

Topochemische und feinstrukturelle Analysen
des mikrobiellen und chemischen Zellwandabbaus
zur Charakterisierung der Holzeigenschaften
wichtiger Wirtschaftsbaumarten

Dissertation

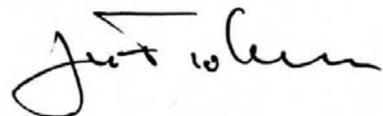
Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mathias Rehbein
aus Hamburg

Hamburg, Dezember 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. G. KOCH
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. U. RICHTER
Tag der Disputation: 13. Oktober 2011

Hamburg, den 30. September 2011



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Fachbereich Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Zentrum Holzwirtschaft der Universität Hamburg, in Verbindung mit dem Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB) des Johann Heinrich von Thünen-Institutes (vTI), Hamburg.

Ohne die Unterstützung durch meine Familie, Freunde und Kollegen hätte diese Arbeit nicht realisiert werden können. Speziell bedanken möchte ich mich bei folgenden Personen:

Mein besonderer Dank gilt **PD Dr. Gerald Koch** für die vorbildliche und über das Fachliche hinausgehende Betreuung dieser Arbeit. Unsere konstruktiven Gespräche und die gemeinsamen Projekte haben mein Wissen auf dem Gebiet der Holzstruktur und -qualität fachübergreifend erweitert.

Mein spezieller Dank gilt Herrn **Dr. Tobias Huckfeldt** für die vielen gemeinsamen und lehrreichen Stunden im Zuge mikrobiologischer Untersuchungen, die erfolgreiche Zusammenarbeit und das allzeit freundschaftliche Arbeitsklima.

Ich danke **Dr. Uwe Schmitt** und **Dr. Eckhard Melcher** für ihre Hilfsbereitschaft und für anregende Diskussionen hinsichtlich holzanatomischer und chemischer Fragestellungen. **Prof. em. Dr. Dr. h.c. mult. Walter Liese** danke ich für das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit, die Bereitstellung von Fachliteratur und die stete Bereitschaft eigenes Wissen weiterzugeben.

Mein besonderer Dank geht an meine lieben Kolleginnen **Marie-Therese Lenz**, **Karin Brandt** und **Tanja Potsch**, die meine Arbeit stets mit viel Engagement und Tatendrang unterstützt haben. Ihre freundliche Art und die schöne Zeit, die wir zusammen verbringen durften, werden mir in Erinnerung bleiben.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich **Dr. Othar Kordsachia** sowie der Arbeitsgruppe von Herrn **Dr. Jürgen Puls**, insbesondere Frau **Anna Knöpfle** aus dem Team Holzchemie des Institutes für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB).

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die zahlreichen konstruktiven Gespräche im Laboralltag, die große Hilfsbereitschaft und die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Der Tischlerei, speziell Frau **Stefanie Warsaw**, danke ich für die Bereitstellung der benötigten Holzbearbeitungsmaschinen.

Meiner Familie gilt mein besonderer Dank, ohne ihren Rückhalt und das entgegengebrachte Verständnis wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen	III
Zusammenfassung.....	IV
Liste der Publikationen	V
1 Einleitung.....	1