Fachliteratur.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und den Mitarbeitern vom Thünen Institut für Holzfor-schung vom Zentrum Holzwirtschaft in Hamburg und der Universität Hamburg.

Dabei danke ich besonders Herrn Dr. Eckhard Melcher für die fachkundigen Anregungen und Kommentare zu dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Frau Tanja Potsch für die zusätzlich investierte Zeit für dieses Projekt am Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop.

Zudem danke ich Frau Gabriele Lütje für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ralf Möller, Frau Claudia Chemnitzer und dem gesam-ten Team der Abteilung Forschung und Entwicklung Biologie der Firma BASF Wolman GmbH in Sinzheim für die Vorbereitungen und Ermöglichung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich zusätzlich für den fachlichen Input und das angenehme Arbeitsklima im Labor während des gesamten Aufenthalts.

Außerdem möchte ich mich bei Keule und den weiteren Bewohnerinnen und Bewohnern der Wa-genburg in Hamburg-Altona für die unkomplizierte Unterbringung und die enorme Gastfreund-schaft bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

Bibliografische Angaben.....	2
Kurzreferat.....	2
Verzeichnis für Abkürzungen und Symbole .....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Hintergrund.....	8
1.1.1 Holzerstörende Pilze .....	8
1.1.2 Holzabbau durch Braunfäule .....	10
1.1.3 Chemisch vorbeugender Holzschutz.....	12
1.1.4 Kupfertolerante Pilze .....	14
1.2 Aufgabenstellung.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Probenmaterial.....	18
2.2 Probenvorbereitung und Behandlung .....	19
2.3 Messungen und Verfahren.....	22
2.4 Lichtmikroskopische Analyse .....	26
2.5 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM).....	26
2.6 Elementanalyse.....	27
3. Ergebnisse .....	28
3.1 Wachstumsraten .....	28
3.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK-Werte) .....	31
3.3 pH-Werte.....	31
3.4 Masseverlust.....	33
3.5 Lichtmikroskopie .....	34
3.6 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM).....	40
3.7 Energy Dispersive X-Ray Microanalysis (EDXA) .....	43
4. Diskussion.....	45
4.1 Wachstumsraten, MHK-Werte, pH-Werte.....	45

4.2 Masseverlust, Lichtmikroskopie, FEREM, EDXA .....	48
5. Schlussfolgerungen .....	56
6. Zusammenfassung und Ausblick .....	57
7. Literaturverzeichnis .....	58
A Anhang .....	64
A1 Abbildungsverzeichnis .....	64
A2 Tabellenverzeichnis .....	67
A3 Anlagen.....	68

## Verzeichnis für Abkürzungen und Symbole

c <sub>TL</sub>	Konzentration der Tränklösung
CaO <sub>x</sub>	Calciumoxalat
CuO <sub>x</sub>	Kupferoxalat
EDXA	EDX - Energy Dispersive X-ray Microanalysis (deutsch: Energiedispersive Röntgenmikroanalyse)
err. DG	errechnetes Darrgewicht
FEREM	Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie, (englisch: FESEM - Field Emission Scanning Electron Microscopy)
HSM	Holzschutzmittel
LA	Lösungsaufnahme
MEA	Malzextrakt-Agar
MHK	minimale Hemmkonzentration
<i>Pp</i>	<i>Poria placenta</i>
ppm	parts per million
REM	Rasterelektronenmikroskop
VR	Versuchsreihe
WA	Wirkstoffaufnahme

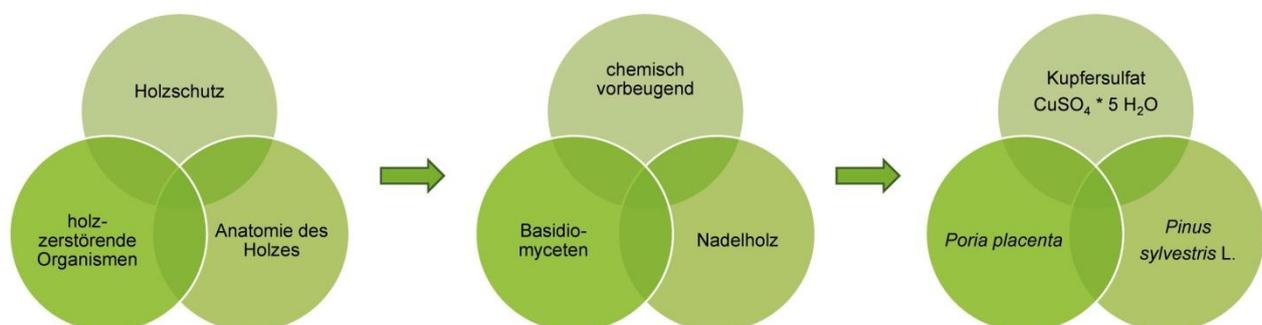
## 1. Einleitung

Holz als nachwachsender Rohstoff ist vor allem unter dem Aspekt der Nachhaltigkeit ein gefragter Baustoff und wird bereits seit Jahrhunderten als Bauholz verwendet. Holz kann in Form von Vollholz oder Holzwerkstoffen eingesetzt werden. Aus der vielseitigen Einsetzbarkeit des Holzes sowohl im Innen- als auch im Außenbereich resultiert eine komplexe Holzbranche mit verschiedenen Spezifizierungen.

Je nach Einsatzgebiet bringt Holz sowohl Vor- als auch Nachteile mit sich. Als natürlich gewachsenes und organisches Material hat Holz 2 grundlegende Eigenschaften. Zum einen ist Holz in Abhängigkeit von mehreren Faktoren mehr oder weniger schnell biologisch abbaubar. Die Zersetzung kann durch holzerstörende Pilze, holzerstörende Insekten, Mikroorganismen und durch Holzschädlinge im Meerwasser stattfinden. Zum anderen herrschen sowohl zwischen den unterschiedlichen Holzarten als auch innerhalb einer Holzart Unterschiede in den spezifischen Eigenschaften und ihrer Anatomie (Biodiversität). Zudem ergibt sich aus dem anatomischen Aufbau des Holzes eine Anisotropie, die die physikalischen Eigenschaften des Holzes stark beeinflusst. Diese fundamentalen Eigenschaften gestalten die Verarbeitung und Wissenschaft des Holzes als sehr vielschichtig.

Um Holz vor holzerstörenden Organismen zu schützen, ist ein angemessener Holzschutz entsprechend der jeweiligen Bauteile und des Einsatzgebietes notwendig. Dabei spielen Faktoren wie die Einbausituation (Gebrauchsklasse) und materialspezifische Eigenschaften des Holzes (Dauerhaftigkeit, Anatomie, Tränkbarkeit) bedeutende Rollen.

In dieser Arbeit wird eine von vielen Schnittstellen aus den beschriebenen Tatsachen näher untersucht (Abbildung 1). Kupfertolerante, holzerstörende Pilze sind befähigt Kupferoxalat ( $\text{CuOx}$ ) aus mit kupferbasierenden Holzschutzmitteln (HSM) behandeltem Holz auszufällen. In diesem Prozess wird das ursprüngliche Ziel, das Holz durch chemisch-vorbeugenden Holzschutz zu schützen, durch spezialisierte Pilze nicht erreicht.



**Abbildung 1:** Beziehungen und Schnittstellen des Gebietes kupfertoleranter Pilze aus verschiedenen Themenkomplexen des Holzes

## 1.1 Hintergrund

### 1.1.1 Holzzerstörende Pilze

Grundvoraussetzung für die Zerstörung von Holz durch Pilze ist das Vorhandensein von Wasser, Sauerstoff und Nährstoffen (Hill 2006). Jeder Pilz hat dabei ein spezifisches Optimum für Temperatur und Ausgleichsfeuchte im Holz (Kempe 2009). Aus dem Bereich der holzzerstörenden Organismen geht es in dieser Arbeit um den holzzerstörenden Pilz *Poria placenta* (*Pp*). Holzzerstörende Pilze sind befähigt Komponenten des Holzes abzubauen um diese für den eigenen Stoffwechsel und das Wachstum zu nutzen. Dabei sind Spezialisierungen auf Nadel- und/oder Laubholz bzw. Kern- und/oder Splintholz und Kombinationen davon bekannt. Das gesamte Themengebiet dieser Pilze ist sehr komplex. Eine Einteilung der holzzerstörenden Pilze kann daher nach verschiedenen Kriterien erfolgen (Kempe 2009). Um die spezifischen Merkmale und die Physiologie von *Pp* zu verstehen, ist eine genaue Abgrenzung zu anderen Pilzen vorzunehmen. Die wichtigsten Unterscheidungskriterien zwischen holzzerstörenden Pilzen sind a) Fäuletypen, b) Schadensort, c) Art des Mycels und d) Systematische Zugehörigkeit der Pilze.

#### Zu a) - Fäuletypen

Resultierend aus den verschiedenen Erscheinungsbildern des zerstörten Holzes werden drei Haupt-Fäuletypen unterschieden: Braunfäule, Weißfäule und Moderfäule. Die Braunfäuleschäden, ausgelöst durch Hausfäulepilze, sind mit 65 - 80 % die häufigste Schadensursache in Gebäuden und weisen einen typischen Würfelbruch auf (Huckfeldt & Schmidt 2006). Bei Braunfäulepilzen werden Cellulose, Hemicellulose und Pektin abgebaut, das Lignin bleibt stehen (Binker et al. 2014). Ein veralteter Begriff für Braunfäule ist Destruktionsfäule.

Bei der Weißfäule wird zusätzlich auch das Lignin des Holzes abgebaut, entweder gleichzeitig (simultan) oder nacheinander (sukzessiv) (Grosser 1985). Durch die unterschiedlichen Arten der Befallsbilder kann die Weißfäule noch weiter unterteilt werden.

Die Moderfäule hat ein höheres Feuchtigkeitsbedürfnis als Braun- und Weißfäule und tritt an nass lagerndem Holz auf, z.B. an Holz im Erdkontakt. Bei der Moderfäule wird hauptsächlich Cellulose abgebaut, somit ist das Erscheinungsbild ähnlich dem der Braunfäule mit einer feuchtschmierigen Oberfläche (Grosser 1985).

#### Zu b) - Schadensort

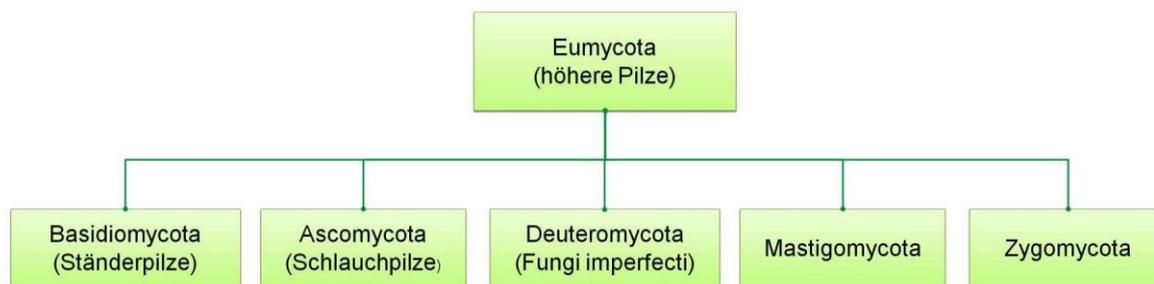
Eine Einteilung nach dem bevorzugten Ort der Schädigungen ist ebenso möglich. Die Gliederung der Hausfäulepilze erfolgt in echte Hausfäulepilze (Gebäude), Innenfäulepilze (Konstruktionen), Lagerfäulepilze (Lagerung) und Stammfäulepilze (Forst). Zudem treten ggf. noch Begleitpilze auf. (Binker et al. 2014).

### Zu c) Art des Mycels

Hierzu gehören die Ausprägungen von Substrat- und Oberflächenmycelien. Bei Substratmycelien handelt es sich um Pilzbestandteile im Holz, die nicht offensichtlich sichtbar sind. Die Bildung von Oberflächenmycelien erfolgt meist durch Basidiomyceten, selten durch Ascomyceten und Schimmelpilzen. Zum Oberflächemycel gehören Stränge, Mycel-Matten, Zwischenmycelien und Luftmycelien. Bei den Pilzen mit Oberflächenmycelien kommt es zusätzlich zur Ausbildung eines Substratmycels mit Substrathyphen. Die Grundhyphen im Substrat haben teilweise andere Merkmale als im Oberflächenmycel (Huckfeldt & Schmidt 2015).

### Zu d) Systematische Zugehörigkeit der Pilze

Eine systematische Klassifizierung der Pilze ist ebenso möglich (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Systematische Einteilung der Eumyceten, vereinfacht nach Zabel & Morrell, 1992

Eine genaue Verwendung der Begriffe nach a) bis d) ist unablässig, da die Querverbindungen zwischen den Unterscheidungskriterien sehr vielschichtig sind. Beispielsweise können Basidiomyceten sowohl Braunfäule als auch Weißfäule verursachen (Binker et al. 2014).

*Pp* ist ein Braunfäule-erregender Basidiomycet mit Ausprägung eines Oberflächenmycels. Es ist ein Hausfäulepilz, jedoch ist über sein Vorkommen in deutschen Gebäuden wenig bekannt. *Pp* wird vorrangig, wie in dieser Arbeit, als Labortestpilz für Versuche nach EN 113: 1996 verwendet. Die vergleichsweise helle Braunfäule ist schnell voranschreitend und intensiv. Die Optimaltemperatur liegt bei 28 °C und ist holzfeuchteabhängig. Die Hyphen bestehen unter anderem aus dem Kohlenhydrat Chitin (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>) (Kollmann 1982; Huckfeldt & Schmidt 2015).

Die Nomenklatur der Pilze ist seit Jahren in wissenschaftlicher Diskussion. Daraus ergeben sich viele Synonyme auch für diesen Pilz in der Fachliteratur (Schmidt 2006). Es gibt Bezeichnungen wie *Postia placenta* (Niemenmaa et al. 2008) oder Rosafarbener Saftporeling (Huckfeldt & Schmidt 2006). In neuerer Literatur werden auch aktualisierte Bezeichnungen wie *Oligoporus placenta* (Fries 1861) nach Gilbertson und Ryvarden (1994). In älterer Literatur sind auch Bezeichnungen wie *Polyporus vaporarius* verwendet worden (Schmidt 2006). Ebenso ist immer noch der Name *Poria monticola* im Umlauf (Humar et al. 2004) obwohl dieser als veraltet gilt (Schmidt 2006). Eine weitere Bezeichnung ist *Tyromyces placenta* (Krieglsteiner 2000).

### 1.1.2 Holzabbau durch Braunfäule

Die Besiedlung von Nadelholz durch holzerstörende Pilze erfolgt zunächst über die Holzstrahlen in radiale Richtung. Anschließend werden die Kreuzungsfeldtüpfel durchdrungen um in eine weitere axiale Ausbreitung über die Tracheiden zu gelangen. Wiederum angrenzende Tracheiden werden entweder über die Durchdringung der Hoftüpfel an den Radialwänden erschlossen oder durch Bildung sogenannter Bohrlöcher (Green et al. 1996).

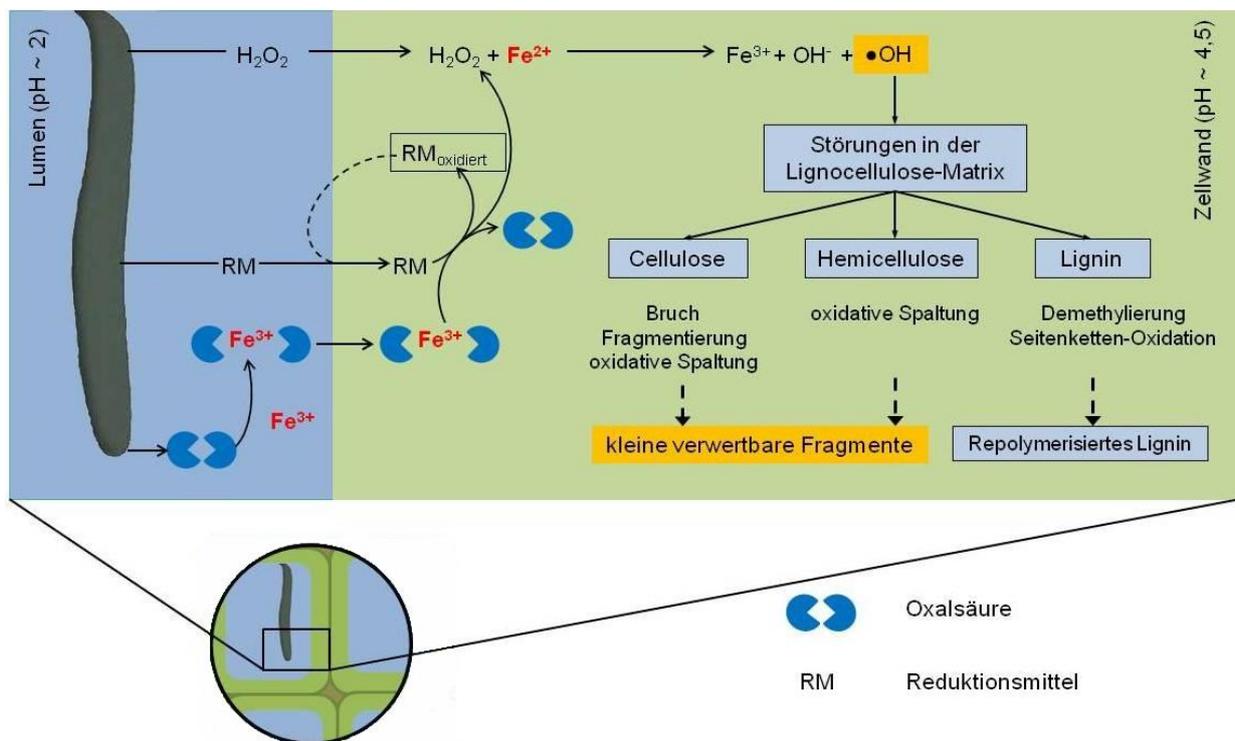
Der Holzabbau durch Braunfäule-erregende Basidiomyceten erfolgt durch initiale nicht-enzymatische Vorgänge durch extrazellulär produzierte, freie oxidative Radikale und anschließenden enzymatisch-hydrolytischen Reaktionen. In weiterführender Literatur wird auch der Abbau des Lignins durch das hohe Zerstörungspotential der Radikale näher untersucht (Arantes et al. 2012). Der charakteristische Holzabbau durch Braunfäule-erregende Basidiomyceten beruht in erster Linie auf der Zersetzung der Polysaccharide durch Depolymerisation im Holz (Fengel & Wegener 2003). Dabei beginnt die Zersetzung der Zellwände in Hyphennähe, folglich an der an das Lumen grenzenden Sekundärwand und setzt sich fort bis zur Mittellamelle (Eriksson et al. 1990). Vor der Lignifizierung besteht die Mittellamelle zu einem höheren Anteil aus Pektinen. Mit voranschreitender Verholzung sinkt der Pektin-Anteil. Pektin übernimmt eine „Klebstofffunktion“ zwischen benachbarten Zellen und hält diese zusammen (Matyssek et al. 2010). In nicht mehr jungen Hölzern beträgt die Menge an Pektin ca. 0,5 % des Holzgewichtes (Kürschner 1966). Pektin ist zudem in der Primärwand, den Zellwänden der Holzstrahlen und im Torus der Hoftüpfel vorhanden. Im Pektin wiederum befinden sich primär die gebundenen Calciumanteile im Holz (Green et al. 1996). Calcium ist ein wichtiger Bestandteil der Mittellamelle und übernimmt die Stabilisierungsfunktion der Membrane (Jellison et al. 1997). In der Literatur ist die Ausfällung von Calciumoxalat (CaOx) im Zusammenhang mit dem Holzabbau durch Pilze beschrieben (Goodell et al. 2003). Das Formieren des gebundenen Calciums in Oxalate bedeutet zwangsläufig eine Destabilisierung der Mittellamelle und eine Schwächung der Zellwand zum Vorteil des Pilzes. Es gilt zu beachten, dass einige Pilze Oxalatformationen über die Zeit akkumulieren, andere wiederum bauen kristalline Ausformungen in löslichere Formen um. Der Zeitpunkt der Stichprobenentnahme spielt folglich eine entscheidende Rolle bei der Untersuchung von CaOx (Goodell et al. 2003).

Neben der Ausfällung von CaOx werden andere Holzbestandteile folgendermaßen abgebaut: Im Anfangsstadium wird die Cellulose im S<sub>2</sub>-Layer stark durch hydrolytische Enzyme (Endo-1,4- $\beta$ -Glucanasen) im amorphen Bereich der Cellulose depolymerisiert, indem die glycosidischen Bindungen gespalten werden. Dabei bleibt der S<sub>3</sub>-Layer zunächst weitestgehend erhalten. Das heißt zerstörende Substanzen diffundieren durch den S<sub>3</sub>-Layer in die ligninärmste und zugleich cellulosehaltigste Schicht der Sekundärwand. Jedoch sind diese Pilze nicht fähig Exo-1,4- $\beta$ -Glucanasen zu bilden, die eine initiale Depolymerisierung der kristallinen Cellulose ermöglichen. Dies führte

zu dem Schluss, dass eine oxidative Spaltung durch die Fenton-Reaktion ausgelöst wird, da diese Art von Pilzen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) produzieren können. Zudem wurde experimentell erwiesen, dass *Pp* nicht in der Lage ist Cellulose zu spalten, wenn diese in reiner Form vorliegt. Das heißt ein Aufschluss von Cellulose ist nur möglich in Kombination mit anderen Reaktionen und Stoffen. Zudem ist die Endoglucanase von *Pp* multifunktional im Gegensatz zu anderen Pilzen. Sie ermöglicht die hydrolytische Spaltung von Polysacchariden wie Xylan und Mannan der Hemicellulose. Lignin wird durch *Pp* teilweise aufgeschlossen, indem der Gehalt an Methoxylgruppen reduziert wird (Demethylierung) (Eriksson et al. 1990; Goodell et al. 2003; Eaton & Hale 1993; Schmidt 2006).

Im Holz befinden sich neben den organischen Hauptkomponenten und akzessorischen Bestandteilen auch anorganische Zusätze wie Mineralien. Einige davon sind Kalium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Natrium (Na) und Eisen (Fe) (Schmidt, 2006). Das Eisen ist in Form von Eisenoxid mit ca. 6,3 % des Aschegehaltes des Kiefer-Splintholzes zu finden (Kollmann 1982). Zudem produzieren holzerstörende Pilze Oxalsäure (Green et al. 1991).

Die beschriebenen Tatsachen (nicht-enzymatische Reaktionen, Existenz von Eisen und Oxalsäure) führen zum Reaktionsschema der Fenton-Reaktion (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schema der Fenton Reaktion übersetzt nach Arantes et al. 2012

Beim Abbau des Holzes bleibt der S<sub>3</sub>-Layer zunächst weitestgehend unversehrt. Die in der Literatur beschriebene „Überwindung“ vom S<sub>3</sub>-Layer wird in Zusammenhang mit der Fenton-Reaktion gebracht. Freie Radikale sind deutlich kleiner als Enzyme und können a) als niedermolekularer Stoff durch die Tertiärwand diffundieren und b) die Porosität der Holzstruktur erhöhen und somit

den Zugriff für holzerstörende Enzyme und Hyphen vereinfachen (Schilling et al. 2013; Green et al. 1991).

Der komplexe Prozess der Holzerstörung durch Braunfäule-erregende Basidiomyceten ist selbst in wissenschaftlichen Kreisen in kritischer Diskussion und viele Ansätze sind weder vollständig bewiesen noch vollends aufgeklärt (Green & Highley 1997; Ostrofsky et al. 1997; Schilling et al. 2013). Als erwiesen gelten folgende Zusammenhänge in direkter Korrelation von Holzabbau mit holzerstörenden Pilzen:

- a) Wachstum im sauren Milieu (Humar et al. 2001; Rayner & Boddy 1988; Nicholas 1973; Huckfeldt & Schmidt 2015)  
→ pH-Wert-Reduzierung bei Basidiomyceten im Holz auf ca. 4 - 6 als Optimum und einer gesamten pH-Wert-Spanne von 2,5 - 9 (Schmidt 2006), wobei der pH-Wert von *Pinus sylvestris* L. ohne Pilzbefall bei ca. 5,1 liegt (Fengel & Wegener 2003)  
→ deutlich niedrige pH-Werte speziell von *Pp* in Versuchen auf Nährmedium ohne Holz (Schmidt 2006) und im Holz (Green et al. 1991)
- b) Produktion von Oxalsäure holzerstörender Pilze (Schilling & Jellison 2005; Micales 1997; Fomina et al. 2005; Green & Clausen 2005; Clausen & Green 2003; Clausen et al. 2000; Espejo & Agosin 1991)
- c) Masseverlust als messbare Konsequenz des Holzabbaus (DeGroot & Woodward 1999; Humar et al. 2004; Hastrup et al. 2012; Clausen & Green 2003)

### 1.1.3 Chemisch vorbeugender Holzschutz

Der Bereich Holzschutz beinhaltet viele Kategorien. Dabei fasst der Begriff „integrierter Holzschutz“ verschiedene Aspekte des Holzschutzes zusammen. Es gibt den baulichen Holzschutz als vereinigenden Begriff für den organisatorischen, biologischen, modifizierten, konzeptionellen, physikalischen und konstruktiven Holzschutz (Binker et al. 2014). Zudem gibt es den chemischvorbeugenden Holzschutz, bei dem Hölzer mit HSM behandelt werden und chemischbekämpfenden Holzschutz, bei bereits eingetretenem Befall. Im Holzschutz gilt generell, dass die Anwendung und Ausschöpfung der Möglichkeiten des baulichen Holzschutzes vor Anwendung des chemischen Holzschutzes geht.

Je nach Einsatzbereich wird das verwendete Holzbauteil in Gebrauchsklassen nach DIN 68800-1: 2011 und Bezug nehmend auf jeweils aktuelle DIN EN 335-1, einsortiert. Die aktuelle, aus ehemals drei Teilen bestehende DIN EN 335 ist von 2013 und in dieser ist die aktuelle DIN EN 335-1 integriert. Die sich in dem Bauteil einstellende Ausgleichsfeuchte ist ausschlaggebend für die Einordnung. Aus dieser Sortierung ergeben sich mit steigender Gebrauchsklasse höhere Gefährdungen. Die Einteilung ist mit steigender Gefährdung definiert über Insekten, holzerstörende und

holzverfärbende Pilze, Moderfäule und Holzschädlinge im Meerwasser als biotische Schädigungen und der Auswaschungsbeanspruchung als abiotischer Faktor.

Zusätzlich werden Holzarten nach DIN EN 350-1: 1994 in verschiedene Dauerhaftigkeitsklassen eingeteilt. Bei der natürlichen Dauerhaftigkeit gegenüber holzerstörenden Pilzen wird unterschieden in Freilandversuchen und Laborversuchen (z.B. EN 113: 1996 - Basidiomyceten). Auf Grundlage der EN 113: 1996 werden in dieser Arbeit Versuche durchgeführt.

Chemisch-vorbeugender Holzschutz soll durch Maßnahmen aus dem baulichen Holzschutz vermieden werden. In einigen Fällen ist chemisch-vorbeugender Holzschutz jedoch unabdingbar. Die je nach Gebrauchsklasse der Bauteile erforderlichen Prüfprädikate sind in der DIN 68800-3: 2012 definiert. Pilzwidrige Holzschutzmittel in Bezug auf Basidiomyceten mit dem Prüfprädiikat P sind nach genannter Norm in den Gebrauchsklassen 2, 3.1, 3.2, 4 und 5 erforderlich. HSM unterliegen dem Biozidrecht und müssen ein Zulassungsverfahren durchlaufen. In Abhängigkeit der Gefährdungsklassen steigen zusätzlich die Anforderungen an die Eindringtiefen und Aufnahmemengen der entsprechenden HSM in das Holz. Um möglichst hohe Eindringtiefen zu realisieren, sind in Abhängigkeit von der Tränkbarkeit der Holzart, Einbringverfahren wie das Kessel-Vakuum-Druck oder das Wechseldruckverfahren zu verwenden (Binker et al. 2014).

Die Einteilung der chemisch vorbeugenden HSM erfolgt in: a) Wasserlösliche Schutzmittel, b) Lösemittelhaltige Schutzmittel, c) Steinkohleteeröle (Kreosote) und d) Emulsionen und Mikroemulsionen (Mai & Militz 2012).

Um die Auswaschung der wasserlöslichen HSM zu verhindern, sind Fixierungsstoffe notwendig. Zugelassen dafür ist Chrom(VI)-oxid. Chrom (Cr) selbst hat keine biozide Wirkung. Das in einigen wasserlöslichen HSM verwendete Cr(VI) ist giftig und kanzerogen. Das Cr(VI) wird durch die Reaktion mit Holzinhaltsstoffen zu weniger giftigen Cr(III) reduziert. Chrom-Kupfer-Verbindungen (CK-Salze) wirken biozid gegenüber Moderfäule, jedoch haben sie eine geringere Wirksamkeit gegenüber kupfertoleranten Braunfäulepilzen (Mai & Militz 2012).

Die Verbindung von Kupfer aus verschiedenen kupferbasierenden HSM mit den Holzkomponenten von *Pinus sylvestris* L. wurden untersucht. Demnach reichert sich Kupfer vor allem in Holzstrahlen und den direkt umgebenden Tracheiden, in Harzkanälen und dem Interzellularraum an. Die spezifische Verteilung in den Zellwänden ist abhängig vom HSM (Evans et al. 2013). Im Lumen der Zellen wurden ebenso kupferhaltige Partikel von kupferbasierenden HSM nachgewiesen (Stirling et al. 2008).

Das in dieser Arbeit verwendete Kupfersulfat ist ein wasserlösliches, kupferbasiertes HSM. Es ist jedoch als Biozid (Fungizid) für HSM nach Biozidrecht nicht zugelassen. Es wurde sich dennoch für die Verwendung von Kupfersulfat als Modellsubstanz entschieden, da es in der Historie im technischen Umfang eines der am meisten verwendeten HSM ist (Becker 1967). Dieses Salz ist ein altbewährtes HSM und wurde bereits im 1838 patentiertem Boucherieverfahren eingesetzt.

Die Einbringmengen betragen dabei 6 bis 8 kg/m<sup>3</sup> abhängig von der Konzentration der Lösung. Reines Kupfersulfat bildet blaue und in Wasser lösliche Kristalle. Kupfersulfat in Lösung reagiert sauer und greift Metalle an. (Liese 1954). Zudem schwankt die Gebrauchsdauer der behandelten Hölzer stark. Zum einen auf Grund von Auswaschungseffekten (Rabanus 1940), da keine Fixierungskomponente enthalten ist und im Zusammenhang mit der Einbausituation des Holzes und zum anderen durch den Angriff von Pilzen, die mit dem Kupfersulfat in eine chemische Wechselwirkung treten (Liese 1954). Das Biozid (Fungizid) im Kupfersulfat ist das Kupfer-Ion. Spezielle Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass auch das Sulphat-Ion eine bedeutende Rolle als toxisches Mittel gegen Basidiomyceten spielt (Leithoff & Melcher 1999).

#### 1.1.4 Kupfertolerante Pilze

Einige Braunfäule-erregende und Weißfäule-erregende Pilze können Holz trotz Schutzimprägnierung auf Kupferbasis abbauen (Young 1961; Arantes et al. 2012; Schmidt 2007; Clausen et al. 2000; Clausen & Green 2003; DeGroot & Woodward 1999; Collett 1992; Sierra-Alvarez 2007).

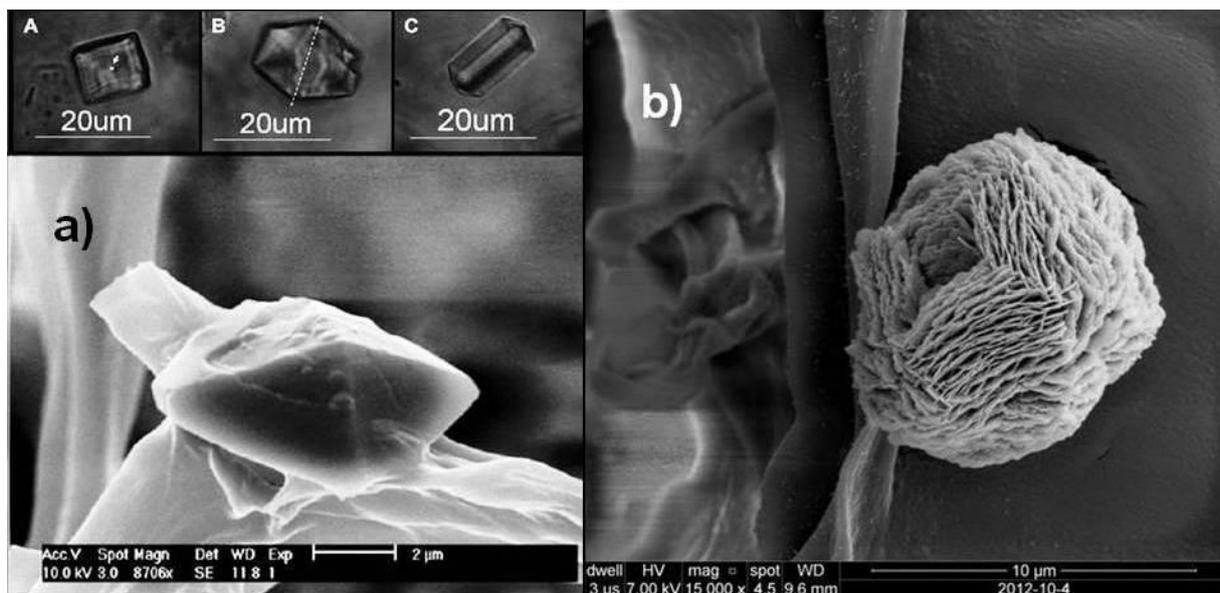
Kupfertoleranz ist die relative Fähigkeit eines Organismus trotz der Gegenwart von Kupfer-Ionen zu wachsen (Hastrup et al. 2005). Seit mehr als über 70 Jahren sind kupfertolerante Pilze bekannt (Green & Clausen 2005). Der vollständige und komplexe Mechanismus des Holzabbaus durch diese Pilze ist jedoch noch nicht gänzlich aufgeklärt (Schilling et al. 2013), jedoch produzieren auch diese Pilze Oxalsäure. Forschung und Industrie zeigen erneutes Interesse an dieser Thematik, da kupferbasierte HSM ohne Arsen und Chrom aus arbeitsschutzrechtlichen Aspekten und umweltschonenden Gründen wieder vorrangig verwendet werden sollen (Arantes et al. 2012).

Die natürliche Besiedlung des Holzes von Pilzen wird trotz Schutzmittelbehandlung beibehalten, solange die Schutzmittelkonzentration nicht toxisch für den Pilz ist. Zudem sind die Besiedlungswege der Pilze im Holz gleichsam der Wege, die das Schutzmittel durch das Holz bei der Imprägnierung nimmt (Liese 1975).

Bekannt für kupfertolerante Pilze ist die Tatsache der Ausfällung von CuOx. Über die genauen biochemischen Hintergründe ist jedoch auch in diesem Bereich bisher kein vollständiges Verständnis erreicht (Cervantes & Gutierrez-Corona 1994). Offensichtlich nachgewiesen sind Formationen von CuOx und CaOx in Form von Kristallen in unterschiedlichsten Ausprägungen (Abbildung 4) durch Aufnahmen entstanden unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM).

Für die Bildung von CuOx müssen zwei Bedingungen gegeben sein:

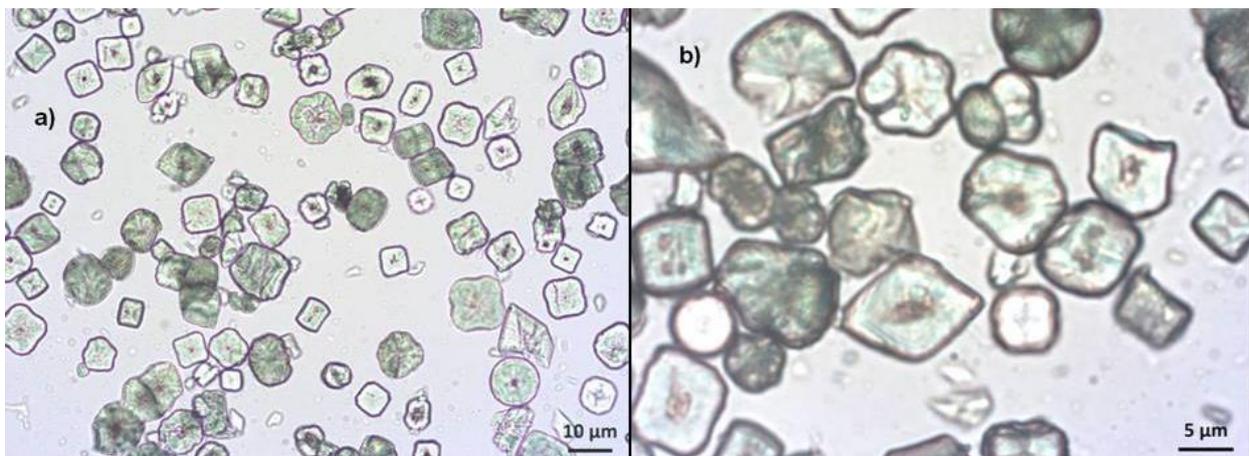
- a) Vorhandensein von Hyphen und Oxalsäure eines kupfertoleranten Pilzes (z.B. *Pp*)
- b) Anwesenheit von einem kupferbasierendem HSM (z.B. Kupfersulfat) in einer für den Pilz nicht-toxischen Konzentration



**Abbildung 4:** REM-Aufnahmen a) CaOx nach Guggiari et al. 2011 als Weddellit und darüber in 3-Achs-Ansichten (A-C); b) CuOx als Moolooit, Bild zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Möller, BASF Wolman GmbH

Die Oxalsäure ( $C_2H_2O_4$ ) des Pilzes tritt in biochemische Wechselwirkungen mit dem Kupfersulfat-Pentahydrat ( $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ) und fällt dabei unlösliches, nicht-toxisches Kupferoxalat-Hydrat ( $CuC_2O_4 \cdot nH_2O$  mit  $0 \leq n < 1$ ) als Moolooit aus. Kupfer in zu hohen Konzentrationen ist toxisch für tolerante Pilze (Clausen & Green 2003). Andererseits kann eine geringe Kupferkonzentration auch stimulierend auf tolerante Pilze wirken und den Holzabbau beschleunigen (Clausen et al. 2000; Freeman & McIntyre 2008).

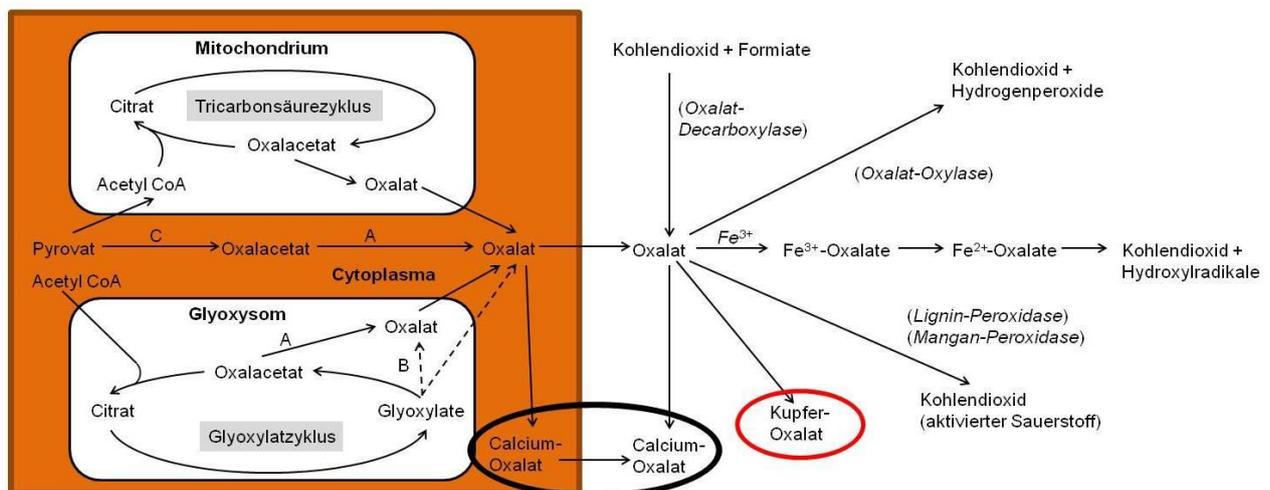
Unter dem Lichtmikroskop sind die unterschiedlichen Formen und Ausprägungen von CuOx zu sehen. Form und Farbe variieren stark. Durch ihre stark gelayerte Struktur (Moolooit) sind sie jedoch schwer als klares Bild zu fokussieren (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** lichtmikroskopische Aufnahmen von CuOx aus Ausfällungen der Basidiomyceten *Poria placenta*, *Antrodia vaillantii* und *Tyromyces palustris* a) Kristalle 400er Vergrößerung; b) Kristalle 1000er Vergrößerung

In der Literatur gibt es lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Abbildungen über die Ausprägungsformen von CaOx und CuOx im Zusammenhang mit holzerstörenden Pilzen und unter anderen spezifischen Bedingungen. CaOx wird entweder als Weddellit oder Whewellit mit glatter Oberfläche ausgefällt (Guggiari et al. 2011). CuOx wird als stark gelayertes Moolooit ausgefällt (Fomina et al. 2005).

Eine initiale Bildung von CaOx-Kristallen bei holzerstörenden Pilzen wird im Protoplasten der Hyphe beschrieben (Dutton & Evans 1996). Die Ausfällung von CuOx wird in diesem Review in Zelllumen, auf der Holzoberfläche und im Mycel beschrieben. *Pp* fällt dabei auch mikrokristalline Strukturen aus, die die Hyphen ummanteln. Diese enthalten CuOx in mit Kupfersulfat behandeltem Holz. Die Bildung von CuOx findet extrazellulär statt (Abbildung 6) (Dutton & Evans 1996).



**Abbildung 6:** Stoffwechselforgänge von Oxalat-Biosynthese und -abbau übersetzt nach Dutton & Evans 1996; A – Oxalacetase; B – Glyoxylat-Dehydrogenase; C – Pryvat-Carboxylase; CaOx innerhalb und außerhalb der Hyphe (schwarz eingekreist) und CuOx außerhalb der Hyphe (rot eingekreist)

## 1.2 Aufgabenstellung

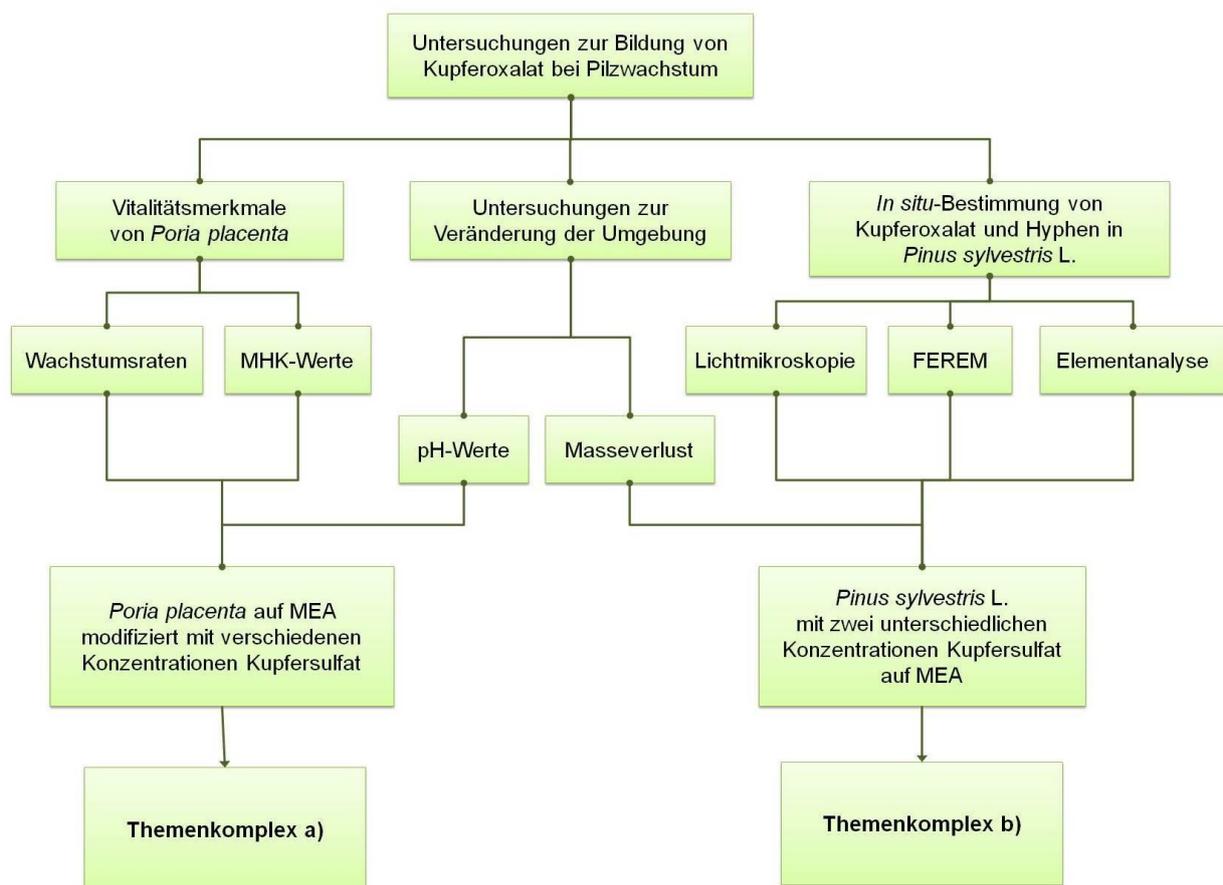
Hauptzielstellung der Arbeit ist es, die Ausfällung von CuOx lokal im Holz zu bestimmen (*in situ*). Dazu werden vor dem Hintergrund der beschriebenen Themenkomplexe Untersuchungen im Labor durchgeführt. Dabei soll der Ausfällungsort im Zusammenhang mit den Hyphen gebracht werden (intrazellulär/extrazellulär). Zusätzlich werden Wachstumseigenschaften und Toleranzverhalten sowie umgebungsverändernde Parameter des Prüfpilzes analysiert.

## 2. Material und Methoden

Vorbereitend zu den Lokalitätsanalysen des CuOx werden Vitalitätsmerkmale des Prüfpilzes *Pp* ermittelt. Zusätzlich werden umgebungsverändernde Parameter des Pilzes festgehalten (Abbildung 7). Wachstumsraten, Mindesthemmkonzentrationen (MHK-Werte) und pH-Werte werden auf Malzextrakt-Agar (MEA) modifiziert mit verschiedenen Konzentrationen von Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) ermittelt. Die genannten Daten werden zweimalig in zwei Versuchsreihen (VRs) ermittelt.

Die *in situ* Untersuchungen und die Ermittlung des Masseverlustes werden an *Pinus sylvestris* L. Proben mit zwei unterschiedlichen Wirkstoffaufnahmen (WA) von Kupfer mit jeweils zwei unterschiedliche Dimensionsabmessungen erfasst.

Die Untersuchungen werden auf Grund ihrer verschiedenen Verfahren (mit und ohne *Pinus sylvestris* L.) im Verlauf dieser Arbeit in 2 Themenkomplexe eingeteilt.



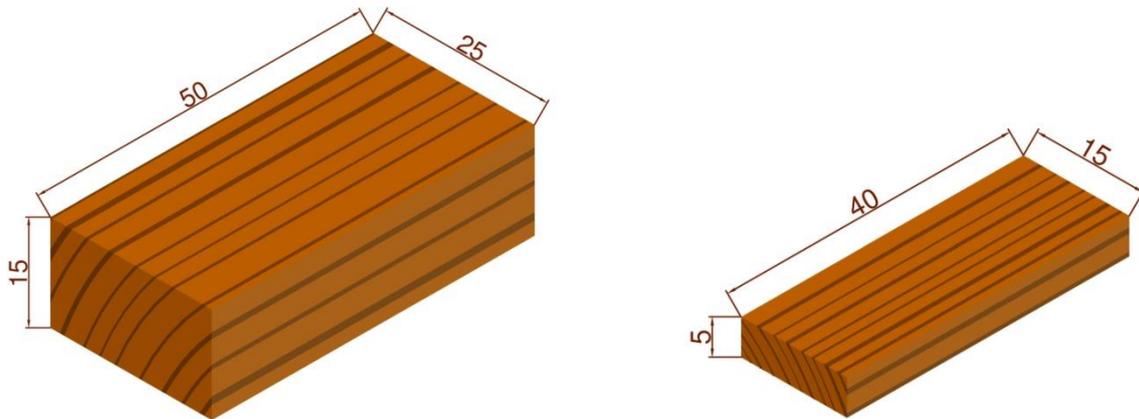
**Abbildung 7:** Schema des Untersuchungsverfahrens

Die Probenvorbereitung und -behandlung sowie die Durchführung der Versuchsreihe 1 wurde von BASF Wolman GmbH vorgenommen.

## 2.1 Probenmaterial

Der Braunfäule-erregender Basidiomycet *Poria placenta* (Fries) ist der verwendete Prüfpilz nach EN 113: 1996 in dieser Arbeit. Dieser Pilz ist vom gezüchteten Stamm FPRL 280 / DSM 3088 aus der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Berlin und wurde vom Biologielabor der BASF Wolman GmbH in Sinzheim am 11. April 2007 erhalten.

Gemäß EN 113: 1996 wird das Splintholz von *Pinus sylvestris* L. als Holz für die Laborprüfung verwendet. Für den Versuchsaufbau werden Holzproben mit zwei unterschiedlichen Dimensionsabmessungen verwendet (Abbildung 8). Die Maßangaben sind mit einer Toleranz von 0,2 mm angegeben. Einige Probekörper entsprechen dem Probenvolumen nach EN 113: 1996, die anderen entsprechen einem Volumen in Anlehnung an den Versuchsaufbau von Bravery 1979. Die Bravery-Prüfkörper sind bewusst größer dimensioniert worden um das Risiko des Waterlogging-Effektes zu mindern.



**Abbildung 8:** Dimensionsabmessungen der Proben; links nach EN 113: 1996 und rechts in Anlehnung an Bravery 1979

Als kupferbasierendes HSM wird in demineralisiertem Wasser gelöstes Kupfersulfat-Konzentrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  - Kupfersulfat-Pentahydrat) verwendet. Kupfersulfat (auch Kupfervitriol) ist in der Historie ein häufig verwendetes und in der Literatur vielfach diskutiertes HSM.

## 2.2 Probenvorbereitung und Behandlung

- a) Vorbereitung der Petrischalen mit Nährmedium und Prüfpilz zur Ermittlung der Wachstumsraten, der MHK-Werte und der pH-Werte

Die Abweichung in der Methodik zur Ermittlung der Grenzwerte zur EN 113: 1996 besteht darin, dass diese durch Versuche auf MEA ohne Holzproben ermittelt werden. Aus der Bestimmung der Wachstumsraten auf MEA werden die MHK-Werte in dieser Arbeit abgeleitet.

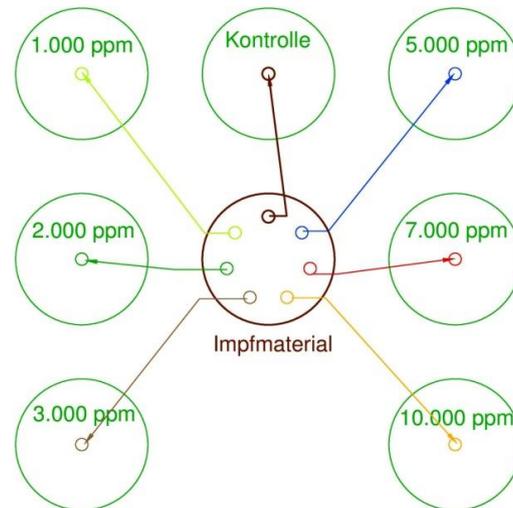
Zur Bestimmung der Wachstumsraten wird der Prüfpilz mittig auf ein Nährmedium in Petrischalen aus Kunststoff gegeben. Das Nährmedium der Stammkultur des Prüfpilzes besteht aus 4% Malzextrakt und 3% Agar sowie demineralisiertem Wasser. Eine VR besteht aus der Kontrolle ohne HSM (Konzentration 0) und 6 weiteren Proben. Die weiteren Proben enthalten im Nährmedium zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen des Wirkstoffes Kupfer aus in demineralisiertem Wasser gelöstem Kupfersulfat. Die genannten Reagenzien werden gewogen und unter ständigem Rühren in einem Glasgefäß auf einem Heizrührer erhitzt bis sie vollständig gelöst sind. Das Grundnährmedium wird 20 Minuten lang im strömenden Wasserdampf bei 121 °C im Autoklav sterilisiert.

Die entsprechenden Mengen von Kupfersulfatlösungen für die 6 Kupfer-Konzentrationen der VRs werden in separate Reagenzgläser mit Schraubverschluss gefüllt. Nach dem Sterilisieren werden die Gefäße mit dem Grundnährmedium gewogen. Anschließend werden diese zum Warmhalten in ein 60-70 °C heißes Wasserbad gestellt. Die 6 entsprechenden Mengen der Kupfersulfatlösung werden nun zu dem Grundnährmedium pipettiert, geschüttelt und davon anschließend ca. 20 ml in die entsprechenden Petrischalen mit einem Durchmesser von 85 mm gefüllt. Nachdem der Nährboden vollständig und auf waagrechttem Untergrund abgekühlt ist, wird er mit dem Prüfpilz beimpft. Die verwendete Waage ist die Präzisionswaage Mettler Toledo PG 5002 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland).

Das Impfmateriale des Prüfpilzes *Pp* wurde 15 Tage vor dem Animpfen ebenfalls in Petrischalen auf MEA angesetzt und in einem Klimaraum mit  $65 \pm 5$  % relativer Luftfeuchte und  $20 \pm 2$  °C konditioniert.

Von dem Impfmateriale wird jeweils mittels eines Korkbohrers mit 8 mm Innendurchmesser ein ebenso großes Impfstück ausgestanzt und mittig auf das jeweilige Nährmedium der vorbereiteten Petrischalen platziert (Abbildung 9). Der Korkbohrer wird vorher über einen Brenner gehalten. Somit findet eine Entfernung und Reinigung von noch eventuell vorhandenen Mycelresten vorangegangener Benutzung statt. Da mehrere Impfstücke aus einem Impfmateriale genommen werden, ist darauf zu achten, die Impfstücke ringförmig, mit immer gleichen Abstand zum Mittelpunkt auszustanzen. So bleiben die Impfstücke vergleichbar in ihren Grundeigenschaften, da sie erstens

von einem gemeinsamen Impfmateriale sind und zweitens aus derselben Vitalitäts- bzw. Alterszone stammen.



**Abbildung 9:** Konzentrische Ausstattung des Impfmateriale und Verteilung auf die präparierten Petrischalen; Zahlenwerte in den Petrischalen beziehen sich auf Kupfer (Cu) in ppm

- b) Vorbereitung der Holzproben in Koll- und Petrischalen auf MEA mit Prüfpilz zur Bestimmung des Masseverlustes und anschließender Lichtmikroskopie sowie Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM) und Elementanalyse

Die großen Holzproben, wie unter 2.1 beschrieben, haben ein Volumen von 18,75 cm<sup>3</sup>, die kleineren Proben ein Volumen von 3,00 cm<sup>3</sup>. Mit Hilfe des Klimagewichtes bei ca. 12 % Holzfeuchte und der Volumenausdehnung der Holzproben, wird die jeweilige Rohdichte ermittelt:

$$\rho_{\omega} \left[ \frac{kg}{m^3} \right] = \frac{\text{Klimagewicht [kg]}}{\text{Klötzchenvolumen [m}^3\text{]}} \quad (1)$$

Aus statistischen Berechnungen ergeben sich Abweichungen zum Mittelwert der Rohdichte (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Abweichungen der Extremwerte der Rohdichte in Bezug auf den Mittelwert

Probenvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Behandlung	Rohdichten				
		Minimum		Mittelwert	Maximum	
		[kg/m <sup>3</sup> ]	Abweichung [%]	[kg/m <sup>3</sup> ]	[kg/m <sup>3</sup> ]	Abweichung [%]
3	Kontrolle	482	10,4	538	567	5,4
	Kupfersulfat	472	16,2	563	741	31,6
18,75	Kontrolle	448	14,0	521	586	12,5
	Kupfersulfat	441	16,6	529	618	16,8

Die Proben, insgesamt 84 Stück, werden in wässrigen Lösungen Kupfersulfat getränkt und einige als Kontrolle unbehandelt gelassen. Dabei werden einige Proben mit der Lösung mit einer höheren Konzentration Kupfersulfat und einige mit der niedrigeren Konzentration Kupfersulfat getränkt.

Die beiden Konzentrationen der Tränklösungen sollen 1,25 und 2,5 Gewichtsprozent Kupfersulfat aufweisen, wobei der Gehalt an Kupfer 7,5 % im Kupfersulfat-Konzentrat beträgt. Diese Angaben sind für anschließende Berechnungen in der Auswertung notwendig.

Die Konzentrationen der Tränklösungen ( $c_{TL}$ ) für die jeweils benötigten Lösungsmengen von Kupfersulfat-Konzentrat in demineralisiertem Wasser werden wie folgt berechnet:

$$(Ist)c_{TL} [Gew. \%] = \frac{(Ist)Einwaage\ Konzentrat [g] * 100}{(Ist)Einwaage\ Gesamtlösung [g]} \quad (2)$$

wobei gilt:

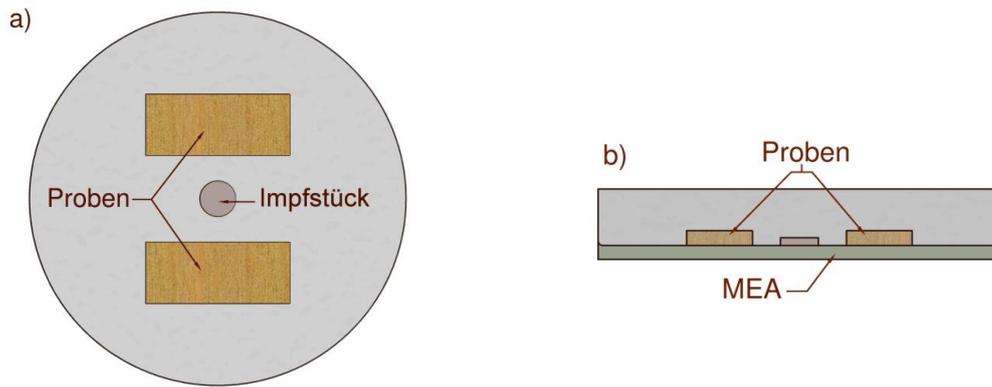
$$(Soll)Einwaage\ Konzentrat [g] = \frac{(Soll)Einwaage\ Gesamtlösung [g] * (Soll)c_{TL}}{100} \quad (3)$$

Die Einwaagen der Gesamtlösungsmengen werden für die Berechnungen vorher sinnvoll abgeschätzt und zusammen mit den Soll-Konzentrationen als Berechnungsgrundlage verwendet (Anlage Tabelle 8). Die Anzahl der Proben mit der jeweiligen Behandlung ist unterschiedlich. Es werden weniger Kontrollen als behandelte Proben verwendet (Tabelle 2).

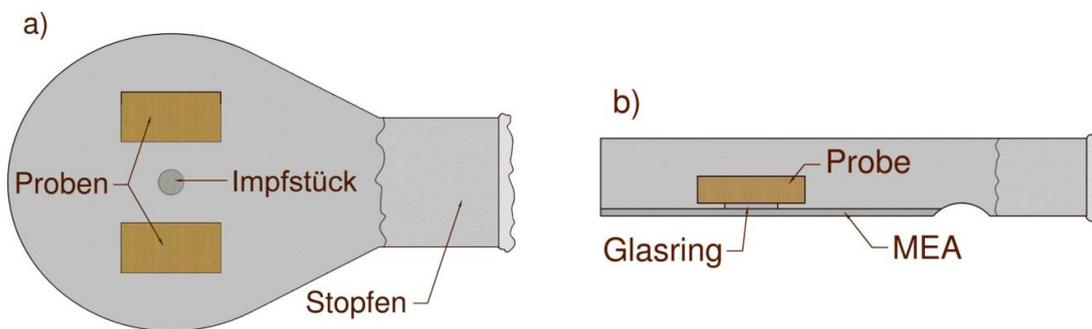
**Tabelle 2:** Anzahl der Holzproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupfersulfat in den Tränklösungen (in Gewichtsprozent) und Kontrollen

		Kontrolle [Stück]	Tränklösung Kupfersulfat [ Gew.-% ]	
			1,25	2,5
Probenvolumen	3,00	12	15	15
[cm <sup>3</sup> ]	18,75	12	15	15

Das Tränkungsverfahren der Prüfkörper erfolgt nach EN 113: 1996. Zur Fixierung des Schutzmittels wurden 11 Tage angesetzt. Innerhalb dieser Tage im Glasbehälter wurden die Proben nach 5 und 9 Tagen zur schnelleren Trocknung gewendet. Danach folgte der Einbau der Proben. Von den kleinen Proben werden jeweils 2 Stück in die vorbereiteten Petrischalen auf den MEA (4% Malzextrakt, 2% Agar) gelegt. Die großen Proben werden auf Glasringen in Kolleschalen mit MEA (ebenfalls 4% Malzextrakt, 2% Agar) eingebaut. Proben mit gleicher Behandlungsart wurden immer zusammen und paarweise in die Behältnisse eingebaut (Abbildung 10 und Abbildung 11). Anschließend werden diese während der Versuchsdurchführung im Klimaraum bei  $70 \pm 5$  % relativer Luftfeuchte und  $22 \pm 2$  °C gelagert.



**Abbildung 10:** schematischer Aufbau der Petrischalen mit den kleinen Proben; a) Draufsicht und b) Seitenansicht



**Abbildung 11:** schematischer Aufbau der Kolleschalen mit den großen Proben; a) Draufsicht und b) Seitenansicht

### 2.3 Messungen und Verfahren

Die Messungen für Wachstumsraten, MHK-Werte und pH-Werte werden zweimalig durchgeführt. Aus den beiden VRs ergeben sich verschiedene Mycelalter (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Überblick des Mycelalters in den beiden VRs

	Impfmaterial vom	Herstellung Petrischalen	Mycelalter [d]	
			VR 1	VR 2
VR 1	17.07.2014	01.08.2014		
VR 2	29.07.2014	01.08.2014		
Wachstumsraten	Startdatum	04.08.2014	18	
		29.08.2014		31
MHK-Werte	Startdatum	04.08.2014	18	
		29.08.2014		31
pH-Werte	Messung	03.09.2014	48	
		12.09.2014		45

Zur Ermittlung der Wachstumsraten von *Pp* auf MEA wurde das Mycelwachstum 2 Wochen lang erfasst. Die verschiedenen Petrischalen mit MEA enthielten unterschiedliche Konzentrationen des Kupfersulfates und eine Kontrolle. Die verwendeten Konzentrationen sind 0 (Kontrolle), 1.000, 2.000, 3.000, 5.000, 7.000 und 10.000, jeweils gemessen in ppm Cu (parts per million Kupfer). Die Ausdehnung des Mycels wurde täglich mit dem Lineal kreuzweise ausgemessen und die beiden Werte gemittelt und notiert. Die Grenze der Mycelausdehnung als verwertbarer Datensatz ist bestimmt durch den Innendurchmesser der Petrischalen mit 85 mm. Als relevantes Wachstum wurde die Mycelausbreitung mit Kontakt zum MEA erfasst. Wachstum auf dem Impfstück mit Ausbreitung des Mycels ausschließlich in der Luft ist kein statistisch erfasstes Wachstum. Am ersten Tag der jeweiligen VR hat jedes Mycel bereits einen statistischen aufgezeichneten Myceldurchmesser von 8 mm. Diese Tatsache resultiert aus dem Durchmesser des Korkbohrers beim Animpfen der Petrischalen und ist in diesem Fall gleich 0 zu setzen ( $8 \text{ mm} \triangleq 0 \text{ mm}$  Wachstum). Als Ableitung des Weges nach der Zeit ergeben sich aus den Wachstumsraten die Wuchsgeschwindigkeiten in Millimeter pro Tag (Steigung der Wachstumsraten). Die Ableitungswerte werden zusätzlich halbiert, um die Wachstumsgeschwindigkeiten der Mycel-Radien zu ermitteln.

Um die Wachstumsraten als logistische Wachstumsfunktion auszuwerten wird die Formel für Mycelwachstum nach Koch 1975 verwendet:

$$dW = \frac{S \cdot K \cdot e^{r(t_1 - t_0)}}{K - S + S \cdot e^{r(t_1 - t_0)}} \cdot dV \quad \text{mit} \quad t_1 - t_0 \geq 0 \quad (4)$$

W	Betrag der Biomasse
V	bewachsener Raum
S	anfängliches Volumen des Mycels
K	Kapazitätsgrenze
r	konstante Wachstumsrate bei uneingeschränktem Wachstum
$t_1$	bestimmter Zeitpunkt mit bestimmtem bewachsenem Raum
$t_0$	Zeitpunkt Wachstumsbeginn

Um die Formel von Koch nicht mit dem Betrag der Biomasse (keine Massenaufnahmen vorhanden), sondern mit dem Betrag des Mycelvolumens (ohne Massen) der Proben anzuwenden, müssen einige Bedingungen festgelegt werden:

- Ideelle konstante mittlere Dichte der spezifischen Mycelien im Laborversuch, d.h. die Masse steigt proportional zum Volumen (Masse = Dichte \* Volumen)
- Höhe der Mycelien wird mit 1 mm angenommen, d.h. es können alle Mycelvolumen mit der Formel Höhe \*  $\pi$  \* Radius<sup>2</sup> ermittelt werden

Aus den beiden Annahmen folgt die Steigung des Mycelvolumens in Abhängigkeit der konstanten Dichte proportional zur Masse. Die Formel musste anschließend nach  $r$  umgestellt werden, um somit alle  $r$ -Faktoren für die vorhandenen Wachstumskurven zu errechnen und diese so zu bewerten. Logistische Wachstumskurven werden auch Sigmoidfunktionen (Weisstein 2015) genannt. Der  $r$ -Faktor für die sigmoide Funktion wird anschließend aus den  $r$ -Faktoren der Wachstumskurven geschätzt.

$$r = \frac{\ln\left(\frac{V*K-V*S}{S*K-V*S}\right)}{t_1-t_0} \quad (5)$$

#### MHK-Werte

Die MHK-Werte werden jeweils aufgrund der Datensätze der Wachstumsraten ermittelt und am Tag 7 des Pilzwachstums beurteilt und notiert. Dabei gilt folgendes Bewertungsprinzip:

- 0 kein Wachstum
- 1 der Durchmesser der Mycelausdehnung ist kleiner als bei der Kontrolle
- 2 der Durchmesser der Mycelausdehnung ist gleich dem Durchmesser der Kontrolle
- 3 der Durchmesser der Mycelausdehnung ist größer bei der Kontrolle

Die MHK-Werte werden durch zwei Grenzwerte ausgedrückt. Dabei ist der erste Wert die höchste geprüfte Konzentration, die das Hyphenwachstum nicht unterdrückt. Der zweite Wert ist die niedrigste geprüfte Konzentration, die das Hyphenwachstum vollständig unterdrückt.

#### pH-Werte

Die pH-Werte wurden aus beiden VRs gemessen. Die Messungen erfolgten mittels des Polymer-Gelelektrolyten SenTix mit dem WTW pH-Meter pH 3110 (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland). Die Messungen erfolgten in jeder Petrischale neben dem Impfstück (innen) und am Rand der Petrischalen (außen).

#### Masseverlust

Die Expositionszeit der Proben richtet sich nach der Screening-Methode (Bravery 1979) mit 6 Wochen. Die Berechnungsgrundlage für den Masseverlust sind pro Schutzmittelkonzentration (0; 1,25; und 2,5 Gew-%) und pro Volumengröße (3,00 cm<sup>3</sup> und 18,75 cm<sup>3</sup>) jeweils 4 Prüfkörper, insgesamt also 24 Holzproben. Nach dem Ausbau der Proben werden diese vor dem Wiegen mit einem Pinsel von anhaftenden Mycelresten befreit.

Der prozentuale Masseverlust berechnet sich aus dem errechneten Darrgewicht (err. DG) und dem tatsächlichen Darrgewicht mit:

$$\text{Masseverlust [\%]} = \frac{\text{errechnetes Darrgewicht [g]} - \text{tatsächliches Darrgewicht [g]}}{\text{errechnetes Darrgewicht [g]}} * 100 \quad (6)$$

Dabei gilt:

$$err. DG [g] = Klimagewicht [g] - \frac{Klimagewicht [g] * Holzfeuchte (12\%)}{100} \quad (7)$$

Das tatsächliche Darrgewicht und das ermittelte Klimagewicht werden mit der Waage Mettler Toledo AX 204 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) erfasst. Die Proben zur Ermittlung des Darrgewichtes wurden in einem Ofen über Nacht bei 103 °C gedarrt.

Für die weitere Auswertung der Ergebnisse und für die Diskussion werden die vorhandenen Daten in andere Größen umgerechnet (Anlage Tabelle 9). Die Lösungsaufnahmen (LA) pro Volumeneinheit in *Pinus sylvestris* L. wird aus der Differenz der Proben vor und nach der Tränkung berechnet und in Beziehung zum Probenvolumen gesetzt:

$$LA \left[ \frac{kg}{m^3} \right] = \frac{Tränkgewicht [kg] - Klimagewicht [kg]}{Probenvolumen [m^3]} = \frac{m_1 - m_0}{V} \quad (8)$$

Die tatsächliche WA von Kupfer in den jeweiligen Proben wird wie folgt errechnet:

$$WA \left[ \frac{kg}{m^3} \right] = \frac{LA \left[ \frac{kg}{m^3} \right] * c_{TL} [\%] * Wirkstoffgehalt \text{ im Kupfersulfatkonzentrat } [\%]}{10.000} \quad (9)$$

Aus der resultierenden Statistik für die WA werden weiterführend die Mittelwerte verwendet, d.h. 0,7 kg/m<sup>3</sup> Kupfer und 1,4 kg/m<sup>3</sup> Kupfer (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** statistische Angaben über die Wirkstoffaufnahmen (Cu) der Proben

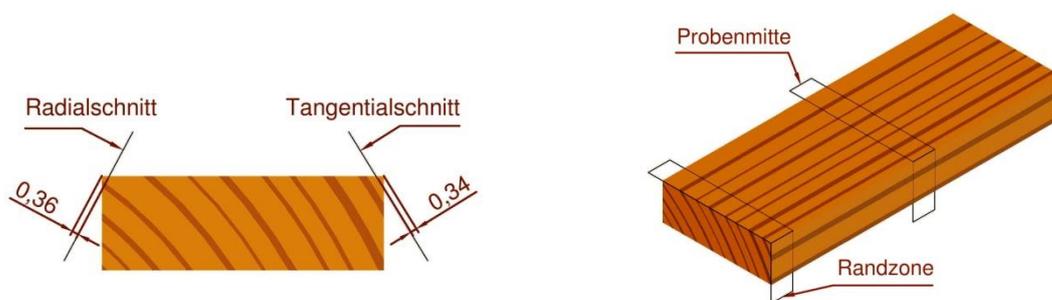
	c <sub>TL</sub> [%]		WA Cu [kg/m <sup>3</sup> ]		
			Minimum	Mittelwert	Maximum
Probenvolumen [cm <sup>3</sup> ]	3,00	1,25	0,55	0,67	0,73
	18,75		0,61	0,66	0,71
	3,00	2,50	1,19	1,37	1,50
	18,75		1,26	1,36	1,48

Alle aufgenommenen Werte (Wachstumsraten, MHK-Werte, pH-Werte und Masseverlust) und die Grunddaten (Schutzmittelkonzentrationen, Einbringmengen, Probennummern, etc.) werden in eine vorformatierte und standardisierte Excel-Datei eingetragen. Excel als Tabellenkalkulationsprogramm dient als Berechnungs- und Auswertungsgrundlage der erhobenen Daten.

## 2.4 Lichtmikroskopische Analyse

Für die Arbeit am Lichtmikroskop wurde das Durchlichtmikroskop Axio Lab. A1 mit AxioCam 105 color (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Bildanalyse und -bearbeitung fand mit dem Programm Zen lite 2012 von Zeiss statt.

Für die Lichtmikroskopie wurden von den Holzproben dünne Teilstücke unter Verwendung des Mikrotoms Leica SM 2400 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) geschnitten. Die Schnitte stammen aus Bereichen direkt unter der Holzoberfläche bis maximal zwei Millimeter Tiefe, sowohl aus den Randzonen als auch aus den Probenmitten (Abbildung 12). Für die Mikrotomschnitte aus der Probenmitte wurden die Hölzer zersägt. Die 15 Mikrometer dicken Mikrotomschnitte wurden auf einen Objektträger gelegt, in ein Einbettmedium für Dauerpräparate gelegt und mit einem Deckglas abgeschlossen. Unter dem Mikroskop wurden die Schnitte ausgerichtet, entsprechende Aufnahmen gemacht und diese abgespeichert und bearbeitet.



**Abbildung 12:** Schnittbereiche und -tiefen (Maßangaben in mm als Richtwerte) der Mikrotomschnitte in Ansichten

## 2.5 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM)

Für die Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM), englisch field-emission scanning electron microscopy (FESEM), wurde das Quanta FEG Type 250 (FEI, Eindhoven, Niederlande) verwendet.

Zur Vorbereitung der Prüfkörper für das FEREM wurden geeignete Proben präpariert. Dazu wurden Teilstücke manuell heraus geschnitten und auf die entsprechend nummerierten Stubs der FEREM-Vorrichtung geklebt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 60 °C im Ofen getrocknet. Danach erfolgte das Bedampfen der Proben (Sputter Coating) mit Gold für ca. 165 Sekunden. Nach dem Besputtern sind die Proben vorbereitet für das FEREM. Das Sputtern fand mit dem SC 510 SEM Coating System (Bio-Rad Microscience Division, Hercules, Kalifornien, USA) statt.

Es wurden die Oberflächen ausgewählter Proben untersucht.

---

## 2.6 Elementanalyse

Für die Elementanalyse mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse, englisch energy dispersive X-ray microanalysis (EDXA), wurde das Gerät Hitachi S520 (Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan) verwendet. Die Bildbearbeitung fand mit DISS 5 - Digital Image Scanning System (Point Electronic, Halle, Deutschland) statt. Die Analysevorrichtung ist mit einer Software zur Elementanalyse (Getac Instrumentenbau GmbH, Mainz, Deutschland) ausgestattet.

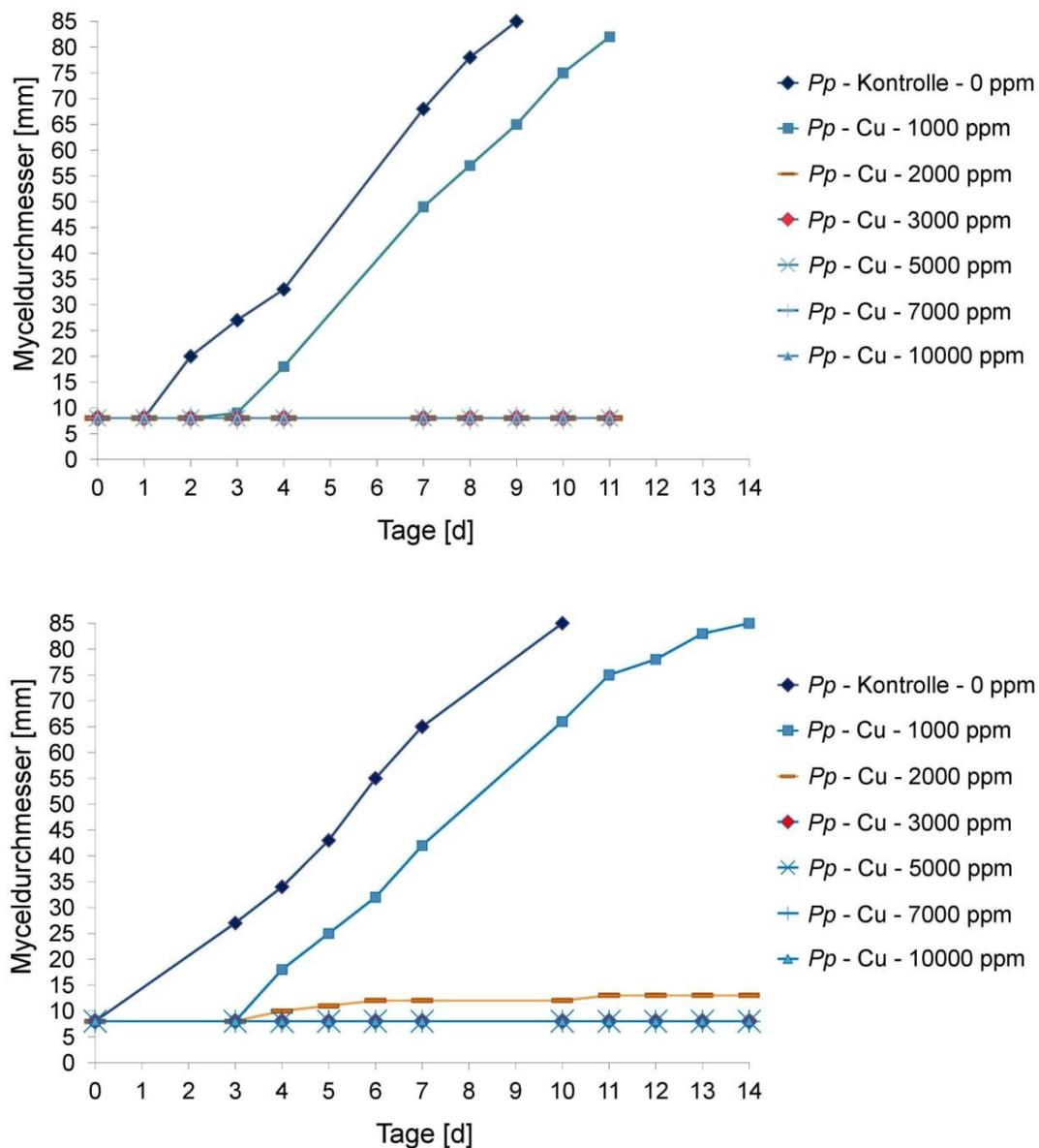
Die präparierten und zugeschnittenen Prüfkörper für die Elementanalyse wurden bei -80 °C mit dem Gerät Alpha 2-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) über Nacht gefriergetrocknet. Die Proben wurden auf den Stubs der EDXA-Vorrichtung angebracht und anschließend mit Kohle (bei ca. 7-8 Volt) bedampft. Das Sputter Coating mit Kohlefaser fand mit der Kohlebedampfungseinheit CA 508 Evaporation PSU und dem SC 510 SEM Coating System (beides von Bio-Rad Microscience Division, Hercules, Kalifornien, USA) statt.

Bei diesen Proben wurden Elementanalysen in Form von Mappings und Punktmessungen an der Oberfläche durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

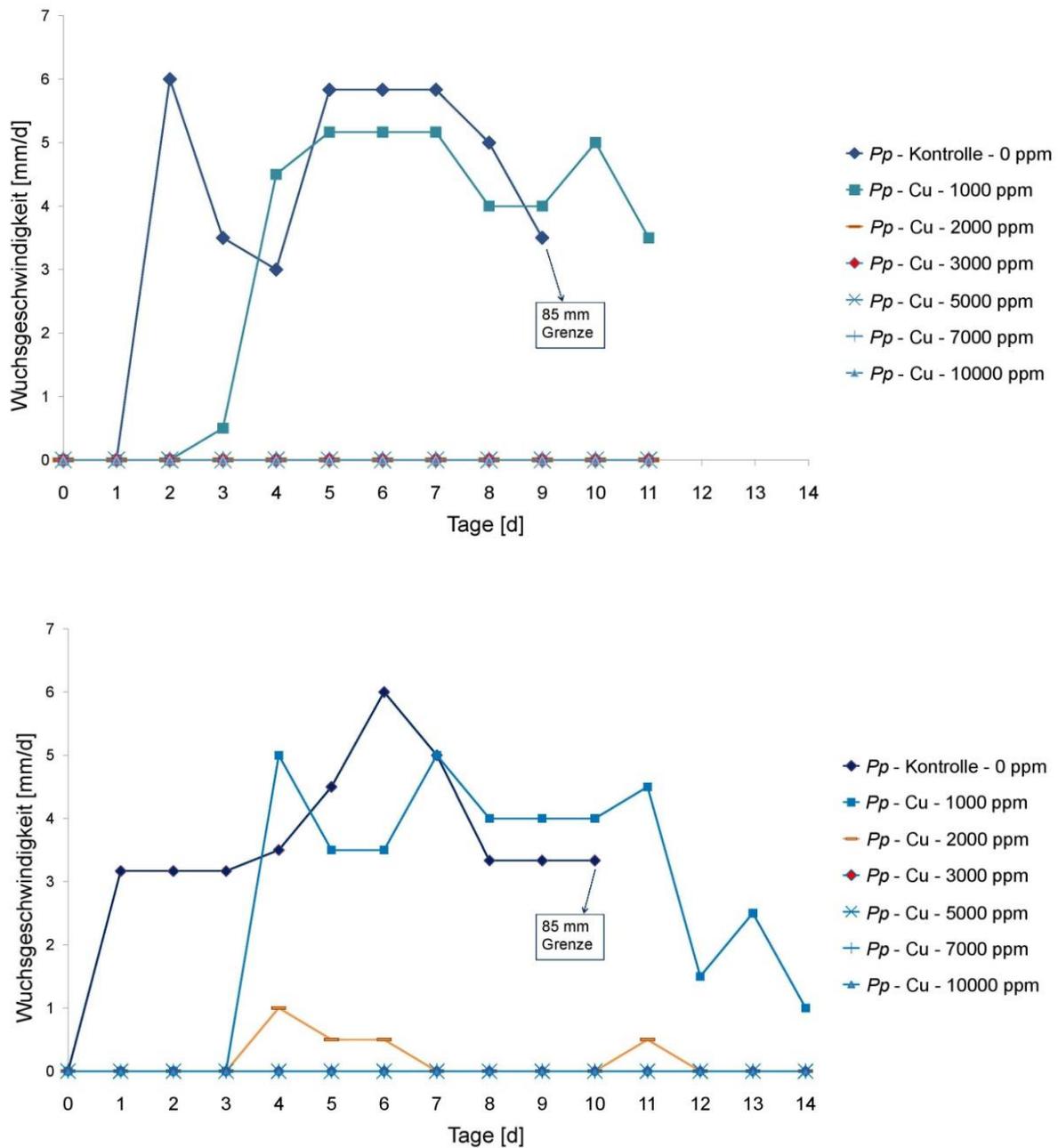
#### 3.1 Wachstumsraten

Anhand der aufgenommenen Ergebnisse der Mycelausdehnung aus beiden VRs ist zu erkennen, dass Unterschiede bestehen. In VR 1 haben nur 2 Proben ein Wachstum zu verzeichnen. Zum einen das Impfstück der Kontrolle und zum anderen das Impfstück auf dem MEA mit 1000 ppm Cu. In VR 2 ist zusätzlich das Impfstück auf dem MEA mit 2000 ppm Cu gewachsen (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Wachstumsraten (Durchmesser Mycelausdehnung) von  $Pp$  auf MEA mit verschiedenen Konzentrationen von Cu; VR 1 (oben) und VR 2 (unten)

In den Darstellungen der Wuchsgeschwindigkeiten ist die tägliche Ausdehnung des Mycels in eine Wuchsrichtung als Vitalitätsmerkmal des Pilzes besser zu erkennen und zwischen den Konzentrationen auch vergleichbar, da sich hier die Graphen auch schneiden (Abbildung 14).

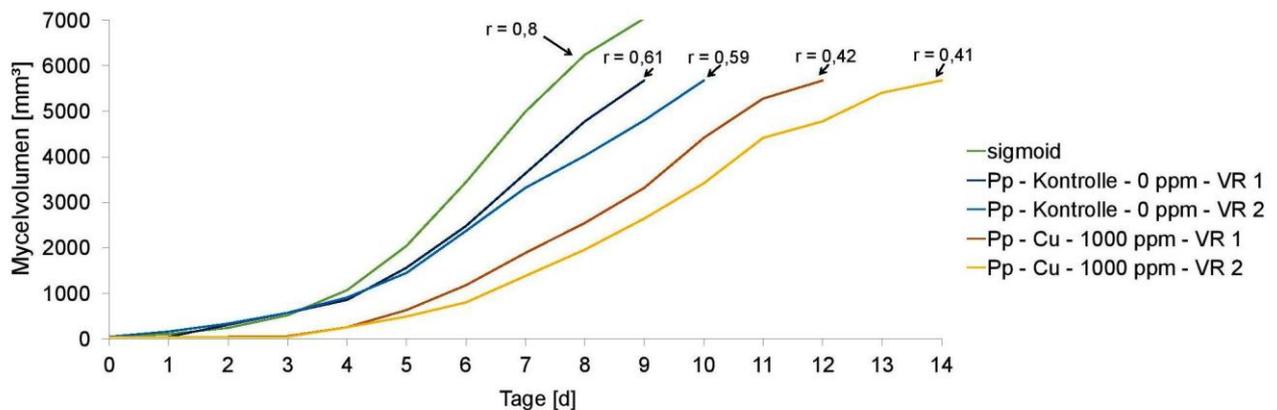


**Abbildung 14:** Wuchsgeschwindigkeiten (Radius) von *Pp* auf MEA mit verschiedenen Konzentrationen von Cu, VR 1 (oben) und VR 2 (unten)

In beiden VRs beginnt jeweils die Kontrolle mit dem Mycelwachstum. Mit unterschiedlichen Zeitabständen zwischen den VRs beginnt danach jeweils das Impfstück auf dem MEA mit 1000 ppm Cu zu wachsen. Im Vergleich zur früher gestarteten aber im Wachstum bereits fortgeschrittenen Kontrolle ist das Mycel auf 1000 ppm Cu an bestimmten Zeitpunkten schneller. Konkret

am Tag 4 und am Tag 9 in VR 1 sowie am Tag 4 und ab Tag 8 in VR 2. Die Wuchsgeschwindigkeiten der Kontrollen sind ab bestimmten Zeitpunkten nicht mehr mit denen der anderen Proben vergleichbar, da hier die Ausdehnung des Mycels bereits bei 85 mm liegt und somit die Außenkante der Petrischalen erreicht ist. Das ist am Tag 9 in VR1 und am Tag 10 in VR 2 der Fall. Die Wuchsgeschwindigkeit des Mycels auf dem MEA mit 2000 ppm Cu in VR 2 ist im Vergleich zu den anderen Proben mit festgestelltem Wachstum geringfügig und stagnierend. Die Spitzengeschwindigkeit an Tag 4 liegt bei 1 mm pro Tag. Die höchsten Wuchsgeschwindigkeiten der Kontrollen in beiden VRs liegen dagegen bei 6 mm pro Tag, gefolgt von 5 mm pro Tag der Mycelien auf dem MEA mit 1000 ppm Cu.

Für die Berechnungen der r-Faktoren werden weitere Annahmen aus den vorhandenen Wachstumskurven der Kontrollen abgeleitet, um die Berechnung nach Formel 5 fortzusetzen. Der Faktor K wird mit dem Wert von 100 mm Durchmesser (bzw. daraus resultierenden 7854 mm<sup>3</sup> Mycelvolumen) sinnvoll abgeschätzt. Der Faktor S ist in allen Proben mit 8 mm Durchmesser (Impfstück) und dem sich daraus ergebendem Mycelvolumen von 50 mm<sup>3</sup> gegeben. Als resultierende r-Faktoren wurden hier die Mittelwerte aus den einzelnen spezifischen r-Faktoren ab dem Tag des eintretenden Wachstums bis hin zur 85 mm Grenze verwendet. Aus den gegebenen Bedingungen ergeben sich unterschiedliche r-Faktoren (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** logistische Wachstumskurve (sigmoid) im Vergleich zu ausgewählten Wachstumskurven von *Pp* aus VR 1 und VR 2 mit den jeweiligen r-Faktoren

### 3.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK-Werte)

Die MHK-Werte aus beiden VRs resultieren aus den Wachstumsraten und sind folglich unterschiedlich (Tabelle 5). Demnach sind beide angegebenen Grenzwerte der MHK-Werte in VR 2 jeweils um eine Konzentrationsstufe ppm Cu höher als in VR 1. Die Bewertung der Mycelausdehnung des ersten MHK-Werts mit 1 ist jedoch in beiden VRs gleich. Das bedeutet der Durchmesser der Mycelausdehnung bei der höchsten geprüften Konzentration, die das Hyphenwachstum nicht unterdrückt, ist in beiden VRs kleiner als der, der Kontrolle.

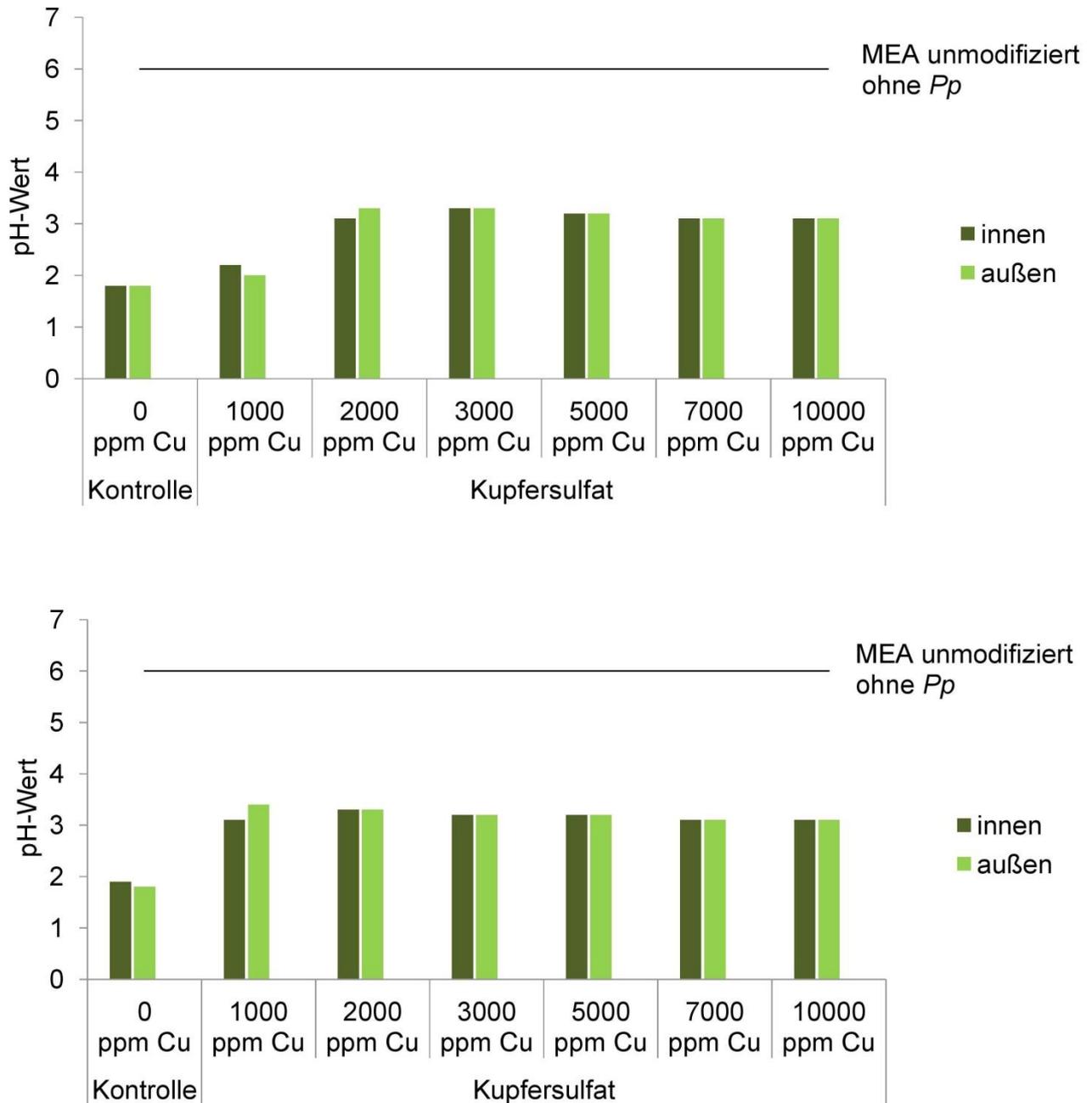
**Tabelle 5:** MHK-Werte und Bewertung der Mycelausdehnung

	MHK-Werte [ppm Cu]	Bewertung Mycelausdehnung am Tag 7	
		Wert 1	Wert 2
VR 1	1000 - 2000	1	0
VR 2	2000 - 3000	1	0

### 3.3 pH-Werte

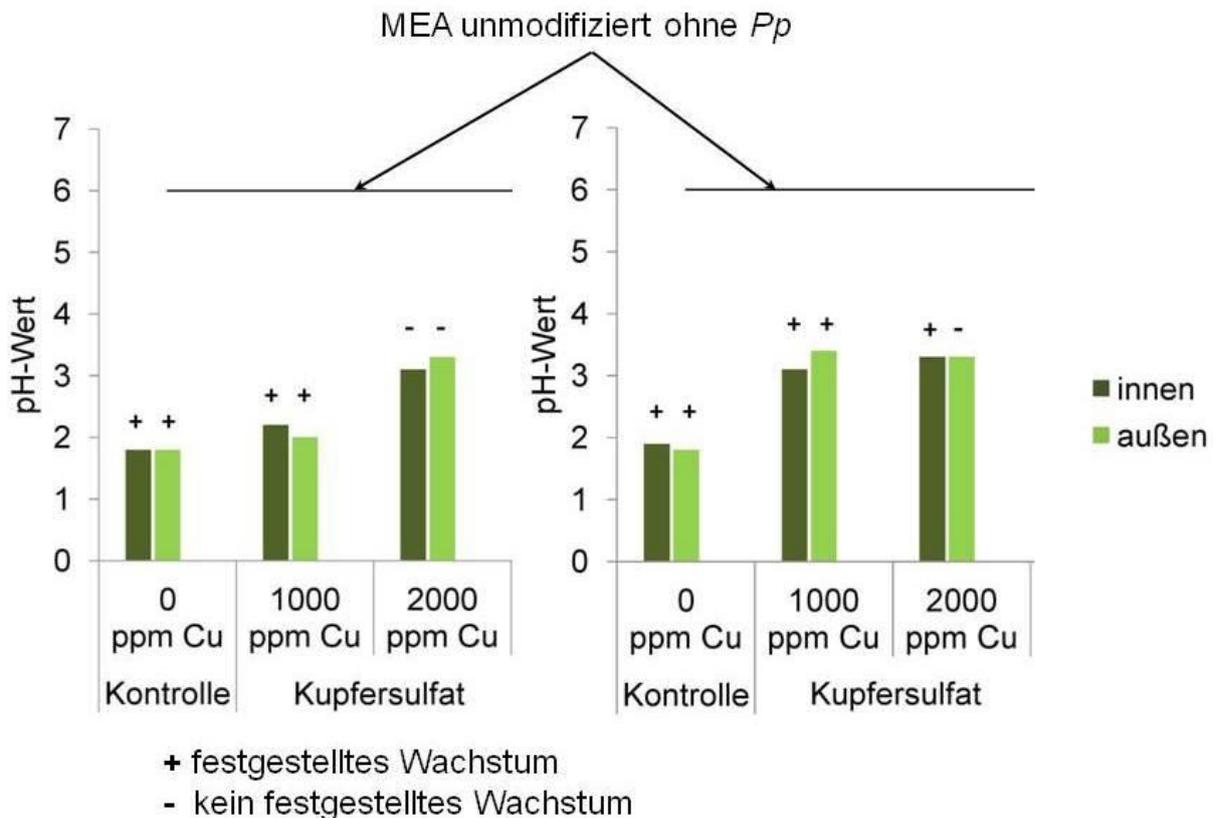
Der pH-Wert auf MEA ohne Schutzmittelmodifizierung und ohne Pilzimpfstück als Referenzwert beträgt ca. 6 (schwach sauer). Aus VR 1 weisen die beiden Proben mit Wachstum (Kontrolle und 1000 ppm Cu) mit pH-Werten um 2 ein stark saures Milieu auf dem MEA auf, sowohl innen als auch außen (Abbildung 16). Die beiden Messpunkte der Kontrollen sind dabei jeweils saurer als bei der Probe mit 1000 ppm Cu. Bei der Kupfer-Konzentration aus VR 1, die das Hyphenwachstum vollständig unterdrückt (2000 ppm Cu) ist am Messpunkt neben dem Impfstück ein leicht saureres Milieu zu verzeichnen als am äußeren Messpunkt. In der VR 2 sind nur die Messpunkte der Kontrolle und der innere Messpunkt der 1000-ppm-Cu-Konzentration deutlich saurer (Abbildung 16). Auch bei diesen Proben wurde Mycelwachstum festgestellt. Der innere Messpunkt der 2000-ppm-Cu-Konzentration hat den gleichen pH-Wert wie der äußere Messpunkt, obwohl leichtes Mycelwachstum festgestellt wurde. In beiden VRs wird der modifizierte MEA (ohne nachgewiesenes Pilzwachstum) mit zunehmender Konzentration an Kupfersulfat tendenziell leicht saurer. Die pH-Werte der Proben ohne festgestelltes Wachstum ab 3000 ppm Cu in beiden VRs sind deutlich weniger sauer als die pH-Werte der Proben mit festgestelltem Wachstum (Abbildung 16). Unterschiede gibt es im Vergleich der Proben mit festgestelltem Wachstum an beiden Messpunkten bezüglich der inneren und äußeren pH-Werte. In VR 1 weißt die Kontrolle innen und außen den gleichen pH-Wert auf, die Kontrolle in VR 2 ist jedoch am äußeren Messpunkt saurer als am inneren. Zudem ist der äußere Messpunkt saurer als der innere in VR 1 bei 1000 ppm Cu. Umgekehrt ist es in VR 2 bei 1000 ppm Cu, hier ist der innere Messpunkt saurer als der äußere. Aller-

dings sind die beschriebenen Messpunkte im direkten Vergleich der Kontrollen und der Proben mit 1000 ppm Cu in VR 1 jeweils saurer als die in VR 2 (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** pH-Werte auf MEA mit *Pp*-Impfstücken in den Petrischalen, VR 1 (oben) und VR 2 (unten) mit inneren Messpunkten (dunkelgrün) und äußeren Messpunkten (hellgrün)

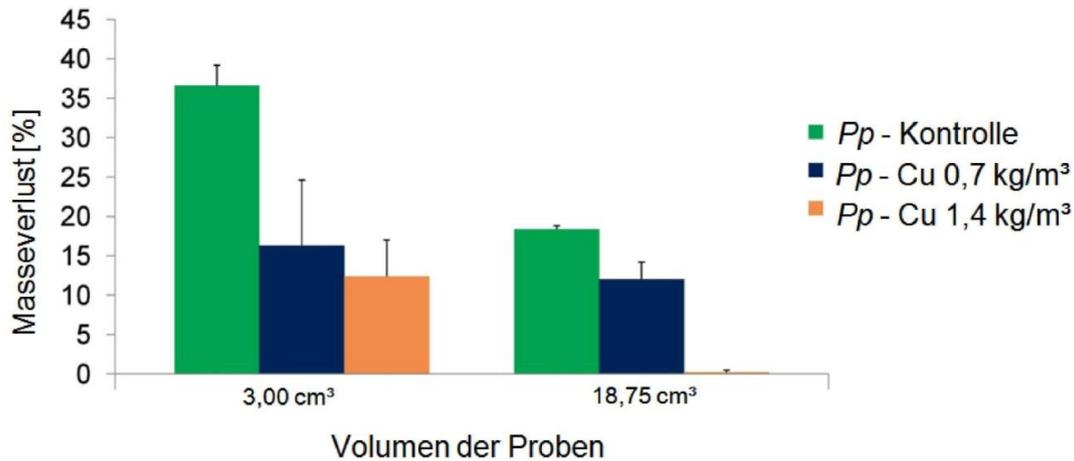
Die Ergebnisse der Wachstumsraten aus beiden VRs korrelieren mit denen der pH-Werte (Kontrollen und 1000 ppm Cu). Die pH-Werte der MEAs mit festgestelltem Wachstum weisen deutlich saurere Werte auf als die MEAs ohne festgestelltes Wachstum. Keine Korrelation ist bei den 2000 ppm Cu-Proben am inneren pH-Messpunkt in beiden VRs festzustellen (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Korrelationen zwischen Mycelwachstum (+; -) von *Pp* und daraus resultierenden pH-Werten auf MEA von ausgewählten Proben; VR 1 links und VR 2 rechts

### 3.4 Masseverlust

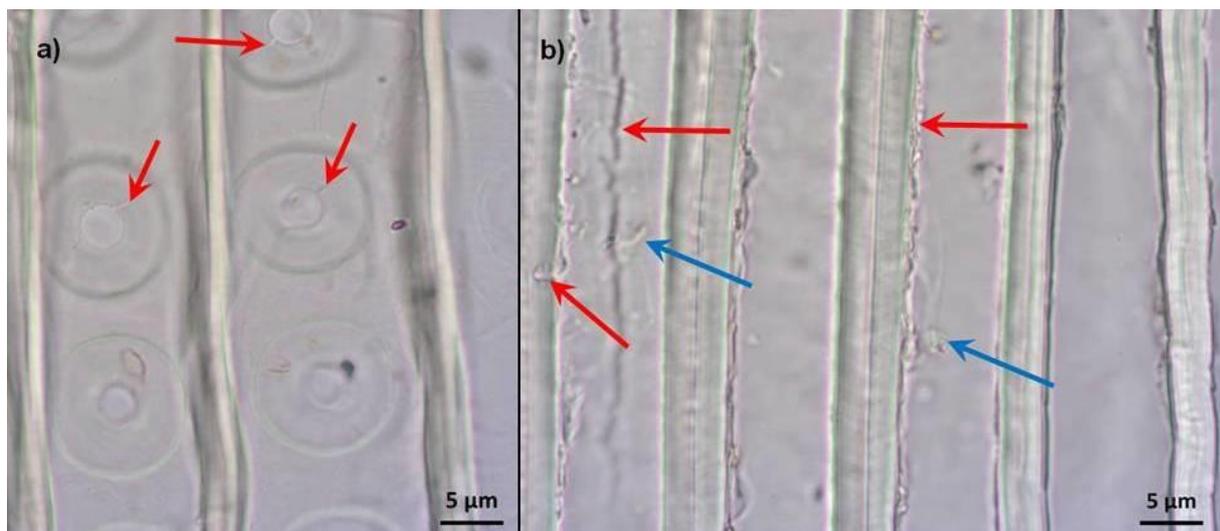
Der Masseverlust der behandelten und unbehandelten Proben ist unterschiedlich (Abbildung 18). Die unbehandelten Kontrollproben haben bei beiden verwendeten Dimensionsabmessungen den höchsten Masseverlust zu verzeichnen. Zusätzlich ergeben sich bei beiden Probenvolumen jeweils höhere Masseverluste der Proben mit einer geringeren WA. Das größere Probenvolumen hat sowohl bei den Kontrollen als auch bei beiden verwendeten Kupferanteilen in den jeweiligen Proben einen geringeren Masseverlust. Ein Ergebnis ist im direkten Vergleich auffällig: Die Proben nach EN 113: 1996 mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu weisen im Durchschnitt einen minimalen Masseverlust von nur 0,15 % auf. Die kleinen Proben mit einer übereinstimmenden WA weisen jedoch einen durchschnittlichen Masseverlust von 12,45 % auf.



**Abbildung 18:** Masseverlust durch *Pp* nach 6 Wochen von *Pinus sylvestris* L. mit 2 verschieden WA von Cu und Kontrollen; n = 4

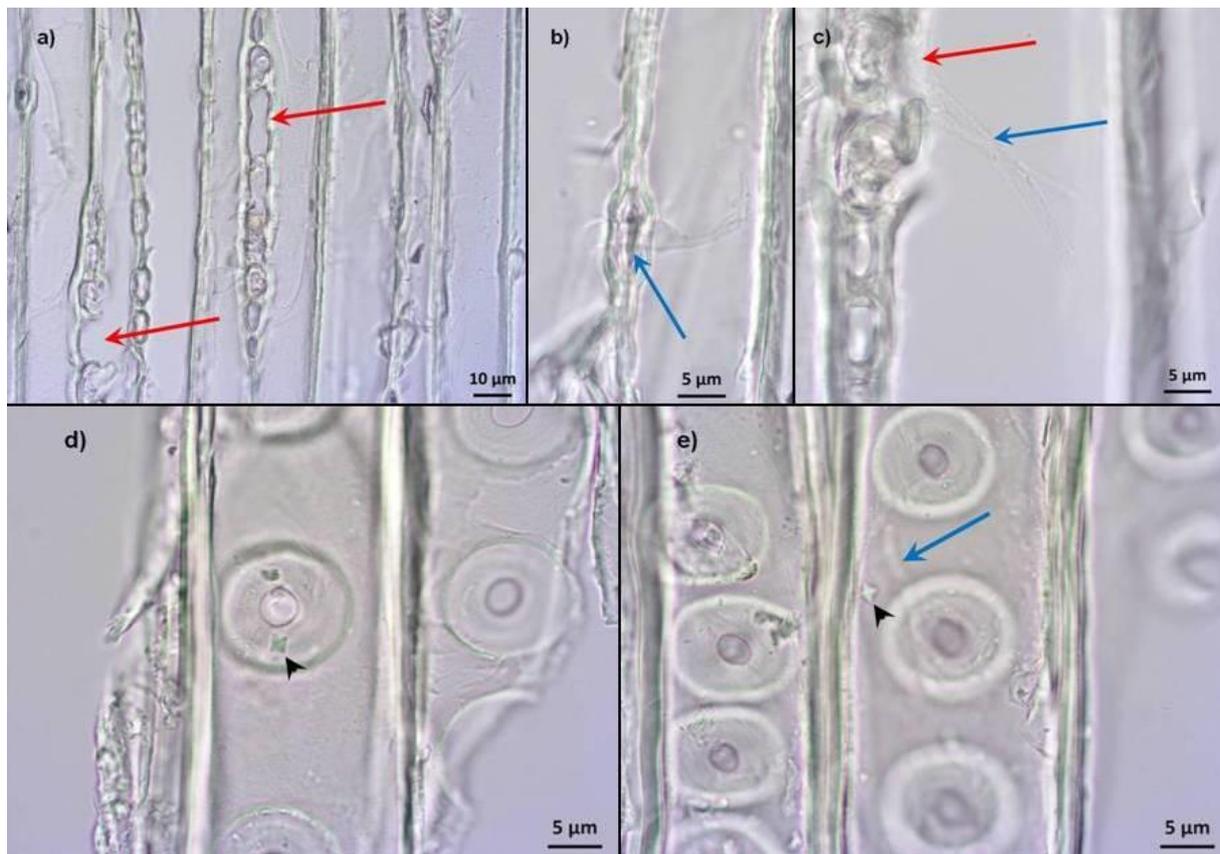
### 3.5 Lichtmikroskopie

Der Holzabbau ist statistisch mit dem Masseverlust nachweisbar. Zudem ist die Zerstörung des Holzes durch die lichtmikroskopischen Analysen zu erkennen (Abbildung 19). Durch die Lichtmikroskopie wurden Destruktionen wie die Zerstörung der Randwulst von Hoftüpfeln, Risse in den Sekundärwänden und Bohrlöcher sichtbar. Außerdem befinden sich in den Holzstrahlen und in den Tracheiden Hyphen von *Pp*. Diese Merkmale wurden sowohl in den Kontrollen als auch in den Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu gefunden. In den Proben mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu sind Destruktionsmerkmale deutlich weniger häufig vorhanden.



**Abbildung 19:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. aus Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) Destruktion der Hofüpfel in den Tracheiden durch *Pp* (rote Pfeile); b) Destruktion der Sekundärwände der Tracheiden durch *Pp* (rote Pfeile), Hyphen (blaue Pfeile); a) und b) Radialschnitt

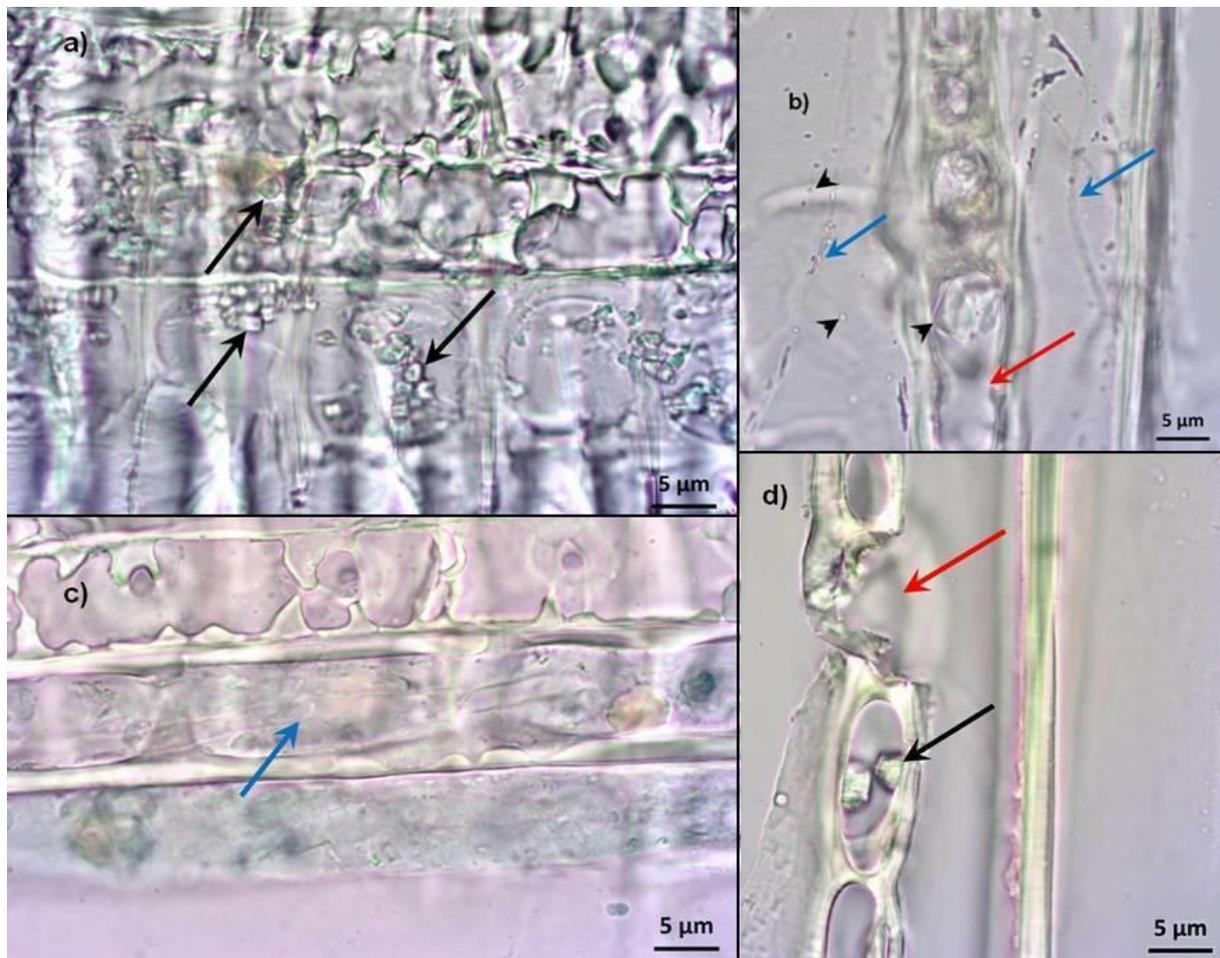
Durch die Lichtmikroskopie wurde die Lage der Hyphen von *Pp* in den unbehandelten Kontrollproben lokalisiert. Die Hyphen sind sowohl in den Holzstrahlen als auch in den Tracheiden zu finden. Die Destruktion des Holzes und die Durchwachsung von Hoftüpfeln wurden ebenso festgestellt. Zudem sind CaOx-Kristalle in Weddellit-Form sowohl auf der Holzoberfläche als auch in den Strahlen und Tracheiden lokalisiert worden (Abbildung 20). Die Referenzaufnahmen der Kontrollen weisen keine CuOx-Kristalle auf.



**Abbildung 20:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. in unbehandelten Proben a) Destruktion der Holzstrahlen (rote Pfeile); b) Hyphe durch Hoftüpfel (blauer Pfeil); c) Hyphen aus Holzstrahl (blauer Pfeil) und Destruktion der Holzstrahlzellwand (roter Pfeil); d) CaOx in Tracheide (schwarze Pfeilspitze); e) CaOx in Tracheide (schwarze Pfeilspitze) und Hyphe (blauer Pfeil); a) bis c) Tangentialschnitte aus den Randzonen; d) und e) Radialschnitte aus den Randzonen

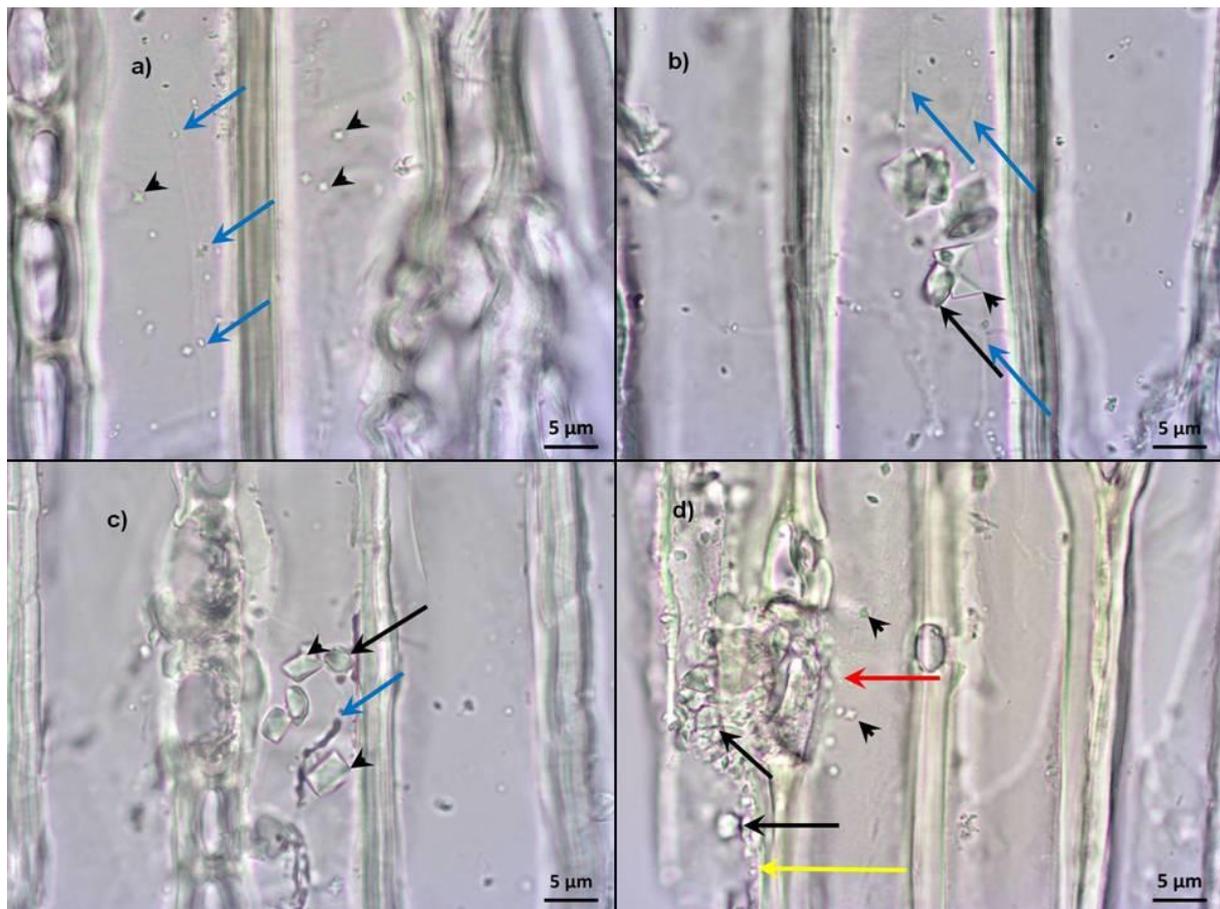
Die Ausfällung von CuOx in behandelten Proben konnte festgestellt werden. In den Radialschnitten sind CuOx-Kristalle vornehmlich in den parenchymatischen Zellen der heterozellularen Holzstrahlen zu erkennen. In den Tangentialschnitten ist CuOx ebenso in den Tracheiden festgestellt worden. Hyphen von *Pp* sind sowohl in den Strahlen als auch in den Tracheiden zu finden. CuOx, CaOx und Hyphen wurden sowohl in den Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu als auch in denen mit 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu gefunden.

Die Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu weisen Ausfällungen von CuOx (Moolooit) und CaOx (Weddellit) in den Holzstrahlen auf. Zudem wurden Hyphen von *Pp* in den Holzstrahlen und den direkt umgebenden Tracheiden in *Pinus sylvestris* L. gefunden (Abbildung 21). Die Oxalate sind nie weit von den Hyphen entfernt. Diese Aussagen gelten sowohl für die Randzonen der Proben als auch für die Probenmitte



**Abbildung 21:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx, CaOx und Hyphen von *Pp* in den Holzstrahlen aus Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) CuOx-Anhäufungen (schwarze Pfeile); b) CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen) und wahrscheinlich CaOx im Holzstrahl, Hyphen in direkt angrenzenden Tracheiden (blaue Pfeile), Destruktion Zellwand (roter Pfeil); c) Hyphne (blauer Pfeil), Probe gefärbt mit astrablau (Parenchym); d) wahrscheinlich CuOx (schwarzer Pfeil), Destruktion (roter Pfeil); a) und c) Radialschnitte aus den Randzonen; b) Tangentialschnitt aus der Randzone; d) Tangentialschnitt aus der Probenmitte

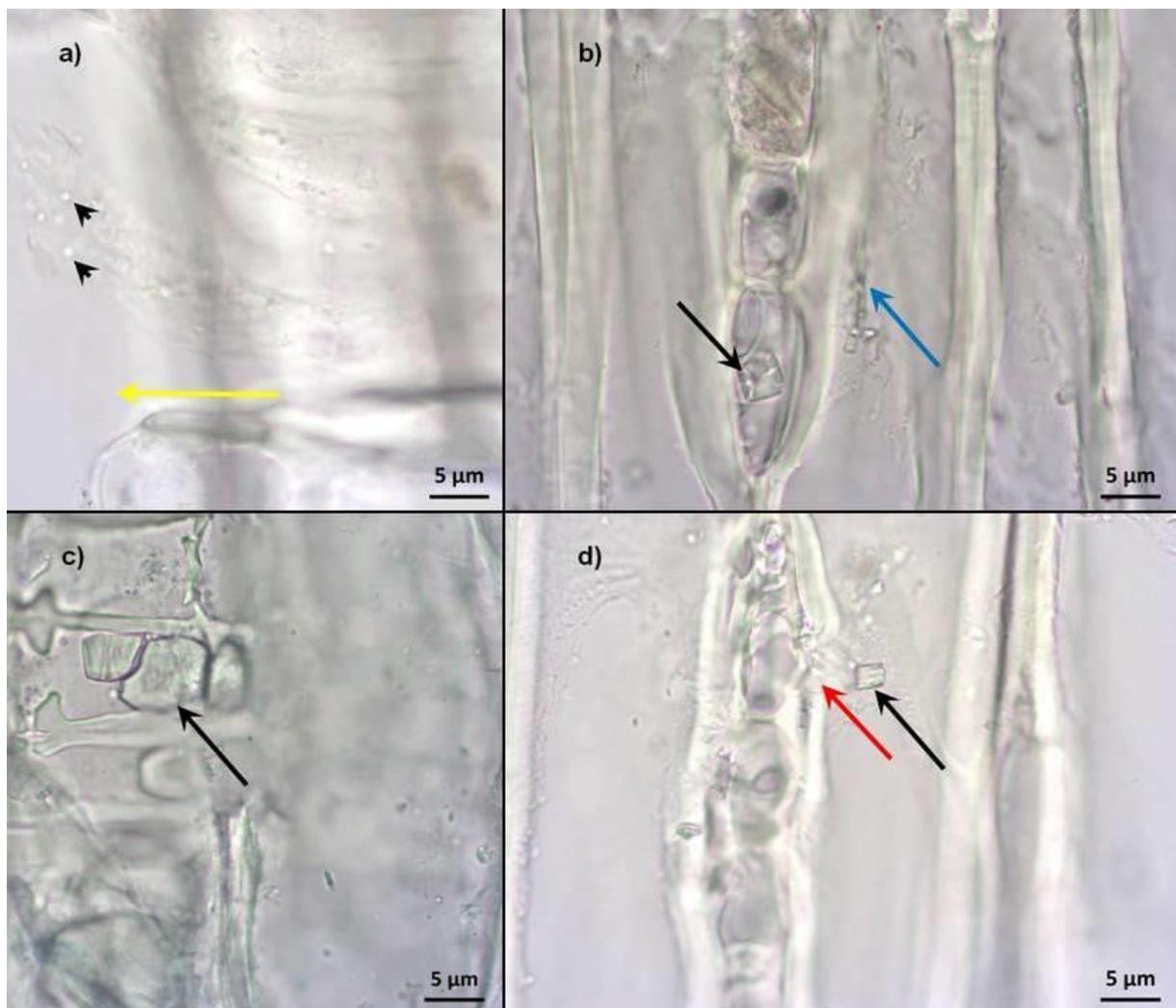
In den Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  wurden CuOx (Moolooit), CaOx (Weddellit) und Hyphen von *Pp* auch in den Tracheiden gefunden (Abbildung 22). In den Tangentialschnitten wurden sehr viele kleine CaOx-Kristalle lokalisiert, vornehmlich in den Schnitten aus den Randzonen. Fast immer lagen Hyphen von *Pp* unmittelbar an dem Kristall oder sie befanden in einem geringen Abstand daneben. In den Tangentialschnitten aus der Mitte der Proben fanden sich CuOx und CaOx in den Tracheiden bedingt. Die Kristalle, die dort gefunden wurden, lagen in den Tracheiden direkt unter der Holzoberfläche.



**Abbildung 22:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx, CaOx und Hyphen von *Pp* in den Tracheiden aus Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; a) kleine CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen), Hyphe mit direkt anhaftenden CaOx (blaue Pfeile); b) CuOx (schwarzer Pfeil) und CaOx (schwarze Pfeilspitze) mit umgebenden Hyphen (blaue Pfeile); c) CuOx (schwarzer Pfeil) und CaOx (schwarze Pfeilspitzen), Hyphe (blauer Pfeil); d) kleine CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen) in Tracheide direkt unter der Holzoberfläche (gelber Pfeil), CuOx auf der Oberfläche (schwarze Pfeile), Destruktion der Zellwand (roter Pfeil); a), b) und c) Tangentialschnitte aus den Randzonen; d) Tangentialschnitt aus der Probenmitte

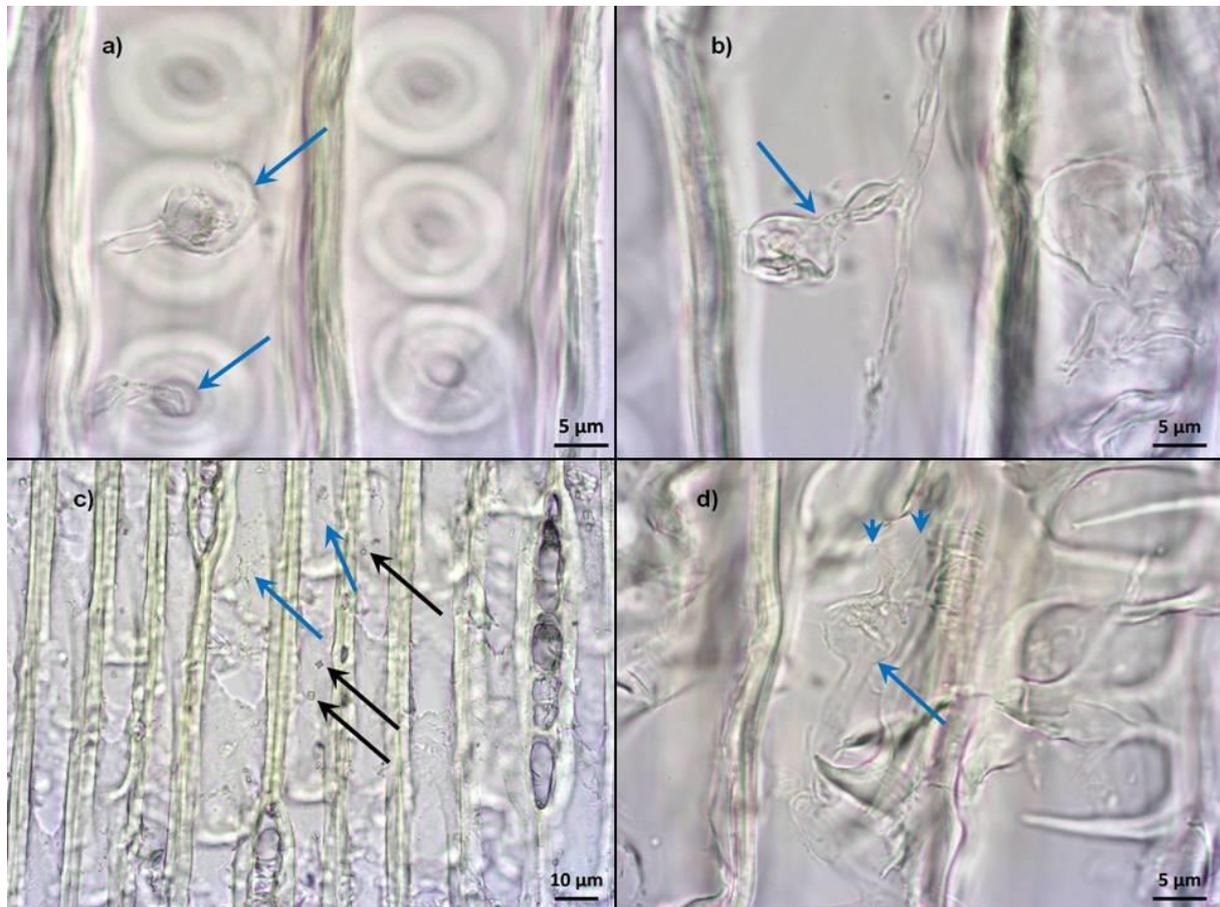
In den Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  sind ebenfalls sowohl CuOx-Moolooite als auch CaOx-Weddellite und Hyphen von *Pp* lokalisiert worden. Die Destruktion des Holzes ist in diesen Proben erkennbar geringer als in denen mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ . CuOx und CaOx konnte in Radial- und Tangentialschnitten festgestellt werden. Die Hyphen hingegen waren eher in den Radialschnitten sichtbar.

Die Ausfällung von CuOx und CaOx war hauptsächlich in den Holzstrahlen festzustellen (Abbildung 23). In den Strahlen aus der Probenmitte konnte CuOx bedingt lokalisiert werden und CaOx wurde in diesen Stichproben aus der Mitte nicht gefunden. Durch das reichlich vorhandene Cytoplasma in den Holzstrahlen dieser Proben sind die hyalinen Hyphen von *Pp* nur schwer zu lokalisieren.



**Abbildung 23:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx, CaOx und Hyphen von *Pp* in den Holzstrahlen aus Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; a) kleine CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen), Holzoberfläche (gelber Pfeil); b) CuOx (schwarzer Pfeil), Hyphe (blauer Pfeil); c) CuOx (schwarzer Pfeil); d) wahrscheinlich CuOx (schwarzer Pfeil) aus Öffnung infolge von Destruktion (roter Pfeil); a) und c) Radialschnitte aus den Randzonen; b) Tangentialschnitt aus der Randzone; d) Tangentialschnitt aus der Probenmitte

In den Tracheiden der Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  sind  $\text{CuOx}$ -Kristalle (Moolooit),  $\text{CaOx}$  (Weddellit) und Hyphen von *Pp* in den Tracheiden nur bedingt zu finden.  $\text{CuOx}$  und  $\text{CaOx}$  wurden in den Tangentialschnitten aus den Randzonen lokalisiert. In den Schnitten aus der Probenmitte wurden keine Kristalle in den Tracheiden vorgefunden. Die gesichteten Hyphen waren in diesen Proben mehrfach mit blasigen Anschwellungen vorzufinden.

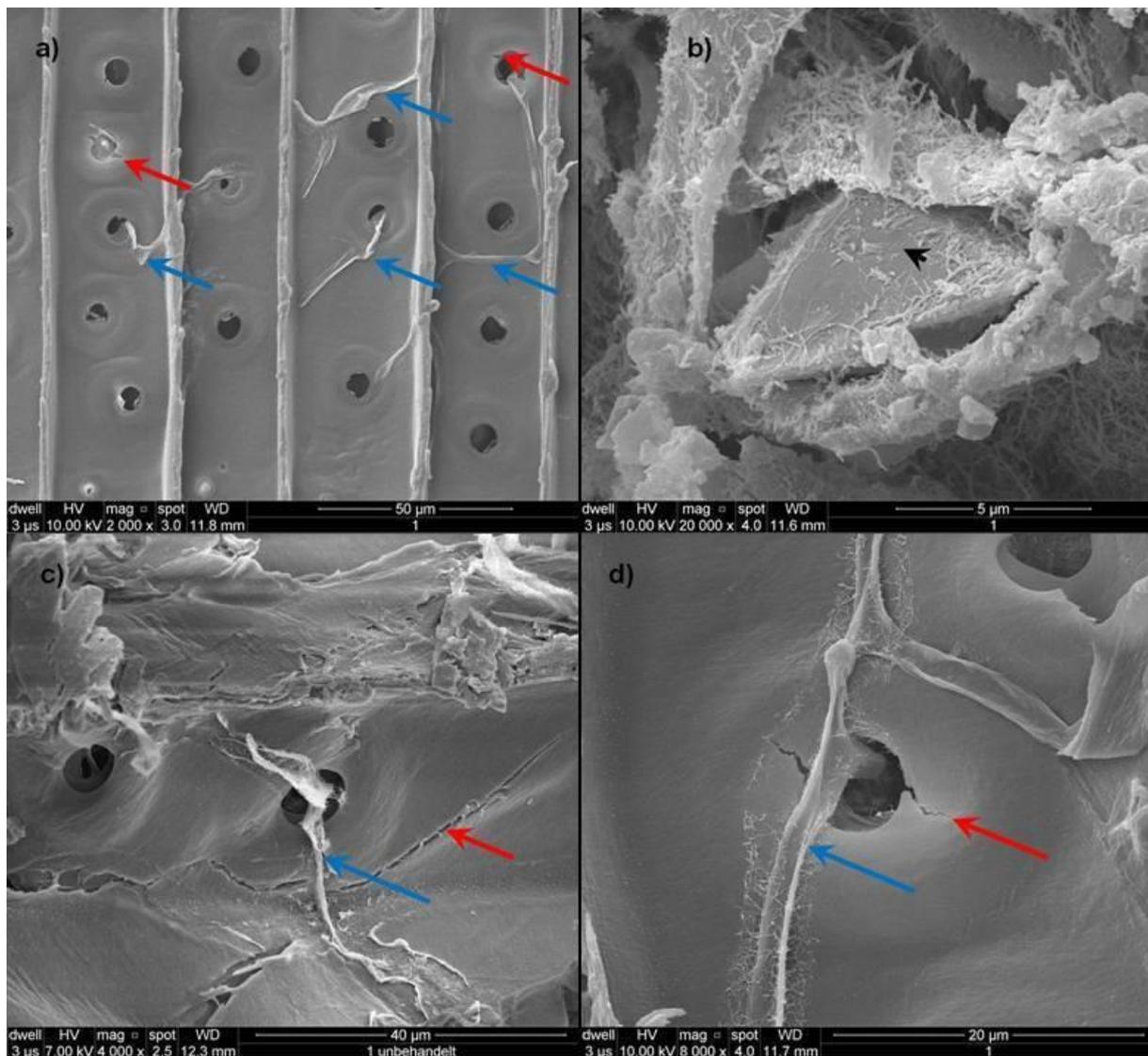


**Abbildung 24:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von  $\text{CuOx}$  und Hyphen von *Pp* in den Tracheiden aus Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; a) Hyphe mit blasiger Anschwellung oben und Hyphe durch Tüpfel darunter (blaue Pfeile); b) Hyphe mit blasiger Anschwellung (blauer Pfeil); c) wahrscheinlich  $\text{CuOx}$  (schwarze Pfeile), Hyphen (blaue Pfeile); d) Hyphe mit blasiger Anschwellung (blauer Pfeil) und Hyphenenden (blaue Pfeilspitzen); a), b) und d) Radialschnitte aus den Randzonen; c) Tangentialschnitt aus der Randzone

### 3.6 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM)

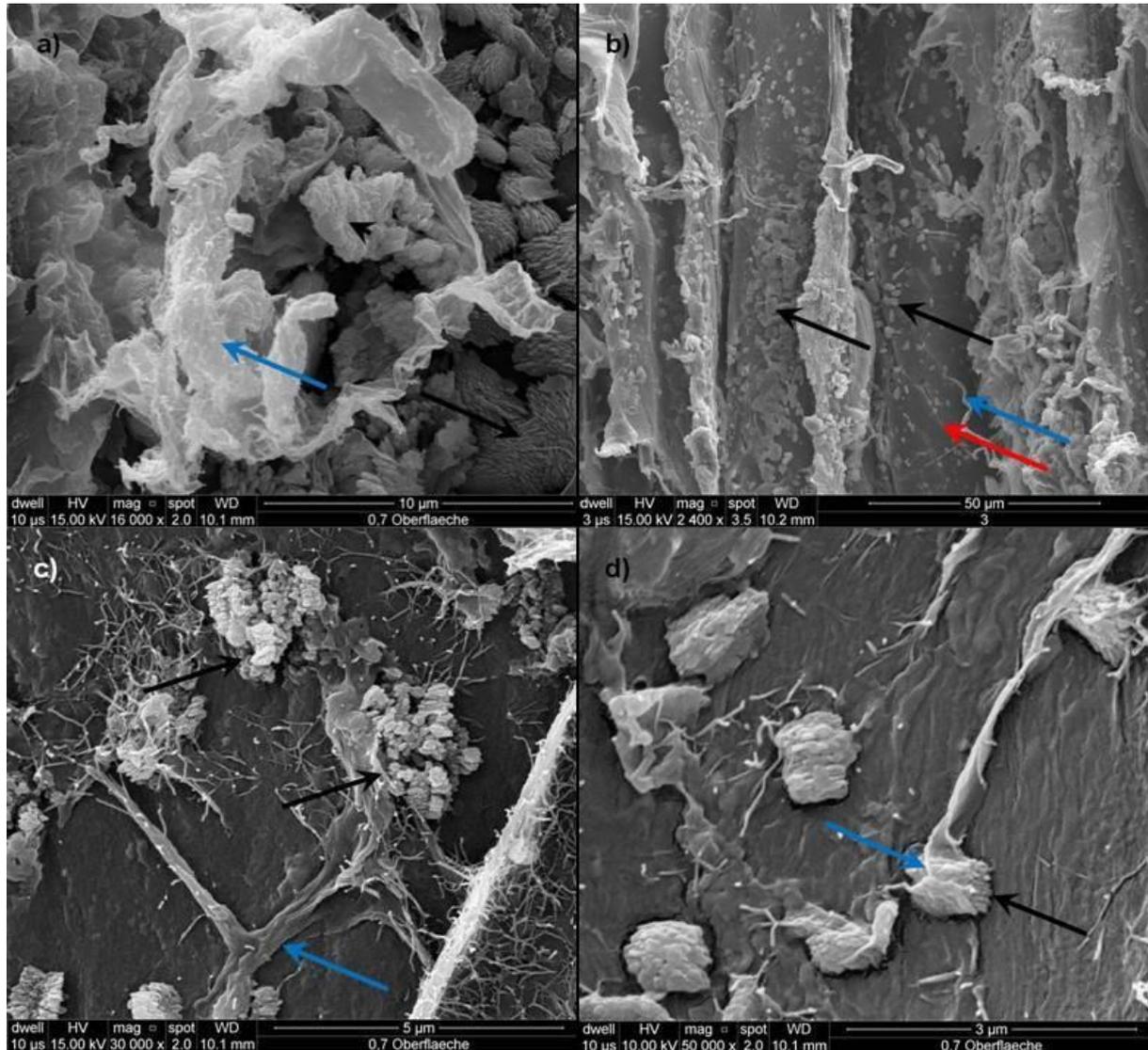
Bei den FEREM-Aufnahmen wurden die Oberflächen der Proben mit *Pp* ohne Kupfersulfat (unbehandelte Kontrollen) und die Proben mit einer WA von 0,7 und 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu auf Kristalle und Hyphen untersucht. Hyphen und Mycelmatten wurden auf allen Oberflächen festgestellt. Bei den Proben mit 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu wurde eine intensivere CuOx-Bildung bemerkt als bei den Proben mit 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu. Zudem wurden CaOx-Kristalle als Weddellite (Abbildung 25 b)) lokalisiert.

In den Kontrollproben sind Hyphen von *Pp*, die Destruktion von Hoftüpfeln und der Zellwand von *Pinus sylvestris* L. und CaOx an der Oberfläche eindeutig festgestellt worden (Abbildung 25). Sehr deutlich ist die häufige Durchdringung der Hoftüpfel durch die Hyphen an den Oberflächen im Radialschnitt zu erkennen, um im Zuge der Holzbesiedlung tiefer in das Holz zu gelangen.



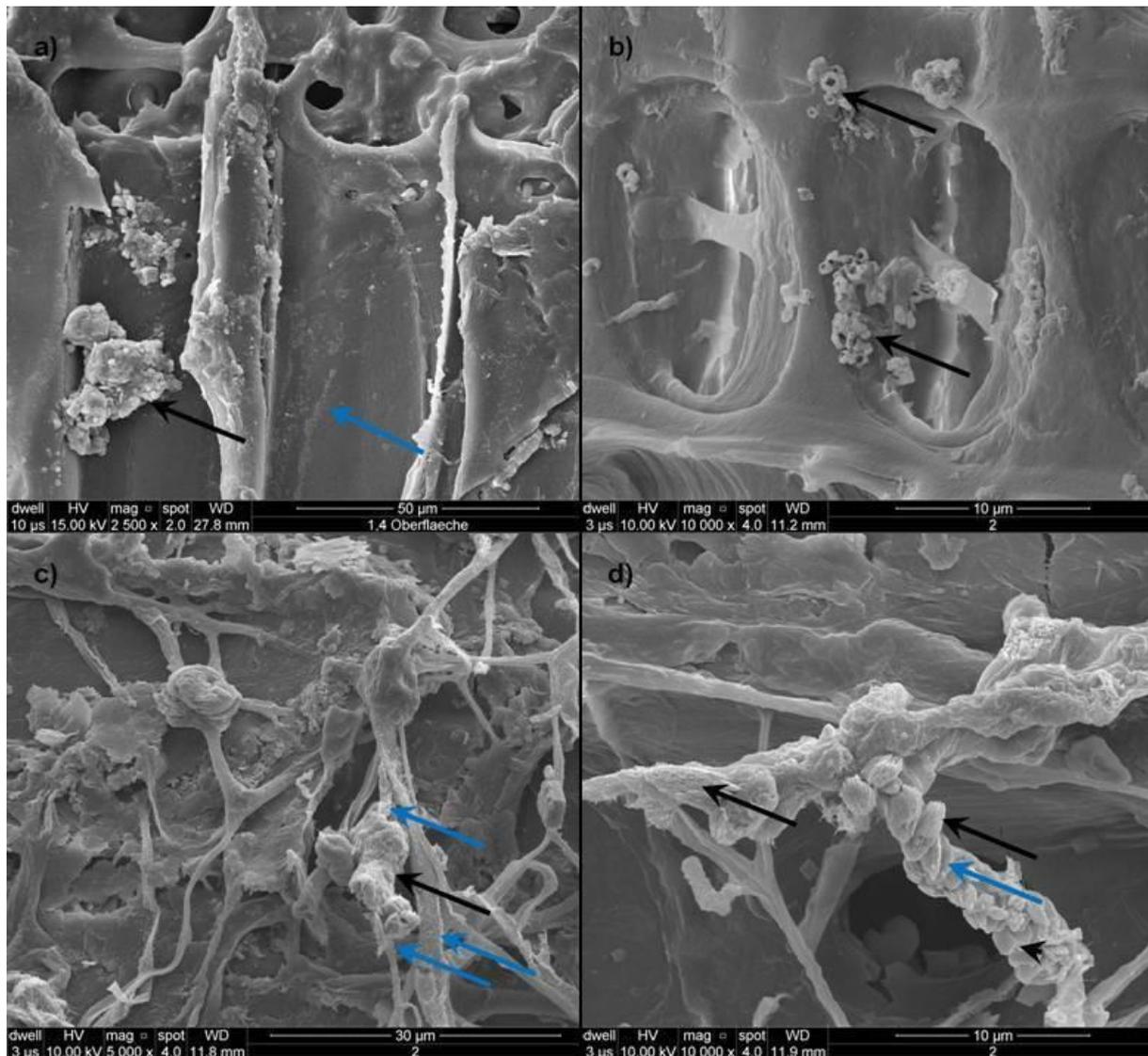
**Abbildung 25:** FEREM-Aufnahmen auf *Pinus sylvestris* L. von Hyphen von *Pp* in unbehandelten Proben; a) Hyphen (blaue Pfeile) und Destruktion von Hoftüpfeln (rote Pfeile); b) CaOx als Weddellit (schwarze Pfeilspitze) im Hyphengeflecht; c) Hyphe (blauer Pfeil) und Destruktion der Zellwand (roter Pfeil); d) Hyphe durch Hoftüpfel (blauer Pfeil) und Destruktion des Tüpfels (roter Pfeil); a) bis d) Radialschnitte an der Oberfläche

Die Ausfällung von CuOx ist auf der Oberfläche von Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  besonders häufig festzustellen (Abbildung 26). Zudem sind in den einsehbaren blasigen Anschwellungen der Hyphen von *Pp* stark gelayerte Oxalate lokalisiert worden. Diese entsprechen der Struktur von CuOx. Ausfällungen von CaOx sind auch festgestellt worden. Außerdem sind Destruktionsmerkmale der Zellwände (Risse) zu erkennen.



**Abbildung 26:** FEREM-Aufnahmen auf *Pinus sylvestris* L. von CuOx und Hyphen von *Pp* an der Oberfläche der Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; a) Hyphe mit blasiger Anschwellung (blauer Pfeil) wahrscheinlich mit CuOx-Inhalt (schwarze Pfeilspitze) und Hyphe umgeben von CuOx (schwarzer Pfeil); b) CuOx in Tracheiden (schwarze Pfeile) und Hyphe (blauer Pfeil) sowie Destruktion der Zellwand (roter Pfeil); c) Hyphengeflecht (blauer Pfeil) mit stark gelayerten Oxalaten (schwarze Pfeile) an den Hyphenenden; d) Hyphe (blauer Pfeil) umschließt CuOx (schwarzer Pfeil); a) bis d) Oberfläche

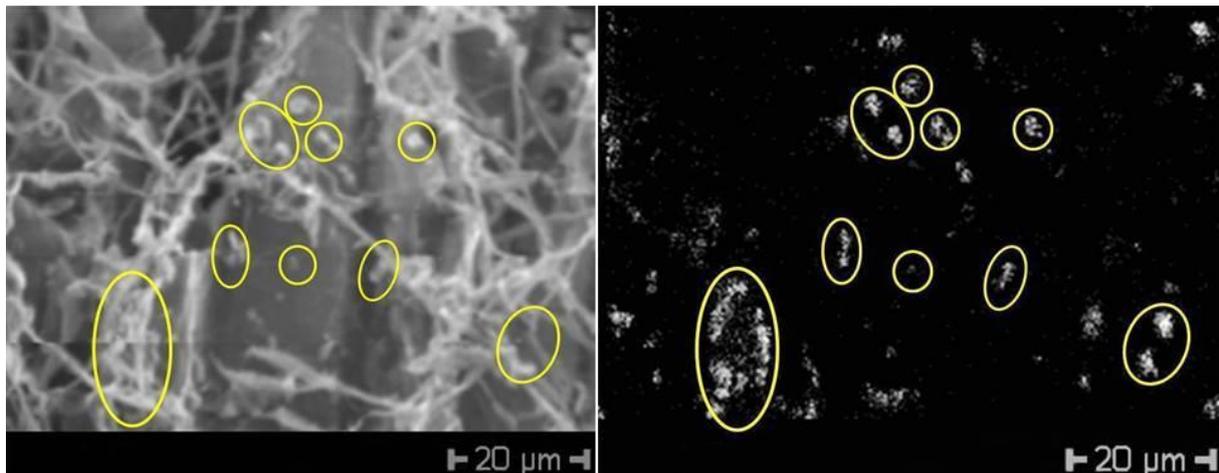
Auf der Oberfläche der Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  sind ebenfalls  $\text{CuOx}$  und  $\text{CaOx}$  detektiert worden. Teilweise umschließt kristallines  $\text{CuOx}$  die Hyphen wie ein Mantel.  $\text{CuOx}$  haftet bei diesen Aufnahmen direkt an den Hyphen von *Pp* oder sie sind nicht weit davon entfernt (Abbildung 27).  $\text{CuOx}$  wurde häufig im Kreuzungsfeld oder in der Nähe davon lokalisiert. Die Destruktionsmerkmale der Zellwand waren bedeutend geringer als auf den Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ .



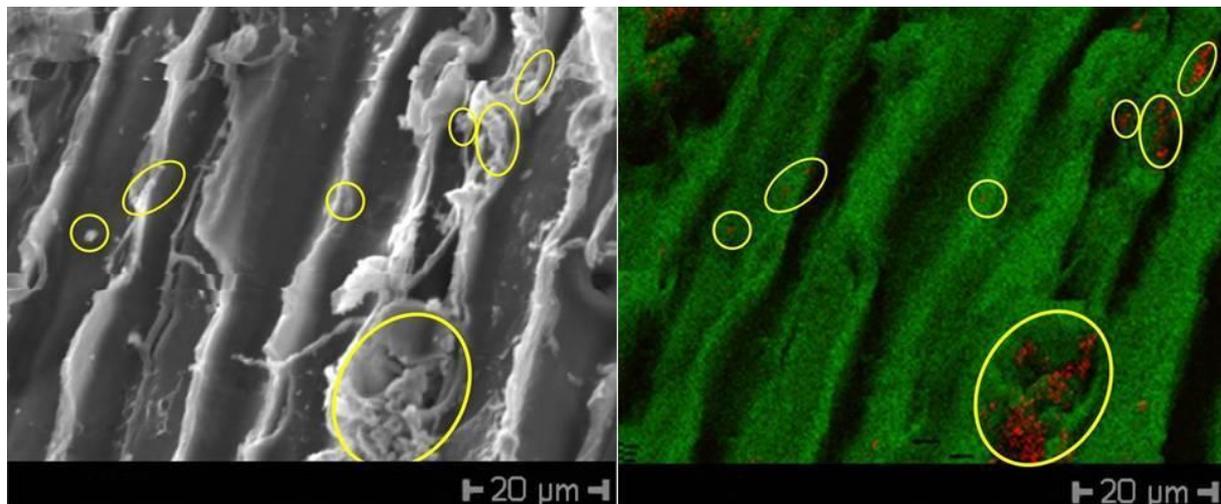
**Abbildung 27:** FEREM-Aufnahmen auf *Pinus sylvestris* L. von  $\text{CuOx}$  und Hyphen von *Pp* an der Oberfläche der Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; a)  $\text{CuOx}$ -Agglomerat in linker Tracheide unter dem Kreuzungsfeld (schwarzer Pfeil) und Spuren einer sich ehemals dort befindlichen Hyphe in der rechten Tracheide unter dem Kreuzungsfeld (blauer Pfeil); b)  $\text{CuOx}$  im Kreuzungsfeld (schwarze Pfeile); c)  $\text{CuOx}$  (schwarzer Pfeil) unmittelbar am Hyphengeflecht (blaue Pfeile); d) kristallines  $\text{CuOx}$  (schwarzer Pfeil) und wahrscheinlich  $\text{CaOx}$  (schwarze Pfeilspitze), beides unmittelbar an der Hyphe (blauer Pfeil); a) bis d) Oberfläche

### 3.7 Energy Dispersive X-Ray Microanalysis (EDXA)

Mit Hilfe der EDXA-Methode wurden Mappings und Punktmessungen an der Oberfläche der Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  durchgeführt. Beim Mapping konnte durch die Elementanalyse CuOx (Abbildung 28 und 29) und CaOx nachgewiesen werden. Einige Oxalate sind in direktem Zusammenhang mit Hyphen von *Pp* lokalisiert worden (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Mapping 1 an der Oberfläche von *Pinus sylvestris* L. mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; links REM-Aufnahme mit ausgewählten Bereichen von nachgewiesenem Kupfer (gelbe Kreise) und rechts Elementanalyse der REM-Aufnahme nach Kupfer in ausgewählten Bereichen (gelbe Kreise)



**Abbildung 29:** Mapping 2 an der Oberfläche von *Pinus sylvestris* L. mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$ ; links REM-Aufnahme mit ausgewählten Bereichen von nachgewiesenem Kupfer (gelbe Kreise) und rechts Elementanalyse der REM-Aufnahme nach Kupfer (rot) in ausgewählten Bereichen (gelbe Kreise) und Kohlenstoff (grün)

Eine weitere Methode der Elementanalyse wurde in Form von Punktmessung an der Oberfläche von Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu durchgeführt. Die Messungen fanden an Stellen statt, die optisch auf eine Oxalatbildung hindeuten. Dabei konnte ebenfalls Kupfer nachgewiesen werden (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Punktmessungen mit nachgewiesenen Elementen (Oberfläche mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu)

Element	Symbol	Punktmessung [relative Atom-%]	
		1	2
Phosphor	P	0,24	0,27
Schwefel	S	0,42	0,21
Chlor	Cl	0,14	0,12
Kalium	K	0,19	0,16
Calcium	Ca	0,47	0,00
Kupfer	Cu	30,93	6,85
Kohlenstoff	C	63,59	74,14
Sauerstoff	O	4,03	18,22
		100,0	100,0

Die hohen Kohlenstoffanteile in beiden Punktmessungen resultieren aus dem Sputter Coating-Verfahren. In der Punktmessung 1 ist ein hoher Anteil Kupfer (ca. 31 relative Atomprozent) detektiert worden, was auf eine CuOx-Bildung zurückzuführen ist. Der Kupferanteil in der Punktmessung 2 ist deutlich geringer. Die Calciumanteile sind in Punktmessung 1 mit rund 0,5 relativen Atomprozent-Anteil sehr gering und in Punktmessung 2 ist Calcium gar nicht vorhanden. In Punktmessung 2 ist deutlich mehr Sauerstoff als in Punktmessung 1 detektiert worden. In beiden Messungen sind die Anteile von Phosphor, Chlor und Kalium ohne signifikante Unterschiede in geringen Mengen von jeweils weniger als 1 relativen Atomprozent vorhanden. Schwefel weist jeweils auch weniger als 1 relatives Atomprozent auf, jedoch ist der Anteil in Punktmessung 1 (0,42 rel. Atom-%) doppelt so hoch wie in Punktmessung 2 (0,21 rel. Atom-%).

## 4. Diskussion

### 4.1 Wachstumsraten, MHK-Werte, pH-Werte

Die Wachstumsraten und -geschwindigkeiten aus beiden VRs zeigen die Kupfertoleranz von *Pp* gegenüber Kupfersulfat mit 1000 ppm Cu auf. Die Graphen der Wachstumsraten der Kontrollproben und 1000 ppm Cu in beiden VRs ähneln einem logistischen Wachstum. In Abbildung 15 (Kapitel 3.1) ist die sigmoide Funktion resultierend aus den Annahmen (Kapitel 2.3 und 3.1) dargestellt. Diese streng monoton steigende Funktion weist eine Anlaufphase mit progressivem Wachstum und eine abklingende Phase mit degressivem Wachstum auf. Beide Phasen treffen sich am Wendepunkt der Funktion. Dieser repräsentiert zugleich die Mitte des Bereichs (in Bezug auf die Zeit) des vitalsten Wachstums des Mycels.

Auch unabhängig von der ideellen Funktion ist deutlich zu erkennen, dass die beiden ausgewählten Wachstumskurven aus VR 1 jeweils schneller als die vergleichbaren aus VR 2 sind. Das langsamere Wachstum resultiert aus dem älteren Impfstück aus VR 2. Nach Tabelle 3 (Kapitel 2.3) ist das Mycel aus VR 1 genau 13 Tage jünger und somit vitaler als das Impfstück aus VR 2. Alle abgebildeten Kurven weisen jedoch Eigenschaften einer logistischen Wachstumsfunktion auf. Zudem ist das gehemmte Wachstum der beiden Proben mit 1000 ppm Cu innerhalb der MHK-Grenzwerte erkennbar. Wachstumshemmende Parameter wie ältere Mycelien und die Kupferkonzentrationen schlagen sich zudem in den niedrigeren  $r$ -Faktoren nieder. Die Mittelwerte aus den täglichen Abschnitten der  $r$ -Faktoren einer Funktion verdeutlichen die Wachstumseigenschaften deutlich repräsentativer als ein Vergleich der (lokalen) Extremwerte der Kurven.

Die täglichen Zuwachsraten der Kontrollen aus Abbildung 14 in Kapitel 3.1, stimmen unter Berücksichtigung der Temperaturangaben, mit den Literaturangaben überein. Bei 21°C beträgt der tägliche Zuwachs 5,4 mm (Huckfeldt & Schmidt 2015). Beide Kontrollen liegen mit Zuwachsraten zwischen 3 und 6 mm im vitalen Bereich um den angegebenen Literaturwert. Je nach Stamm-Isolat können die Zuwachsraten bei der Optimaltemperatur von 28 °C schwanken (Schmidt & Moreth 2003). Kupfertoleranz von *Pp* wurde u.a. von Schmidt 2006; DeGroot & Woodward 1999; Humar et al. 2004 sowie Schmidt & Moreth 1996 bereits bestimmt und sind durch diese Versuche verifiziert, bei Untersuchungen mit Kupfersulfat jedoch ohne Berücksichtigung des Einflusses des Sulfat-Ions.

Die Grenzwerte (MHK-Werte) aus beiden VRs sind nicht identisch, da diese direkt aus den diskutierten Wachstumsraten resultieren. Die Bewertungskriterien der Mycelausdehnung sind im Kapitel 2.3 beschrieben. Da die Bewertung der Mycelausdehnung im ersten MHK-Wert jeweils 1 und im zweiten MHK-Wert jeweils 0 ist, siehe Tabelle 5, Kapitel 3.2, sind die ausgewählten und ge-

prüften Konzentrationsabstufungen zweckmäßig. Hätte einer der ersten MHK-Werte die Bewertung 2, gäbe es bei der entsprechenden Prüfkonzentration keinen signifikanten Einfluss des Kupfersulfats auf das Wachstum von *Pp*. Bei einer Bewertung von 3 würde die Prüfkonzentration das Pilzwachstum sogar stimulieren. Im theoretischen Falle einer Bewertung des ersten MHK-Wertes mit 2 oder 3 ist folglich die Abstufung der Prüfkonzentrationen zu überdenken. Nicht nur die Prüfkonzentrationen aus denen sich die MHK-Werte ableiten, sondern auch alle weiteren Prüfkonzentrationen (außer Kontrolle) in diesem Versuchsaufbau sind sowohl am Tag 7 als auch an allen anderen Tagen mit 1 oder 0 zu bewerten. Ansonsten würde sich ein entsprechender Graph mit dem Graph der Kontrolle in Abbildung 13 aus Kapitel 3.1 schneiden. Wenn die Bewertung des zweiten MHK-Wertes nicht 0 ist, ist eine Formulierung von MHK-Werten nicht möglich. Falls Kupfersulfat eine stimulierende Wirkung auf *Pp* hat, liegt diese im Bereich unter 1000 ppm Cu und wurde in diesem Verfahren nicht erfasst.

Die Korrelation zwischen pH-Werten und Mycelwachstum ist dokumentiert, siehe Kapitel 3.3, Abbildung 17. Die Petrischalen in denen kein Wachstum festgestellt wurde, weisen mit einer höheren Konzentration an Kupfersulfat dennoch eine Tendenz in ein saureres Milieu auf, siehe Abbildung 16, Kapitel 3.3. Dies resultiert aus der Eigenschaft des Kupfersulfats sauer zu reagieren (Liese 1954). Der pH-Wert von Kupfersulfat mit einem Anteil von 0,75% Cu beträgt 2,7 (Humar et al. 2001). Der Stamm FPRL 280 erzeugt nach 2 Monaten einen pH-wert von 2,2 *in vitro* in einer Nährstoffflüssigkeit (Schmidt 2006). Mit pH-Werten von ca. 1,8 in beiden VRs auf unmodifiziertem MEA liegen diese Werte in kürzerer Zeit sogar noch deutlich darunter. Noch geringere pH-Werte bis zu 1,7 aus anderen Stämmen von *Pp* wurden auch an Holzproben festgestellt (Green et al. 1991). Die Varianz der pH-Werte innerhalb eines bestimmten Spektrums ist in der Literatur aus genannten Quellen belegt. Die Varianz der pH-Werte spiegelt sich auch im Vergleich der pH-Wert-Messungen an den Proben mit festgestelltem Wachstum an beiden Messpunkten wieder. Die Kontrolle in VR 1 hat innen und außen den gleichen pH-Wert, andere Proben weisen entweder innen oder außen einen saureren pH-Wert auf. Kontrollen und Proben mit 1000 ppm Cu sind in VR 1 jedoch saurer als in VR 2, dies lässt sich wiederum auf das jüngere und vitalere Impfstück zurückführen. Ein vitaleres Impfstück ist besser in der Lage das umgebende Milieu zu verändern. Schlussfolgerungen aus dieser geringen Datengrundlage mit Einzelmessungen über den inneren und den äußeren pH-Wert der Mycelien zu ziehen, ist vage.

Die Abbildung 17 im Kapitel 3.3 stellt eine Kontroverse in der Korrelation der Ergebnisse zwischen statistisch festgestelltem Wachstum und pH-Werten dar. Obwohl in VR 1 kein Wachstum festgestellt wurde, weist der innere Messpunkt bei 2000 ppm Cu ein erkennbar saureres Milieu auf als der äußere. Zusätzlich ist in VR 2 kein saureres Milieu am inneren Messpunkt von 2000 ppm Cu festgestellt worden, obwohl Wachstum erfasst wurde. Aus dieser Unstimmigkeit und den

Unterschieden in den MHK-Werten ist abzuleiten, dass es sich bei 2000 ppm Cu um einen ausschlaggebenden Bereich in Bezug auf den Kupfertoleranz-Grenzwert von  $Pp$  in Beziehung zu diesem Versuchsaufbau handelt.

Zusätzlich zu den vorliegenden Resultaten sind die Parameter zu diskutieren, die die Aufnahme der Daten direkt betrifft. Zum einen sind die Messungen der pH-Werte Einzelmessungen, d.h. eine ausreichende statistische Signifikanz ist nicht gewährleistet. Fehlerquellen in der Messung können nicht korrigiert werden, da keine Mehrfachmessungen an den einzelnen Messpunkten durchgeführt wurden. Somit können weder Mittelwerte noch sonstige Angaben für eine weiterführende statistische Auswertung ermittelt werden. Zum anderen ist die Feststellung, ob Mycelwachstum vorhanden ist oder nicht, subjektiven Einflüssen ausgesetzt. Abbildung 30 (Anlage) zeigt die entsprechenden Petrischalen mit den jeweiligen Impfstücken und den Mycelausschlägen. Bei den täglichen Messungen der Myceldurchmesser werden die Deckel der Petrischalen aus Sterilisationsgründen nie geöffnet. Ob das Mycel auf dem MEA wächst und somit statistisch aufgenommen wird, muss im Zweifel der Blick seitlich in die Petrischale entscheiden. Die optische Bewertung wird durch Störquellen wie Blasen auf dem MEA am Impfstück bei VR 1 und Blasen am Rand der Petrischalen bei VR 1 und 2 beeinflusst. Zudem wird die seitliche optische Beurteilung durch den umschlagenden Deckelrand gestört.

Weiterhin spielt das Mycelalter eine wichtige Rolle. Beim Start der Aufnahme der Wachstumsraten war das Mycel in VR 1 mit 18 Tagen deutlich jünger und vitaler als das Mycel in VR 2 mit 31 Tagen, siehe Tabelle 3 in Kapitel 2.3. Die Methodik zur Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit auf MEA ohne Holzprüfkörper entspricht nicht der Methodik nach EN 113: 1996, trotzdem ist anzumerken, dass aus genannter Norm ein Alter für das Impfstück von weniger als 4 Wochen vorgeschrieben ist.

Argumente für ein Wachstum des Mycels auf dem MEA in VR 1 sind:

- Jüngerer, vitaleres Impfstück
- Messbare Senkung des pH-Wertes auf MEA unmittelbar am Impfstück
- Keine eindeutige optische Bestimmung eines Nicht-Wachstums auf MEA, da viele Blasen im seitlichen Blickfeld

Argumente gegen ein Wachstum des Mycels auf dem MEA in VR 2 sind:

- Älteres, weniger vitaleres Impfstück, älter als 4 Wochen
- Keine messbare Senkung des pH-Wertes
- Keine eindeutige optische Bestimmung eines Wachstums auf MEA, da eingeschränktes seitliches Sichtfeld

Daraus ist abzuleiten, dass die Beurteilung des Wachstums auf 2000 ppm Cu nicht gesichert ist. Daraus resultiert direkt die Diskussion über die unterschiedlichen MHK-Werte. Für eine sichere Aussage über die MHK-Werte sind weiterführende Untersuchungen mit Kupfersulfat im Bereich

zwischen 1000 bis 3000 ppm Cu durchzuführen. Innerhalb dieses Bereiches sollten mindestens 6 verschiedene Konzentrationen ppm Cu vorliegen und mehr als zwei VRs mit Impfstücken gleichen Alters und aus der gleichen Wachstumszone verwendet werden.

Zu diesen variierenden Ergebnissen gibt es weitere Daten zum Vergleich (Schmidt 2006). In verschiedenen Versuchen wurden drei unterschiedliche Stämme von *Pp* (*Oligoporus placenta*) auf Kupfertoleranz auf MEA modifiziert mit Kupfersulfat getestet. Bei allen drei Stämmen gab es Versuche, bei denen eine Probe Wachstum aufwies und die zweite Probe nicht. Zudem war der Stamm FPRL 280 der kupfertoleranteste aus den getesteten Isolaten (Schmidt 2006). Sehr hohe Variationen im Wachstum ergeben sich auch aus den Isolaten der Spezies anderer kupfertoleranter Pilze (Collett 1992). Dies weist auf ein komplexes System hin, sodass die Wachstumsraten und pH-Werte von sehr vielen verschiedenen Parametern abhängen. Einige offensichtliche Parameter können durch den Versuchsaufbau egalisiert werden, alle zu erfassen ist jedoch schwierig.

#### 4.2 Masseverlust, Lichtmikroskopie, FEREM, EDXA

Der Masseverlust aller Proben resultiert aus der Holzerstörung von *Pp*. Die Ergebnisse des Masseverlustes der Proben mit den Abmessungen nach Norm weisen, wie erwartet, durchgängig einen höheren Masseverlust als die Proben mit der kleineren Dimensionsabmessung in Anlehnung an Bravery 1979 auf, siehe Abbildung 18 in Kapitel 3.4. Der Masseverlust ist relativ zum Probenvolumen zu sehen. Die großen Proben haben ein besseres Volumen-Oberflächen-Verhältnis in Bezug auf die direkt durch Pilze angreifbare Oberfläche. Im Vergleich zu den Kontrollen ist der Masseverlust der behandelten Proben durchgängig geringer, wobei die Proben mit einer höheren WA einen geringeren Masseverlust zu verzeichnen haben. Das heißt, eine höhere WA von Kupfer im Holz hemmt unabhängig von dem Probenvolumen nachweislich das Wachstum von *Pp*. Die Wirkung des Kupfersulfats ist deutlich am Masseverlust der Proben nach EN 113:1996 mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu zu sehen. Der Masseverlust ist hier durchgehend geringer als 1 %. Das diese Dosis jedoch nicht zwangsläufig toxisch für *Pp* ist, belegen die Ergebnisse der kleinen Proben mit identischer WA. Zum einen ist die Angriffsfläche des Pilzes im Verhältnis zum Probenvolumen bei den kleinen Proben sehr hoch. Zum anderen spielt die Zeit beim Masseverlust eine Rolle. Die Anwesenheit von Kupfersulfat kann das Wachstum verzögern (siehe Wachstumskurven in Kapitel 3.1) und die Vitalität hemmen, die toxische Dosis ist dabei jedoch nicht erreicht. Eine längere Expositionsdauer in Kombination mit einer höheren Anzahl an großen Proben mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> ist ein Ansatz für weitere Aufschlüsse. Allerdings stellt diese Dosis bereits einen kritischen Bereich für *Pp* in diesem Versuchsaufbau dar.

Die Masseverluste der Kontrollen der großen Proben stimmen mit Angaben aus der Literatur. Nach 8 Wochen und einer Temperatur von 22 °C weist *Pp* einen Masseverlust von 21,5 % in *Pi*-

*Pinus sylvestris* L. (bei Optimaltemperatur 25,8 %) auf (Wälchi 1977). Der entsprechende Mittelwert aus diesem Versuch ist mit 18,4 % etwas geringer. Die Expositionszeit betrug jedoch nur 6 Wochen nach dem Screening Verfahren.

Nach EN 113:1996 in Bezug auf den Ausschluss von Proben, nach der Bewertung der Rohdichten, müssten ausgehend von Tabelle 1 in Kapitel 2.2 einige Prüfkörper ausgeschlossen werden. Die maximale Abweichung von 10 % bei zu behandelnden Proben wird durchgehend überschritten (Minimum und Maximum). Die maximale Abweichung von 20 % bei den nicht behandelten Proben wird jedoch durchgehend eingehalten. Die Ergebnisse des Masseverlustes durch behandelte Proben sind trotz des theoretischen Ausschlussverfahrens nach Norm schlüssig.

Zur visuellen Bestimmung der Oxalate unter dem Lichtmikroskop und am FEREM sind grundsätzliche Anmerkungen zu machen. CaOx wird entweder als Weddellit oder Whewellit mit glatter Oberfläche ausgefällt. Abbildungen als Referenzen für die Bestimmung von CaOx sind zu finden in Huckfeldt & Schmidt 2015; Tang et al. 2013; Hastrup et al. 2012; Nagy et al. 2012; Guggiari et al. 2011; Pinzari et al. 2010; Rio et al. 2008; Schilling & Jellison 2007; Green et al. 1996; Dutton et al. 1993; Eriksson et al. 1990; Rayner & Boddy 1988 und Cromack et al. 1979.

CuOx wird als stark gelayerter Moolooit ausgefällt. Abbildungen dafür sind zu finden in: Tang et al. 2013; Romann et al. 2009; Fomina et al., 2005; Gharieb et al. 2003; Clausen et al. 2000 und Murphy & Levy 1983.

Zusätzlich zum optischen Analyseverfahren (Anhang, Abbildung 31 und 32) sind weitere Bemerkungen anzuführen:

- 1.) Als optische Referenzbezüge wurden die o.g. Literaturquellen mit den dargestellten Abbildungen und unter Beachtung der Entstehungsbedingungen verwendet. Abbildung 4 in Kapitel 1.1.4 verdeutlicht die stark gelayerete Struktur von CuOx, somit ist eine klare Fokussierung des Kristalls auf Grund der Lichtbrechung unter dem Lichtmikroskop schwierig. In Abbildung 5 aus Kapitel 1.1.4 sind verschiedene Ausprägungen von CuOx dargestellt. Die Ausformungen und Größen variieren.
- 2.) *Pinus sylvestris* L. besitzt heterozelluläre Holzstrahlen mit teilweise gezähnten prosenchymatischen Quertracheiden (Grosser 2007). Die parenchymatischen Zellen der Holzstrahlen sind lebende Zellen im Splintholz im Baum (Matyssek et al. 2010). Unter dem Lichtmikroskop sind nach der gesamten mechanischen und biologischen Beanspruchung der Proben teilweise noch deutlich Cytoplasma mit Zellkern und Speicherstoffen (Stärke) zu erkennen, z.B. in Abbildung 23 aus Kapitel 3.5. Zellinhaltsstoffe im Strahlparenchym beeinträchtigen das Sichtfeld.
- 3.) Es befinden sich Artefakte vom Schneiden und präparieren, vor allem in den lichtmikroskopischen Proben

- 4.) In der Literatur werden verschiedene anisotropische Ausprägungsformen von CuOx-Nanokristallen, in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen und der Zeit beschrieben (Romann et al. 2009).
- 5.) Basidiomyceten sind in der Lage CaOx sowohl in Form von Weddellit-Kristallen (Dihydrat:  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), als auch in Form von Whewellit-Kristallen (Monohydrat:  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) auszufällen (Rio et al. 2008).
- 6.) Es gibt verschiedene Ansätze in der Wissenschaft zur Lebensdauer von CaOx. Visuelle Zählungen von Calciumkristallen auf MEA von Weißfäule-erregenden Basidiomyceten ergaben einen überraschenden Rückgang der Kristalle und eine Reduktion des Oxalsäuregehaltes nach ca. einer Woche im Labortest (Guggiari et al. 2011). Dementgegen stehen Untersuchungen zur Kation-Konzentration u.a. von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in *Picea abies* L. im Erdkontakt in Gefäßen als Labortest. Hier steigt die Calcium-Ionen-Konzentration mit *Pp* behandelten Proben über 8 Monate stetig an und ist höher als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen der Kontrollen (Ostrowsky et al. 1997). Generell unterschiedliche, pilzabhängige Aussagen aus der Literatur sind in Goodell et al. 2003 beschrieben.
- 7.) Die Kristalle verändern ihre Form infolge ihres Wachstums in Abhängigkeit von der Zeit. So wurde CuOx in einer Ausbildung wie aus Abbildung 4 aus Kapitel 1.1.4 nach 154 Tagen Exposition lokalisiert und Ausformungen von CaOx bereits nach 12 Tagen (Tang et al. 2013).
- 8.) CaOx in Weddellit-Form kann CuOx in der  $\alpha$ - Perspektive nach Romann et al. 2009 stark ähneln.

Die Punkte 1 bis 8 führen dazu, die entstandenen Aufnahmen unter dem Lichtmikroskop und FEREM teilweise unter Abwägungen zu bestimmen. Deshalb steht in den Abbildungen aus dem Ergebnisteil bei nicht eindeutigen Sachverhalten „wahrscheinlich“ in der Bildunterschrift. Zudem wurde nur nach CuOx und CaOx und nicht nach anderen Oxalaten der Oxalsäure (Kaliumoxalat) detektiert. Bei den Proben mit einer WA von  $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  (Lichtmikroskopie) waren die Kreuzungsfelder infolge des Holzabbaus teilweise nicht mehr oder nur noch vereinzelt vorhanden. Die Suche nach Oxalaten im Kreuzungsfeld war somit erschwert. Oxalate die sich vorher evtl. in den Holzstrahlen befanden und dort ausgefällt wurden, konnten ungehindert in die Tracheiden gelangen. Alle verwendeten Proben für die Lichtmikroskopie stammen von *Pinus sylvestris* L. mit den kleineren Dimensionsabmessungen, da hier in allen Proben ein deutlicher Masseverlust festzustellen war. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass auch in den Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3$  sowohl CaOx als auch CuOx lokalisiert werden kann.

Die typischen optischen Merkmale der Destruktion des Holzes sind unter dem Lichtmikroskop und dem FEREM gut zu erkennen. Tüpfel werden beschädigt und die Hyphen durchwachsen die

angrenzenden Tracheiden. Die Zellwände der Strahlen und Tracheiden sind rissig. Zudem besiedelt *Pp* das Holz in longitudinaler Richtung an der Oberfläche zuerst über die Holzstrahlen und breitet sich von dort durch die Fenstertüpfel in axiale Richtung über die Tracheiden aus. Diese Beobachtungen passen zu Beschreibungen zur Besiedlung von Holz durch holzerstörende Pilze in der Literatur (Eaton & Hale 1993). Bei den FEREM-Aufnahmen können Destruktionsmerkmale infolge der Trocknung anstatt durch den Holzabbau entstanden sein. Zudem können sich die Hyphen durch den Trocknungsvorgang „zusammen ziehen“ und somit entsteht eine veränderte Hyphenstruktur.

Aus der Besiedlungsstrategie der Pilze folgt der Schluss, dass in allen verwendeten Proben deutlich mehr Hyphen in den Tracheiden der Randzonen zu erkennen sind als in den Tracheiden der Probenmitte. An den Randzonen können die Hyphen über den Querschnitt direkt in die Tracheiden wachsen ohne den Umweg über die Strahlen nehmen zu müssen. Die Fundorte der CaOx- und CuOx-Kristalle sind fast immer im Zusammenhang mit Hyphen festgestellt worden. Durch die Vorbereitung der Mikrotomschnitte (schneiden, in Einbettmedium legen, färben, etc.) ist eine verfremdete lokale Anordnung von Hyphen und Kristallen möglich. Ebenso können Kristalle durch mechanische Beanspruchung entfernt werden und Hyphen bleiben an der Zellwand haften und umgekehrt. Bei den Aufnahmen vom FEREM und EDXA ist dieses Problem deutlich weniger zutreffend (Oberfläche ohne Schnittbeanspruchung).

Ohne Anwesenheit von Kupfersulfat können nur CaOx-Kristalle ausgefällt werden. Zudem ist in den behandelten Proben zusätzlich zum CaOx auch immer CuOx festgestellt worden, außer in der Probenmitte der Proben mit einer WA von  $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$  (Lichtmikroskopie, Tabelle 7). In den Holzstrahlen aus der Probenmitte dieser Proben wurde CuOx gefunden, CaOx jedoch nicht. Das heißt jedoch nicht, dass in diesem Bereich kein CaOx vorhanden sein könnte. Zum einen ist die Aktivität des Pilzes durch die Ausfällung von CuOx in dem Bereich verdeutlicht und zum anderen sind die durchgeführten Untersuchungen nur Stichproben aus den beschriebenen Arealen und dem insgesamt vorhandenen Probenmaterial.

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Sichtung von Kristallen unter dem Lichtmikroskop

	Holzstrahlen				Tracheiden			
	Randzone		Probenmitte		Randzone		Probenmitte	
	CuOx	CaOx	CuOx	CaOx	CuOx	CaOx	CuOx	CaOx
<i>Pp</i> Kontrolle	-	+	-	x	-	+	-	x
<i>Pp</i> $0,7 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pp</i> $1,4 \text{ kg/m}^3 \text{ Cu}$	+	+	+	-	+	+	-	-
		- kein Fund	+ Fund		x keine Aufnahmen vorhanden			

Auffällig sind die lichtmikroskopischen Ergebnisse aus den Tracheiden der Probenmitte bei 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu. Da dort weder CuOx noch CaOx in den Tracheiden gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass *Pp* hier noch nicht in die axiale Ausbreitung übergegangen ist bzw. noch nicht zur Ausfällung von Oxalaten gekommen ist. Dafür sprechen mehrere Faktoren. Zum einen der geringere Masseverlust der Proben im Zusammenhang mit der Zeit (Screening-Verfahren) und zum anderen die höhere Konzentration Kupfersulfat, was das Wachstum von *Pp* hemmt. Dazu kommt die Besieglungsstrategie von Braunfäulepilzen (Eaton & Hale 1993) und die Verteilung von Kupfer im Holz (Evans et al. 2013). Das Kupfersulfat durchdringt das Holz bei der Tränkung auf gleichem Wege wie die Pilze das Holz besiedeln. Auch durch die Tränkung mit einem HSM ändert der Pilz seine Besiedlungswege nicht (Liese 1975). Das bedeutet, dass durch die höhere Konzentration Kupfersulfat im Holz die Ausbreitung von *Pp* in *Pinus sylvestris* L. deutlich gehemmt ist.

In Bereichen in denen in einer gewissen Umgebung keine Hyphen bestimmt worden sind, konnten bei der Lichtmikroskopie und beim FEREM auch keine Kristalle lokalisiert werden. Dagegen ist häufig CaOx direkt an der Hyphe festgestellt worden. Der direkte Kontakt von CuOx zu den Hyphen war bei der Lichtmikroskopie nicht so stark gegeben wie der von CaOx. Eine reale und genaue Beschreibung der Lage der Oxalate in Beziehung zu den Hyphen aufgrund von lichtmikroskopischen Aufnahmen zu schildern ist schwierig, da die Hyphen hyalin sind (Huckfeldt & Schmidt 2015). Festzustellen ist, dass CuOx in den Hyphen unter dem Lichtmikroskop nicht gefunden wurden, da nicht zu erkennen ist, ob hyaline Hyphen die Kristalle umschließen oder die Kristalle nur aufgelagert sind. Zusätzlich wurde in nachgestellten lichtmikroskopischen Untersuchungen auf MEA festgestellt, dass sich keine CuOx-Kristalle vor der Hyphenfront gebildet haben. Die Bildung des CuOx erfolgte erst mit zeitlichem Versatz von 1 bis 2 Tagen innerhalb des Bewachsenen Raumes. Ferner wurden gesonderte lichtmikroskopische Untersuchungen sowohl vom Oberflächenmycel von *Pp* als auch von modifiziertem MEA (1000 ppm Cu) durchgeführt. Bei beiden Untersuchungen ist CuOx festgestellt worden. Aufgrund der hyalinen Hyphen kann auch hier keine eindeutige intrazelluläre oder extrazelluläre Zuordnung der Oxalate erfolgen, siehe Anlage, Abbildung 33.

Einige Hyphen wiesen deutliche blasige Anschwellungen auf und waren z.T. aufgeplatzt, siehe Abbildung 24, Kapitel 3.5 und Abbildung 26, Kapitel 3.6. Blasige Anschwellungen der Grundhyphen von *Pp* sind auch in Huckfeldt & Schmidt 2015 beschrieben.

Durch die Bilder aus dem FEREM-Verfahren tritt das Problem der hyalinen Hyphen durch die Bespatterung in den Hintergrund. Allerdings ist das Sichtfeld in die Hyphen durch die Bespatterung verwehrt. Hyphen mit offenen Stellen sind jedoch gut zu untersuchen. In Abbildung 26 a) aus Kapitel 3.6 ist eine aufgeplatzte Hyphenausbuchtung mit Inhalt zu erkennen. Die Oxalate, die sich innerhalb der Hyphe befinden, sind weniger stark „gelayert“ als die Oxalate außerhalb der

Hyphe. Aufgrund von verschiedenen Referenzbildern ist jedoch davon auszugehen, dass sich innerhalb der Hyphe kein CaOx befindet. Nach Green, et al., 1996 sind jedoch innerhalb des Hyphenmantels von *Pp* CaOx-Formationen in Whewellit-Form (Monohydrat) mittels EDS lokalisiert worden. Dementgegen stehen wiederum die Abbildung 26 c) und d) aus Kapitel 3.6., da hier stärker gelayerte Formationen in den aufgeplatzten Hyphenenden zu sehen sind. Die optische Beurteilung deutet darauf hin, dass es sich hierbei um CuOx handelt. Das deutliche Erkennen einer Struktur ist jedoch jeweils blickwinkelabhängig. Eine Elementanalyse solcher Bilder wäre sehr aufschlussreich.

*Pp* ist befähigt mikrokristalline, röhrenförmige Depots außerhalb der Hyphe zu bilden (Rayner & Boddy 1988). Diese Strukturen enthalten CuOx (Dutton & Evans 1996). Zudem können sich CaOx-Agglomerate an den Hyphen von *Pp* befinden (Eriksson et al. 1990). Beide beschriebenen Sachverhalte sind in Abbildung 27 d) in Kapitel 3.6 gut sichtbar. In den FEREM-Aufnahmen sind die kristallinen Strukturen der Oxalate im direkten Zusammenhang mit den Hyphen eindeutiger zu erkennen als unter dem Lichtmikroskop. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie konnten stark gelayerte Oxalat-Strukturen auch in den Hyphenenden lokalisiert werden (Abbildung 26 c) und d)). Daraus resultiert die Frage, ob CuOx-Kristalle in ihren Anfangsstadien tatsächlich in den Hyphenspitzen von *Pp* gebildet werden. Die intrazelluläre Chelation von Kupfer ist bei kupfertoleranten Pilzen bereits beschrieben (Cervantes & Gutierrez-Corona 1994). Wenn CuOx intrazellulär gebildet wird, widerspricht das der Aussage aus Abbildung 6 aus Kapitel 1.1.4. Zudem stellt sich die Frage, wie lange die Oxalate in den Hyphenenden wachsen bevor sie von der Hyphe frei gegeben werden. Das wiederum wirft weitere Fragen auf. Um die Oxalate (CuOx und CaOx) vom intrazellulären in den extrazellulären Raum frei zu geben, muss die Zellwand der Hyphen geöffnet werden. Opfert *Pp* Hyphen für diesen Vorgang, regenerieren sich diese wieder oder stecken noch andere Mechanismen dahinter?

Der vollständige Mechanismus der Holzerstörung durch holzerstörende Pilze ist nicht geklärt (Schilling et al. 2013). Die Ausformungen der Oxalate sind abhängig von verschiedenen Parametern (Pilz, Umgebungsmedium, Zeit, pH-Werte) und zudem sind verschiedene Literaturangaben über Anreicherung und Produktionsort von CaOx beschrieben (Goodell et al. 2003; Dutton & Evans 1996; Rayner & Boddy 1988). Dabei sind die Ausformungen und Aufzeichnungen über die Ausfällung von CaOx in der Literatur häufiger beschildert als die Hintergründe zu den Ausformungen von CuOx. Demnach sind weiterführende Untersuchungen nötig um die eindeutige Bestimmung von CuOx und die exakten Orte der Ausfällung der Oxalate im Zusammenhang mit den Hyphen, der Zeit und den Umgebungsparametern durchzuführen. Eine Elementanalyse in Form vom Mappings der Abbildung 26 und der Abbildung 27 hätte sehr aufschlussreiche Informationen geben können um die Annahmen aus dieser Arbeit zu verifizieren oder zu falsifizieren.

In beiden Verfahren der Elementanalyse, sowohl im Mapping als auch in den Punktmessungen, wurden Oxalate als CuOx identifiziert, siehe Abbildung 28 und 29, sowie Tabelle 6. Aussagen über die Ausfällung von CuOx in den Hyphen können auf Grundlage der vorhandenen Elementanalysen nicht getroffen werden.

Die hohen Kohlenstoffanteile resultieren aus dem Sputter Coating. Zudem ist Kohlenstoff in Chitin, Oxalsäure und Kupferoxalat vorhanden. In der Punktmessung 1 ist zu bemerken, dass sich neben einem hohen Kupferanteil von 31 relativen Atomprozent auch 0,5 relative Atomprozent Calcium in unmittelbarer Nähe befinden (Tabelle 6). Das Vorhandensein von Calcium und Schwefel in Punktmessung 1 könnte auch aus der Bildung von Calciumsulfat ( $\text{CaSO}_4$ ) stammen. Dabei wird Schwefel aus dem Sulfat-Anionen (in Kupfersulfat und Schwefelsäure vorhanden (Formel 11)) bezogen und Calcium-Kationen sind infolge des Holzabbaus aus dem Pektin vorhanden (Jellison et al. 1997). Der geringe Anteil von Kupfer von 6,9 relativen Atomprozent in Punktmessung 2 weist nicht eindeutig auf die Anwesenheit von CuOx hin. Der Kupferanteil stammt eher aus dem Kupfersulfat. Der Sauerstoffgehalt ist in dieser Punktmessung jedoch sehr hoch (Tabelle 6). Da nicht nach Wasserstoff (H) detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass es sich hier um eine Stelle mit hohem Wassergehalt ( $\text{H}_2\text{O}$ ) handeln könnte. Die geringen Anteile von Phosphor, Chlor und Kalium sind schlüssig, da diese, wie auch Schwefel, im Holz vorhanden sind (Schriever 1984; Rowell, 2005). In weiterführenden Untersuchungen dieser Art sollte zusätzlich nach Stickstoff (N) detektiert werden. Hyphen bestehen aus Chitin ( $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$ ) und darin ist Stickstoff enthalten. Wenn Oxalate mit Hyphen oder Membran-Artefakten überzogen sind, kann somit Chitin im Zusammenhang mit einem Überzug durch Hyphen gebracht werden. Dabei ist der natürliche Anteil an Stickstoff im Holz zu berücksichtigen.

Die Aussagen der Elementanalysen sind nicht mit Wahrscheinlichkeiten belastet wie die Berichte über die lichtmikroskopischen Bilder und die FEREM-Abbildungen. Jedoch sind die Atomprozentangaben relativ, da nur nach gewissen Elementen detektiert wurde. Andere Elemente können in dem jeweiligen folglich Bereich auch vorhanden sein, sind aber in der Tabelle 6 nicht erfasst. Somit sind die Atomprozentanteile relativ zu verstehen.

Aus den Ergebnissen in Kapitel 3 und der Diskussion in Kapitel 4.1 und 4.2 wird der Begriff Kupfertoleranz und der dahinter stehende Mechanismus hinterfragt. In der Literatur wird vorwiegend über kupfertolerante Eigenschaften von holzerstörenden Pilzen (Schmidt 2006; DeGroot & Woodward 1999; Young, 1961) im Zusammenhang mit der Ausfällung von CuOx (Tang, et al. 2013; Ghariieb et al. 2003; Clausen et al. 2000; Fomina et al., 2005) berichtet. Das in dieser Arbeit verwendete Kupfersulfat ist eine kupferbasiertes HSM und als weitere Komponente befindet sich Sulfat in diesem „2-Komponenten-System“. Das Sulfat-Anion hat auch eine biozide Wirkung

(Leithoff & Melcher 1999). Aus der Anwesenheit bestimmter Stoffe und den bisherigen Erkenntnissen resultieren folgende chemische Zusammenhänge (Wort- und Reaktionsgleichung):



Die Reaktionen finden in einer wässrigen Phase statt, da die Feststoffe (reines Kupfersulfat und Oxalsäure) sonst nicht miteinander reagieren können. Die Oxalsäure spielt in den chemischen Prozessen des Holzabbaus eine Schlüsselrolle, da diese für die initiale nicht-enzymatische Fenton Reaktion gebraucht wird, siehe Abbildung 3 in Kapitel 1.1.2 (Green et al. 1991). Das bedeutet *Pp* muss Oxalsäure produzieren um das Holz abzubauen und besiedeln zu können. Gleichzeitig reduziert die Produktion von Säure den pH-Wert des Mediums. Enthält das Holz (*Pinus sylvestris* L.) zusätzlich andere Stoffe wie das HSM Kupfersulfat, tritt die Oxalsäure auch mit diesen Stoffen in eine chemische Wechselwirkung (Formel 10 und 11). Die Ausfällung von CuOx findet vornehmlich in einem sauren Milieu, unter Anwesenheit von Oxalsäure statt (Castro et al. 2008). Das heißt die Ausfällung von CuOx ist ein Effekt der Auftritt, solange die Dosis des HSM nicht toxisch für den Pilz ist. Das Biozid (Fungizid) Kupfer wird durch die Reaktion (Formel 11) in den für *Pp* nicht fungizid wirkenden Stoff CuOx gebunden. Die biozide Wirkung von Kupfer im CuOx ist nicht gegeben, da CuOx unlöslich ist. Dies geschieht zum Vorteil von *Pp*. Je mehr Oxalsäure jedoch mit dem HSM reagiert und nicht für den Prozess des Holzabbaus bereit steht, desto mehr Oxalsäure muss vom Pilz produziert werden, sofern dieser dazu fähig ist. Der Nachteil für den Pilz einer erhöhten Oxalsäureproduktion in Kombination mit der CuOx-Ausfällung, ist jedoch die gleichzeitige relative Erhöhung der Konzentration der dissoziierten Sulfat-Anionen aus der Schwefelsäure. Diese wiederum haben eine biozide Wirkung auf Basidiomyceten wie *Pp* (Leithoff & Melcher 1999). Liegt folglich Kupfer in einer nicht-toxischen Konzentration im Kupfersulfat bzw. in einer umgewandelten unlöslichen Form als Oxalat vor, wirkt das Sulfat-Anion toxisch auf *Pp* obwohl Kupfer in einer anderen chemischen Verbindung anwesend ist.

Aus den Ergebnissen und der Diskussion treten 2 Schlüsse in den Vordergrund:

- 1.) Kupfertoleranz als allgemeiner Begriff bedarf einer generell intensivieren Auseinandersetzung mit der jeweiligen dazugehörigen Komponente bzw. mit den jeweiligen dazugehörigen Komponenten des entsprechend verwendeten HSM.
- 2.) Intrazelluläre Produktion von CaOx ist in der Literatur bekannt (Dutton & Evans 1996), d.h. intrazelluläre Produktion von Oxalat ist möglich. Für eine ebenfalls intrazelluläre Produktion von CuOx sind in dieser Arbeit viele Hinweise herausgearbeitet worden.

## 5. Schlussfolgerungen

Aus den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit können folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- 1.) *Poria placenta* senkt nachweislich den pH-Wert, sowohl auf unmodifiziertem als auch mit Kupfersulfat modifiziertem Malzextrakt-Agar.
- 2.) Bei der Verwendung des Begriffs „kupfertoleranter Pilze“ sind der Zusammenhang und die Wechselwirkung mit den weiteren Substanzen in dem jeweiligen Holzschutzmittel zu diskutieren und zu beachten.
- 3.) *Poria placenta* fällt Kupferoxalat in mit Kupfersulfat modifizierten Malzextrakt-Agar aus.
- 4.) Eine höhere Lösungsaufnahme Kupfersulfat führt zu weniger Masseverlust durch *Poria placenta* in *Pinus sylvestris* L.
- 5.) *Poria placenta* fällt Calciumoxalat in Weddellit-Form im Zuge des Holzabbaus, sowohl in unbehandelten als auch in mit Kupfersulfat behandelten *Pinus sylvestris* L.-Proben, aus.
- 6.) *Poria placenta* fällt Kupferoxalat in mit Kupfersulfat behandelte *Pinus sylvestris* L. aus.
- 7.) Eine höhere Lösungsaufnahme Kupfersulfat führt zu geringerer Ausfällung von Calciumoxalat und Kupferoxalat in *Pinus sylvestris* L.
- 8.) Die Ausfällung von Kupferoxalat durch *Poria placenta* in *Pinus sylvestris* L. hat verschiedene Ausprägungsformen, diese sind abhängig von der Zeit.

Lichtmikroskopie, FEREM, EDXA

Mit allen drei Verfahren sind eindeutig Oxalat-Ausformungen zu erkennen. Zudem ist CuOx direkt neben CaOx festgestellt worden. Um klar verifizierte Aussagen zu treffen, bei welcher Ausformung es sich um welches Oxalat handelt, sind weitere Elementanalysen unabdingbar. Besonderer Fokus sollte dabei im direkten Bezug zur Lage der Hyphen beachtet werden. Die Ausfällung von CuOx bzw. Vorstufen davon direkt in den Hyphen, konnte in allen drei Verfahren nicht bewiesen werden, es gibt jedoch optische Hinweise die stark dafür sprechen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit konnte eine gewisse Toleranz von *Pp* gegen Kupfersulfat verifiziert werden. Zudem wurde das Wachstum im sauren Milieu dokumentiert. Mit steigender Lösungsaufnahme Kupfersulfat sinkt jedoch der Grad der Holzerstörung. Im Zuge des Holzabbaus werden Oxalate in *Pinus sylvestris* L. ausgefällt. CaOx wird in allen verwendeten Varianten der Holzbehandlung ausgefällt. CuOx wird nur im Beisein von Kupfersulfat ausgefällt. Die Ausfällung von Oxalaten sinkt mit steigender Lösungsaufnahme des HSM. Die Hyphenstruktur von *Pp* zeigt blasenähnliche Ausformungen. In aufgeplatzten Ausformungen sind Oxalatformationen unterschiedlich stark ausgeformter Struktur festgestellt worden.

Zukünftige, auf dieser Arbeit aufbauende Versuche sind zu empfehlen. Zum einen kann der gesamte Versuchsaufbau durch ein anderes kupferbasierendes, wasserlösliches HSM ersetzt werden, um vergleichende Untersuchungen durchzuführen. Zum anderen sind weitere Elementanalysen von Oxalatformationen in den Hyphen enorm aufschlussreich.

Zusätzlich können andere bekannte kupfertolerante Pilze bezüglich ihrer Toleranz gegen Kupfersulfat und einem anderen kupferbasierendem HSM im Hinblick auf ihre r-Faktoren analysiert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Arantes, V., Jellison, J., & Barry, G. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 94*, S. 323–338.
- Arora, D. K., Rai, B., Mukerji, K., & Knudsen, G. R. (1991). *Handbook of applied mycology - volume 1: Soil and plants*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Becker, G. (1967). Wirksamkeit von Kupfer-Verbindungen und Kupfer enthaltenden Holzschutz-Salzgemischen gegen Hausbockkäfer-Larven. *Holz als Roh- und Werkstoff Vol. 25*, S. 416-421.
- Binker, G., Brückner, G., Flohr, E., Huckfeldt, T., Noldt, U., Parisek, L., Rehbein, M., Wegner, R. (2014). *Praxis-Handbuch Holzschutz Beurteilen, Vorbereiten, Ausführen*. Köln: Verlagsgesellschaft Rudolf Müller GmbH & Co. KG.
- Bravery, A. (1979). Screening techniques for potential evaluation of preservative chemicals. A miniaturised wood-block test for the rapid evaluation of preservative fungicides. *Principles of a special seminar held in association of the 10th annual meeting of the IRG-WG*, S. 58-65.
- Castro, K., Sarmiento, A., Martínez-Arkarazo, I., Madariaga, J. M., & Fernández, L. A. (2008). Green copper pigments biodegradation in cultural heritage: From malachite to moolooite, thermodynamic modeling, X-ray fluorescence and Raman evidence. *Analytical Chemistry Vol. 80*, S. 4103–4110.
- Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *Federation of European Microbiological Societies Vol. 14*, S. 121-138.
- Clausen, C. A., & Green, F. (2003). Copper tolerance of brown-rot fungi: time course of oxalic acid production. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 51*, S. 145-149.
- Clausen, C. A., & Green, F. (2003). Oxalic acid overproduction by copper-tolerant brown-rot basidiomycetes on southern yellow pine treated with copper-based preservatives. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 51*, S. 139-144.
- Clausen, C. A., Green, F., Woodward, B. M., Evans, J. W., & DeGroot, R. (2000). Correlation between oxalic acid production and copper tolerance in *Wolfiporia cocos*. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 46*, S. 69-76.
- Collett, O. (1992). Comparative tolerance of the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* (DC.:Fr.) Ryv. isolates to copper. *Holzforschung Vol. 46, No.4*, S. 293-298.
- Cromack, K., Sollins, P., Graustein, W. C., Speidel, K., Todd, A. W., Spycher, G., Li, C.Y., Todd, R. L. (1979). Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biology and Biochemistry Vol. 11*, S. 463-468.

- DeGroot, R. C., & Woodward, B. M. (1999). Using copper-tolerant fungi to biodegrade wood treated with copper-based preservatives. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 44*, S. 17-27.
- DIN 68800-1: 2011. *Holzschutz - Teil 1 Allgemeines*.
- DIN 68800-3: 2012. *Holzschutz - Teil 3 Vorbeugender Schutz von Holz mit Holzschutzmitteln*.
- DIN EN 335: 2013. *Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Gebrauchsklassen: Definitionen, Anwendung bei Vollholz und Holzprodukten*.
- DIN EN 350-1: 1994. *Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz - Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz*.
- Dutton, M. V., & Evans, C. S. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology Vol. 42*, 881-895.
- Dutton, M. V., Evans, C. S., Atkey, P. T., & Wood, D. A. (1993). Oxalate production by Basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology Biotechnology Vol. 39*, S. 5-10.
- Eaton, R., & Hale, M. (1993). *Wood - decay, pests and protection*. London, Glasgow: Chapman and Hall.
- EN 113: 1996. *Holzschutzmittel - Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten - Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit*.
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Espejo, E., & Agosin, E. (1991). Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology Vol. 57*, S. 1980-1986.
- Evans, P., Limaye, A., Averdunk, H., Turner, M., & Senden, T. (2013). Visualization of copper in the voids and cell walls of treated wood using X-ray micro-computed tomography. *The International Research Group on Wood Protection; doc. no IRG/WP 13-40640*.
- Fengel, D., & Wegener, G. (2003). *Wood - chemistry, ultrastructure, reactions*. Remagen: Kessel Verlag.
- Fomina, M., Hillier, S., Charnock, J. M., M. K., Alexander, I. J., & Gadd, G. M. (2005). Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and environmental microbiology Vol. 71, No. 1*, S. 371-381.
- Freeman, M. H., & McIntyre, C. R. (2008). A comprehensive review of copper-based wood preservatives. *Forest Products Journal Vol. 58*, S. 6-27.
- Gharieb, M. M., Ali, M. I., & El-Shoura, A. A. (2003). Transformation of copper oxochloride fungicide into copper oxalate by tolerant fungi and the effect of nitrogen source on tolerance. *Biodegradation Vol. 15*, S. 49-57.

- Goodell, B., Nicholas, D. D., & Schultz, T. P. (2003). *Wood deterioration and preservation - advances in our changing world*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Green, F., & Clausen, C. A. (2005). Copper tolerance of brown-rot fungi: oxalic acid production in southern pine treated with arsenic-free preservatives. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 56*, S. 75-79.
- Green, F., & Highley, T. L. (1997). Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 39*, S. 113–124.
- Green, F., Kuster, T. A., & Highley, T. L. (1996). Pectin degradation during colonization of wood by brown-rot fungi. *Recent Research Development in Plant Pathology Vol. 1*, S. 83-93.
- Green, F., Larsen, M. J., & Highley, J. E. (1991). Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. *Material und Organismen Vol. 26*, S. 191-213.
- Grosser, D. (1985). *Pflanzliche und tierische Bau- und Werkholzschädlinge*. Leinfelden-Echterlingen: DRW-Verlag.
- Grosser, D. (2007). *Die Hölzer Mitteleuropas - ein mikrophotografischer Lehratlas (Reprint der 1. Auflage von 1977)*. Remagen: Verlag Kessel.
- Guggiari, M., Bloque, R., Aragno, M., Verrecchia, E., Job, D., & Junier, P. (2011). Experimental calcium-oxalate crystal production and dissolution by selected wood-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 65*, S. 803-809.
- Hastrup, A. C., Green, F., Clausen, C. A., & Jensen, B. (2005). Tolerance of *Serpula lacrymans* to copper-based preservatives. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 56*, S. 173-177.
- Hastrup, A. C., Green, F., Lebow, P. K., & Jensen, B. (2012). Enzymatic oxalic acid regulation correlated with wood degradation in four brown-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 75*, S. 109-114.
- Hill, C. (2006). *Wood modification - chemical, thermal and other processes*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Huckfeldt, T., & Schmidt, O. (2006). *Hausfäule- und Bauhauspilze Diagnose und Sanierung*. Köln: Verlagsgesellschaft Rudolf Möller GmbH & Co. KG.
- Huckfeldt, T., & Schmidt, O. (2015). *Hausfäule- und Bauhauspilze Diagnose und Sanierung, 2. Auflage*. Köln: Verlagsgesellschaft Rudolf Müller GmbH & Co. KG.
- Humar, M., Petrič, M., & Pohleven, F. (2001). Changes of the pH value of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *Holz als Roh- und Werkstoff Vol. 59*, S. 288-289.
- Humar, M., Šentjerc, M., Amartey, S. A., & Pohleven, F. (2004). Influence of acidification of CCB (Cu/Cr/B) impregnated wood on fungal copper tolerance. *Chemosphere Vol 58*, S. 743-749.

- Jellison, J., Jon Connolly, B. G., Doyle, B., Illmann, B., Fekete, F., & Ostrofsky, A. (1997). The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. *International Biodeterioration and Degradation Vol. 39*, S. 165-179.
- Kempe, K. (2009). *Holzschädlinge - Vermeiden, Erkennen, Bekämpfen*. Berlin: Fraunhofer IRB Verlag, Huss Medien.
- Koch, A. (1975). The kinetics of mycelial growth. *Journal of General Microbiology* 89, 209-216.
- Kollmann, F. (1982). *Technologie des Holzes und der Holzwerkstoffe (Bd 1)*, 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Krieglsteiner, G. J. (2000). *Die Großpilze Baden-Württembergs Band 1: Allgemeiner Teil; Ständerpilze: Gallert-, Rinden-, Stachel- und Porenpilze*. Stuttgart (Hohenheim): Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Kürschner, K. (1966). *Chemie des Holzes*. Berlin: Technischer Verlag Herbert Cram.
- Leithoff, H., & Melcher, E. (1999). The biocidal efficacy of sulphates against basidiomycetes. *The International Research Group on Wood Preservation; doc. no IRG/WP/99-30192*.
- Liese, J. (1954). *Holzschutz*. In Walter Liese und Cecilie Gröger (Hrsg.); Berlin: VEB Verlag Technik.
- Liese, W. (1975). *Biological transformation of wood by microorganisms*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Mai, C., & Militz, H. (2012). *Taschenbuch der Holztechnik*. In André Wagenführ und Frieder Scholz (Hrsg.); München: Carl-Hanser Verlag.
- Matyssek, R., Fromm, J., Rennenberg, H., & Roloff, A. (2010). *Biologie der Bäume - von der Zelle zur globalen Ebene*. Stuttgart: Eugen Ulmer KG.
- Micales, J. A. (1997). Localization and induction of oxalate decarboxylase in the brown-rot wood decay fungus *Postia placenta*. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 39*, S. 125-135.
- Murphy, R. J., & Levy, J. F. (1983). Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Transactions of the British Mycological Society Vol. 81*, S. 165-168.
- Nagy, N. E., Kvaalen, H., Fongen, M., Fossdal, C. G., Clarke, N., Solheim, H., & Hietala, A. M. (2012). The pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion parviporum* responds to Spruce xylem defense by enhanced production of oxalic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal Vol. 25*, S. 1450-1458.
- Niemenmaa, O., Uusi-Rauva, A., & Hatakka, A. (2008). Demethoxylation of [O<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>]-labelled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria (Postia) placenta*. *Biodegradation Vol. 19*, S. 555-556.

- Ostrofsky, A., Jellison, J., Smith, K., & Shortle, W. (1997). Changes in cation concentrations in red spruce wood decayed by brown rot and white rot fungi. *Canadian Journal of Forest Research Vol. 27*, S. 567-571.
- Pinzari, F., Zotti, M., Mico, A. D., & Calvin, P. (2010). Biodegradation of inorganic components in paper documents: Formation of calcium oxalate crystals as a consequence of *Aspergillus terreus* Thom growth. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 64*, S. 499-505.
- Rabanus, A. (1940). Beitrag zur laboratoriumsmäßigen Prüfung von Holzschutzmitteln. Das Verhalten von mit Kupfersulfat getränkten Hölzern. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 233-238.
- Rayner, A., & Boddy, L. (1988). *Fungal decomposition of wood - its biology and ecology*. Chichester, New York: John Wiley & Sons Ltd.
- Rio, M. C., Oliveira, B. V., Tomazella, D. P., Silva, J. A., & Pereira, G. A. (2008). Production of calcium oxalate crystals by the Basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Current Microbiology Vol. 56*, S. 363-370.
- Romann, J., Chevallier, V., Merlen, A., & Valmalette, J.-C. (2009). Self-organized assembly of copper oxalate nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry*, S. 5068-5074.
- Rowell, R. M. (2005). *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Boca Raton: Taylor & Friends Group.
- Rüpke, H.-J., & Kürsten, D. E. (4. März 2015). <http://www.holzfragen.de/index.html>. Von [http://www.holzfragen.de/seiten/pilznamen\\_synonyme\\_1.html](http://www.holzfragen.de/seiten/pilznamen_synonyme_1.html) abgerufen
- Schilling, J. S., & Jellison, J. (2005). Oxalate regulation by two brown rot fungi decaying oxalate-amended and non-amended wood. *Holzforschung Vol. 59*, S. 681-688.
- Schilling, J. S., & Jellison, J. (2007). Extraction and translocation of calcium from gypsum during wood biodegradation by oxalate-producing fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 60*, S. 8-15.
- Schilling, J. S., Duncan, S. M., Presley, G. N., Filley, T. R., Jurgens, J. A., & Blanchette, R. A. (2013). Colocalizing incipient reactions in wood degraded by the brown rot fungus *Postia placenta*. *International Biodeterioration and Biodegradation Vol. 83*, 56-62.
- Schmidt, O. (2006). *Wood and tree fungi - biology, damage, protection and use*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Schmidt, O. (2007). Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycology Progress Vol. 6*, S. 261-279.
- Schmidt, O., & Moreth, U. (1996). Biological characterization of *Poria* indoor brown-rot fungi. *Holzforschung Vol. 50*, S. 105-110.

- Schmidt, O., & Moreth, U. (2003). Molecular identity of species and isolates of internal pore fungi *Antrodia* spp. and *Oligoporus placenta*. *Holzforschung* Vol. 57, S. 120-126.
- Schriever, E. (1984). Zur Bestimmung von Chlor und Schwefel in Holz und Holzwerkstoffen. *Holz als Roh- und Werkstoff* Vol. 42, S. 261-264.
- Sierra-Alvarez, R. (2007). Fungal bioleaching of metals in preservative-treated wood. *Process Biochemistry* Vol. 42, S. 798–804.
- Stirling, R., Drummond, J., Zhang, J., & Ziobro, R. J. (2008). Micro-distribution of micronized copper in Southern Pine. *The International Research Group on Wood Protection; doc. no. IRG/WP 08-30479*.
- Tang, J. D., Parker, L. A., Perkins, A. D., S.Sonstegard, T., Schroeder, S. G., Nicholas, D. D., & Diehl, S. V. (2013). Gene expression analysis of copper tolerance and wood decay in the brown rot fungus *Fibroporia radiculosa*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 79, S. 1523-1533.
- Wälchi, O. (1977). Der Temperatureinfluss auf die Holzerstörung durch Pilze. *Holz als Roh- und Werkstoff* Vol. 35, S. 45-51.
- Weisstein, E. (2. März 2015). *Wolfram MathWorld*. Abgerufen am 17. März 2015 von <http://mathworld.wolfram.com/SigmoidFunction.html>
- Young, G. Y. (1961). Copper tolerance of some wood-rotting fungi. *USDA Forest Products Laboratory Report 2223, Madison, Wisconsin*, S. 1-11.
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (1992). *Wood microbiology - decay and its prevention*. San Diego: Academic Press Inc.

## A Anhang

### A1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Beziehungen und Schnittstellen des Gebietes kupfertoleranter Pilze aus verschiedenen Themenkomplexen des Holzes .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Systematische Einteilung der Eumyceten, vereinfacht nach Zabel & Morrell, 1992	9
<b>Abbildung 3:</b> Schema der Fenton Reaktion übersetzt nach Arantes et al. 2012 .....	11
<b>Abbildung 4:</b> REM-Aufnahmen a) CaOx nach Guggiari et al. 2011 als Weddellit und darüber in 3-Achs-Ansichten (A-C); b) CuOx als Moolooit, Bild zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Möller, BASF Wolman GmbH .....	15
<b>Abbildung 5:</b> lichtmikroskopische Aufnahmen von CuOx aus Ausfällungen der Basidiomyceten <i>Poria placenta</i> , <i>Antrodia vaillantii</i> und <i>Tyromyces palustris</i> a) Kristalle 400er Vergrößerung; b) Kristalle 1000er Vergrößerung .....	15
<b>Abbildung 6:</b> Stoffwechselforgänge von Oxalat-Biosynthese und -abbau übersetzt nach Dutton & Evans 1996; A – Oxalacetase; B – Glyoxylat-Dehydrogenase; C – Pryvat-Carboxylase; CaOx innerhalb und außerhalb der Hyphe (schwarz eingekreist) und CuOx außerhalb der Hyphe (rot eingekreist) .....	16
<b>Abbildung 7:</b> Schema des Untersuchungsverfahrens .....	17
<b>Abbildung 8:</b> Dimensionsabmessungen der Proben; links nach EN 113: 1996 und rechts in Anlehnung an Bravery 1979.....	18
<b>Abbildung 9:</b> Konzentrische Ausstanzung des Impfmaterials und Verteilung auf die präparierten Petrischalen; Zahlenwerte in den Petrischalen beziehen sich auf Kupfer (Cu) in ppm .....	20
<b>Abbildung 10:</b> schematischer Aufbau der Petrischalen mit den kleinen Proben; a) Draufsicht und b) Seitenansicht .....	22
<b>Abbildung 11:</b> schematischer Aufbau der Kolleschalen mit den großen Proben; a) Draufsicht und b) Seitenansicht .....	22
<b>Abbildung 12:</b> Schnittbereiche und -tiefen (Maßangaben in mm als Richtwerte) der Mikrotomschnitte in Ansichten .....	26
<b>Abbildung 13:</b> Wachstumsraten (Durchmesser Mycelausdehnung) von <i>Pp</i> auf MEA mit verschiedenen Konzentrationen von Cu; VR 1 (oben) und VR 2 (unten).....	28
<b>Abbildung 14:</b> Wuchsgeschwindigkeiten (Radius) von <i>Pp</i> auf MEA mit verschiedenen Konzentrationen von Cu, VR 1 (oben) und VR 2 (unten).....	29
<b>Abbildung 15:</b> logistische Wachstumskurve (sigmoid) im Vergleich zu ausgewählten Wachstumskurven von <i>Pp</i> aus VR 1 und VR 2 mit den jeweiligen r-Faktoren.....	30
<b>Abbildung 16:</b> pH-Werte auf MEA mit <i>Pp</i> -Impfstücken in den Petrischalen, VR 1 (oben) und VR 2 (unten) mit inneren Messpunkten (dunkelgrün) und äußeren Messpunkten (hellgrün) .....	32

- Abbildung 17:** Korrelationen zwischen Mycelwachstum (+; -) von *Pp* und daraus resultierenden pH-Werten auf MEA von ausgewählten Proben; VR 1 links und VR 2 rechts ..... 33
- Abbildung 19:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. aus Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) Destruktion der Hofüpfel in den Tracheiden durch *Pp* (rote Pfeile); b) Destruktion der Sekundärwände der Tracheiden durch *Pp* (rote Pfeile), Hyphen (blaue Pfeile); a) und b) Radialschnitt..... 34
- Abbildung 18:** Masseverlust durch *Pp* nach 6 Wochen von *Pinus sylvestris* L. mit 2 verschiedenen WA von Cu und Kontrollen; n = 4 ..... 34
- Abbildung 20:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. in unbehandelten Proben a) Destruktion der Holzstrahlen (rote Pfeile); b) Hyphe durch Hofüpfel (blauer Pfeil); c) Hyphen aus Holzstrahl (blauer Pfeil) und Destruktion der Holzstrahlzellwand (roter Pfeil); d) CaOx in Tracheide (schwarze Pfeilspitze); e) CaOx in Tracheide (schwarze Pfeilspitze) und Hyphe (blauer Pfeil); a) bis c) Tangentialschnitte aus den Randzonen; d) und e) Radialschnitte aus den Randzonen ..... 35
- Abbildung 21:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx, CaOx und Hyphen von *Pp* in den Holzstrahlen aus Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) CuOx-Anhäufungen (schwarze Pfeile); b) CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen) und wahrscheinlich CaOx im Holzstrahl, Hyphen in direkt angrenzenden Tracheiden (blaue Pfeile), Destruktion Zellwand (roter Pfeil); c) Hyphe (blauer Pfeil), Probe gefärbt mit astrablau (Parenchym); d) wahrscheinlich CuOx (schwarzer Pfeil), Destruktion (roter Pfeil); a) und c) Radialschnitte aus den Randzonen; b) Tangentialschnitt aus der Randzone; d) Tangentialschnitt aus der Probenmitte ... 36
- Abbildung 22:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx, CaOx und Hyphen von *Pp* in den Tracheiden aus Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) kleine CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen), Hyphe mit direkt anhaftenden CaOx (blaue Pfeile); b) CuOx (schwarzer Pfeil) und CaOx (schwarze Pfeilspitze) mit umgebenden Hyphen (blaue Pfeile); c) CuOx (schwarzer Pfeil) und CaOx (schwarze Pfeilspitzen), Hyphe (blauer Pfeil); d) kleine CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen) in Tracheide direkt unter der Holzoberfläche (gelber Pfeil), CuOx auf der Oberfläche (schwarze Pfeile), Destruktion der Zellwand (roter Pfeil); a), b) und c) Tangentialschnitte aus den Randzonen; d) Tangentialschnitt aus der Probenmitte ..... 37
- Abbildung 23:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx, CaOx und Hyphen von *Pp* in den Holzstrahlen aus Proben mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) kleine CaOx-Kristalle (schwarze Pfeilspitzen), Holzoberfläche (gelber Pfeil); b) CuOx (schwarzer Pfeil), Hyphe (blauer Pfeil); c) CuOx (schwarzer Pfeil); d) wahrscheinlich CuOx (schwarzer Pfeil) aus Öffnung infolge von Destruktion (roter Pfeil); a) und c) Radialschnitte aus den Randzonen; b) Tangentialschnitt aus der Randzone; d) Tangentialschnitt aus der Probenmitte ..... 38

- Abbildung 24:** lichtmikroskopische Aufnahmen in *Pinus sylvestris* L. von CuOx und Hyphen von *Pp* in den Tracheiden aus Proben mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) Hyphe mit blasiger Anschwellung oben und Hyphe durch Tüpfel darunter (blaue Pfeile); b) Hyphe mit blasiger Anschwellung (blauer Pfeil); c) wahrscheinlich CuOx (schwarze Pfeile), Hyphen (blaue Pfeile); d) Hyphe mit blasiger Anschwellung (blauer Pfeil) und Hyphenenden (blaue Pfeilspitzen); a), b) und d) Radialschnitte aus den Randzonen; c) Tangentialschnitt aus der Randzone ..... 39
- Abbildung 25:** FEREM-Aufnahmen auf *Pinus sylvestris* L. von Hyphen von *Pp* in unbehandelten Proben; a) Hyphen (blaue Pfeile) und Destruktion von Hoftüpfeln (rote Pfeile); b) CaOx als Weddellit (schwarze Pfeilspitze) im Hyphengeflecht; c) Hyphe (blauer Pfeil) und Destruktion der Zellwand (roter Pfeil); d) Hyphe durch Hoftüpfel (blauer Pfeil) und Destruktion des Tüpfels (roter Pfeil); a) bis d) Radialschnitte an der Oberfläche ..... 40
- Abbildung 26:** FEREM-Aufnahmen auf *Pinus sylvestris* L. von CuOx und Hyphen von *Pp* an der Oberfläche der Proben mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) Hyphe mit blasiger Anschwellung (blauer Pfeil) wahrscheinlich mit CuOx-Inhalt (schwarze Pfeilspitze) und Hyphe umgeben von CuOx (schwarzer Pfeil); b) CuOx in Tracheiden (schwarze Pfeile) und Hyphe (blauer Pfeil) sowie Destruktion der Zellwand (roter Pfeil); c) Hyphengeflecht (blauer Pfeil) mit stark gelayerten Oxalaten (schwarze Pfeile) an den Hyphenenden; d) Hyphe (blauer Pfeil) umschließt CuOx (schwarzer Pfeil); a) bis d) Oberfläche..... 41
- Abbildung 27:** FEREM-Aufnahmen auf *Pinus sylvestris* L. von CuOx und Hyphen von *Pp* an der Oberfläche der Proben mit einer WA von 1,4 kg/m<sup>3</sup> Cu; a) CuOx-Agglomerat in linker Tracheide unter dem Kreuzungsfeld (schwarzer Pfeil) und Spuren einer sich ehemals dort befindlichen Hyphe in der rechten Tracheide unter dem Kreuzungsfeld (blauer Pfeil); b) CuOx im Kreuzungsfeld (schwarze Pfeile); c) CuOx (schwarzer Pfeil) unmittelbar am Hyphengeflecht (blaue Pfeile); d) kristallines CuOx (schwarzer Pfeil) und wahrscheinlich CaOx (schwarze Pfeilspitze), beides unmittelbar an der Hyphe (blauer Pfeil); a) bis d) Oberfläche..... 42
- Abbildung 28:** Mapping 1 an der Oberfläche von *Pinus sylvestris* L. mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; links REM-Aufnahme mit ausgewählten Bereichen von nachgewiesenem Kupfer (gelbe Kreise) und rechts Elementanalyse der REM-Aufnahme nach Kupfer in ausgewählten Bereichen (gelbe Kreise) ..... 43
- Abbildung 29:** Mapping 2 an der Oberfläche von *Pinus sylvestris* L. mit einer WA von 0,7 kg/m<sup>3</sup> Cu; links REM-Aufnahme mit ausgewählten Bereichen von nachgewiesenem Kupfer (gelbe Kreise) und rechts Elementanalyse der REM-Aufnahme nach Kupfer (rot) in ausgewählten Bereichen (gelbe Kreise) und Kohlenstoff (grün) ..... 43
- Abbildung 30:** Mycelausschlag (gelbe Pfeile) in den Petrischalen bei 2000 ppm/Cu VR 1 links und VR 2 rechts..... 68
- Abbildung 31:** optische Analytik von CaOx ..... 68

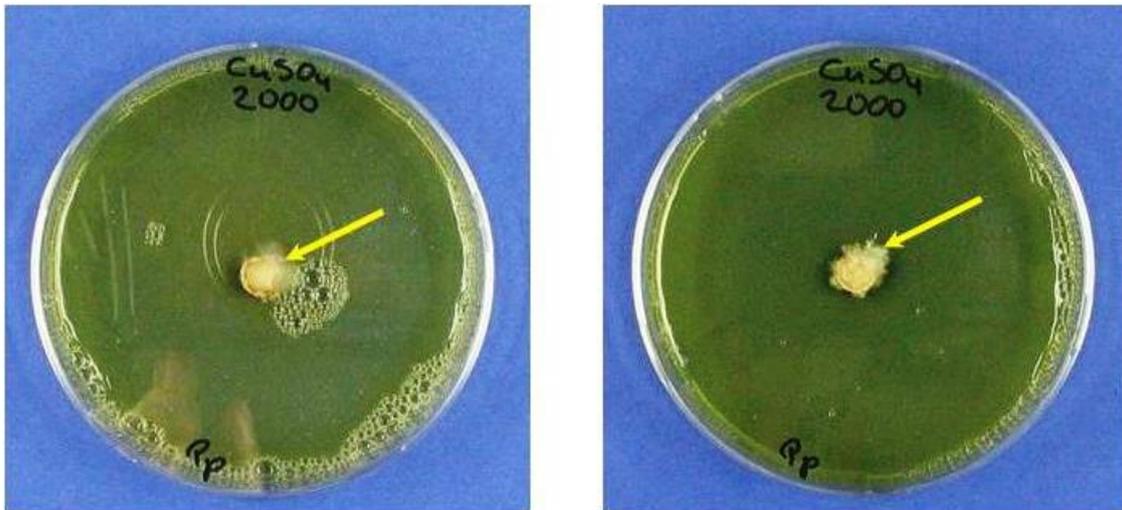
---

<b>Abbildung 32:</b> optische Analytik von CuOx .....	69
<b>Abbildung 33:</b> lichtmikroskopische Aufnahme: CuOx-Ausfällungen (schwarze Pfeile) in MEA modifiziert mit 1000 ppm/Cu und Hyphengeflecht von Pp (blauer Pfeil) .....	70

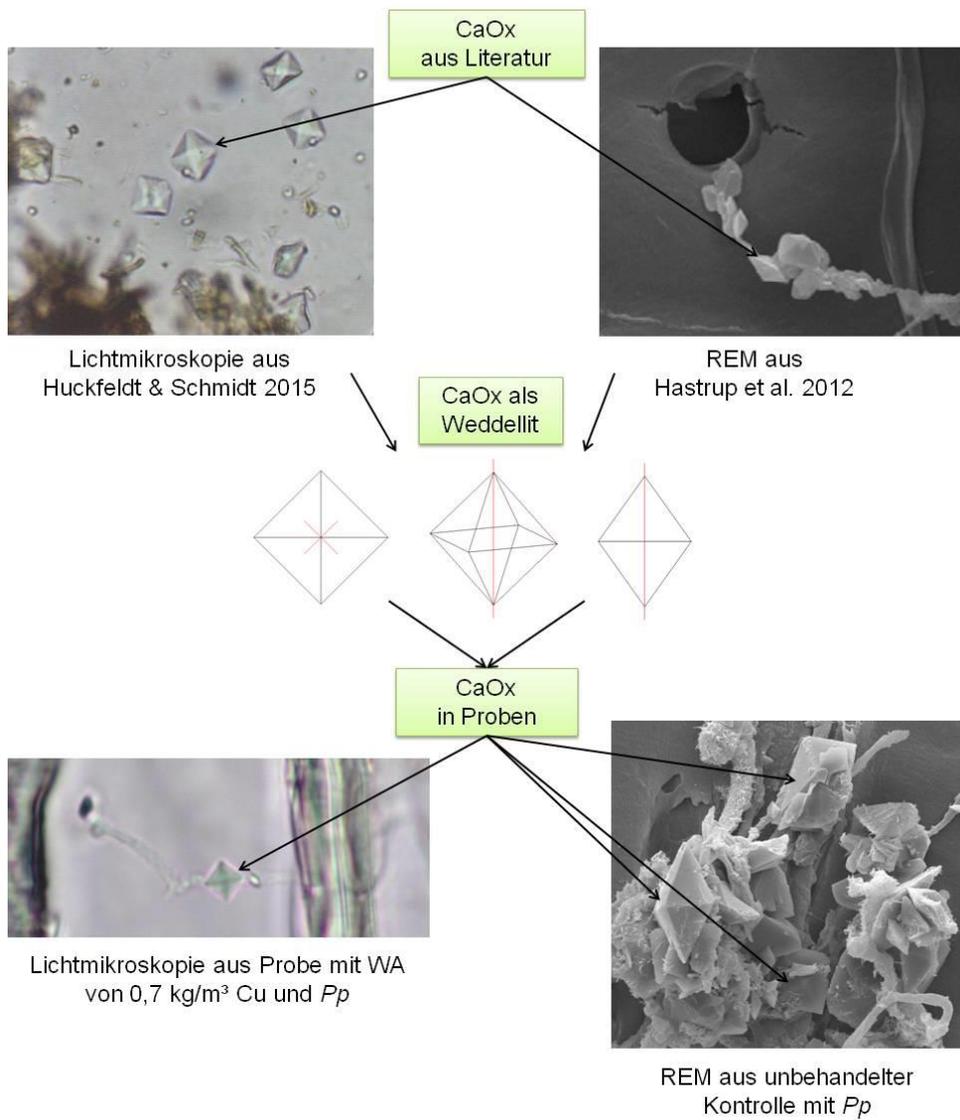
## A2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Abweichungen der Extremwerte der Rohdichte in Bezug auf den Mittelwert .....	20
<b>Tabelle 2:</b> Anzahl der Holzproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupfersulfat in den Tränklösungen (in Gewichtsprozent) und Kontrollen .....	21
<b>Tabelle 3:</b> Überblick des Mycelalters in den beiden VRs .....	22
<b>Tabelle 4:</b> statistische Angaben über die Wirkstoffaufnahmen (Cu) der Proben .....	25
<b>Tabelle 5:</b> MHK-Werte und Bewertung der Mycelausdehnung .....	31
<b>Tabelle 6:</b> Punktmessungen mit nachgewiesenen Elementen (Oberfläche mit einer WA von 0,7 kg/m <sup>3</sup> Cu) .....	44
<b>Tabelle 7:</b> Zusammenfassung der Sichtung von Kristallen unter dem Lichtmikroskop .....	51
<b>Tabelle 8:</b> Protokoll zur Berechnung der Konzentration der Tränklösungen (c <sub>TL</sub> ) .....	70
<b>Tabelle 9:</b> Protokoll zur Berechnung der Lösungsaufnahmen pro Volumeneinheit und der Wirkstoffaufnahmen der behandelten Proben .....	71

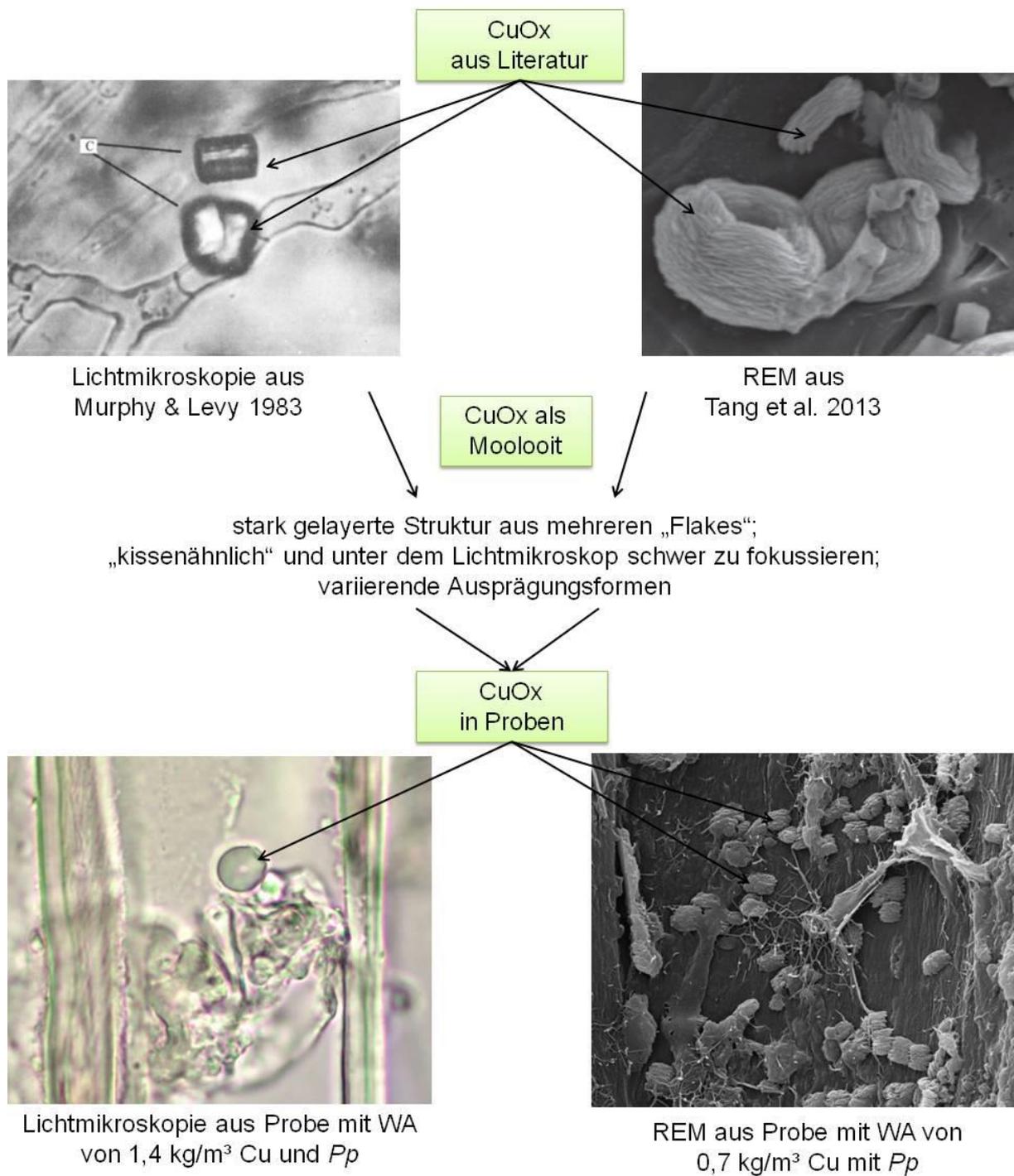
A3 Anlagen



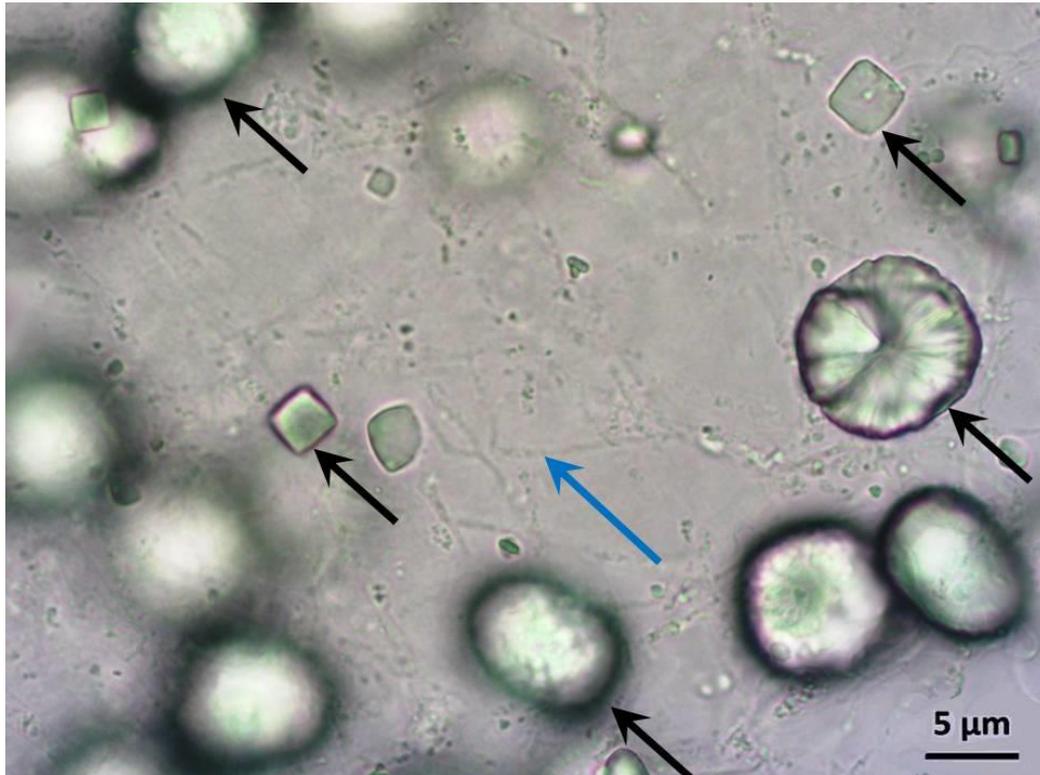
**Abbildung 30:** Mycelausschlag (gelbe Pfeile) in den Petrischalen bei 2000 ppm/Cu VR 1 links und VR 2 rechts



**Abbildung 31:** optische Analytik von CaOx



**Abbildung 32:** optische Analytik von CuOx



**Abbildung 33:** lichtmikroskopische Aufnahme: CuOx-Ausfällungen (schwarze Pfeile) in MEA modifiziert mit 1000 ppm/Cu und Hyphengeflecht von Pp (blauer Pfeil)

**Tabelle 8:** Protokoll zur Berechnung der Konzentration der Tränklösungen ( $c_{TL}$ )

Schutzmittel:	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	
Wirkstoffgehalt (Cu) im Konzentrat [%]:	7,5	
Löse-/Verdünnungsmittel:	dem. H <sub>2</sub> O	
Soll Konzentrationen $c_{TL}$ [%]:	1,25	2,50
Benötigte Menge Lösung [g]:	700	650
Soll Einwaage Konzentrat [g]:	8,75	16,25
Ist Einwaage Konzentrat [g]:	8,75	16,25
Ist Einwaage Lösung [g]:	700,00	650,00
Ist Konzentrationen $c_{TL}$ [%]:	1,25	2,50

**Tabelle 9:** Protokoll zur Berechnung der Lösungsaufnahmen pro Volumeneinheit und der Wirkstoffaufnahmen der behandelten Proben

Schutzmittel	Wirkstoff- gehalt [%]	Konzentration Tränklösung [Gew.-%]	Proben- volumen [cm <sup>3</sup> ]	Proben Nr.	Klima- gewicht [g]	Rohdichte [kg/m <sup>3</sup> ]	Tränk- gewicht [g]	Aufnahme Lösung [g]	Aufnahme Lösung [kg/m <sup>3</sup> ]	Aufnahme Wirkstoff [kg/m <sup>3</sup> ]
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	113	1,805	602	3,867	2,062	687	0,64
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	114	1,668	556	3,904	2,236	745	0,70
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	115	1,456	485	3,781	2,325	775	0,73
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	116	1,661	554	3,820	2,159	720	0,67
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	117	1,806	602	3,916	2,110	703	0,66
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	118	1,519	506	3,786	2,267	756	0,71
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	119	2,134	711	4,245	2,111	704	0,66
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	120	2,223	741	3,973	1,750	583	0,55
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	121	1,520	507	3,838	2,318	773	0,72
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	122	1,701	567	3,843	2,142	714	0,67
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	123	1,620	540	3,865	2,245	748	0,70
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	124	1,743	581	3,808	2,065	688	0,65
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	125	1,558	519	3,838	2,280	760	0,71
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	126	1,652	551	3,860	2,208	736	0,69
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	3,00	127	1,932	644	3,858	1,926	642	0,60
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	13	8,593	458	22,619	14,026	748	0,70
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	14	10,791	576	23,414	12,623	673	0,63
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	15	10,437	557	23,526	13,089	698	0,65
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	16	9,340	498	22,981	13,641	728	0,68
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	17	11,517	614	23,731	12,214	651	0,61
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	18	10,075	537	23,128	13,053	696	0,65
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	19	10,664	595	23,606	12,942	690	0,65

Schutzmittel	Wirkstoff- gehalt [%]	Konzentration Tränklösung [Gew.-%]	Proben- volumen [cm <sup>3</sup> ]	Proben Nr.	Klima- gewicht [g]	Rohdichte [kg/m <sup>3</sup> ]	Tränk- gewicht [g]	Aufnahme Lösung [g]	Aufnahme Lösung [kg/m <sup>3</sup> ]	Aufnahme Wirkstoff [kg/m <sup>3</sup> ]
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	20	10,593	565	23,228	12,635	674	0,63
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	21	10,433	556	23,291	12,858	686	0,64
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	22	8,610	459	22,719	14,109	752	0,71
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	23	9,171	489	23,143	13,972	745	0,70
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	24	8,636	461	22,639	14,003	747	0,70
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	25	9,630	514	23,022	13,392	714	0,67
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	26	10,230	546	22,912	12,682	676	0,63
CuSO4*5H2O	7,5	1,25	18,75	27	11,087	591	23,615	12,528	668	0,63
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	128	1,866	622	4,013	2,147	716	1,34
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	129	1,593	531	3,864	2,271	757	1,42
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	130	1,559	520	3,855	2,296	765	1,44
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	131	1,741	580	3,881	2,140	713	1,34
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	132	1,574	525	3,864	2,290	763	1,43
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	133	1,572	524	3,791	2,219	740	1,39
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	134	1,632	544	3,854	2,222	741	1,39
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	135	1,704	568	3,840	2,136	712	1,34
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	136	1,526	509	3,437	1,911	637	1,19
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	137	1,857	619	3,850	1,993	664	1,25
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	138	1,416	472	3,813	2,397	799	1,50
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	139	1,761	587	3,904	2,143	714	1,34
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	140	1,506	502	3,775	2,269	756	1,42
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	141	1,670	557	3,860	2,190	730	1,37
CuSO4*5H2O	7,5	2,50	3,00	142	1,704	568	4,078	2,374	791	1,48

Schutzmittel	Wirkstoff- gehalt [%]	Konzentration Tränklösung. [Gew.-%]	Proben- volumen [cm <sup>3</sup> ]	Proben Nr.	Klima- gewicht [g]	Rohdichte [kg/m <sup>3</sup> ]	Tränk- gewicht [g]	Aufnahme Lösung [g]	Aufnahme Lösung [kg/m <sup>3</sup> ]	Aufnahme Wirkstoff [kg/m <sup>3</sup> ]
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	28	9,445	504	22,918	13,473	719	1,35
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	29	10,713	571	23,614	12,901	688	1,29
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	30	9,106	486	23,122	14,016	748	1,40
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	31	8,275	441	22,580	14,305	763	1,43
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	32	10,154	542	23,435	13,281	708	1,33
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	33	9,842	525	23,309	13,467	718	1,35
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	34	8,743	466	22,809	14,066	750	1,41
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	35	10,041	536	23,177	13,136	701	1,31
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	36	11,358	606	24,188	12,830	684	1,28
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	37	11,588	618	24,609	13,021	694	1,30
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	38	8,575	457	22,912	14,337	765	1,43
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	39	11,167	596	24,575	13,408	715	1,34
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	40	8,717	465	23,490	14,773	788	1,48
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	41	8,585	458	23,118	14,533	775	1,45
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7,5	2,50	18,75	42	11,175	596	23,783	12,608	672	1,26

# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Eberswalde, den 23. April 2015

Claudia Lenz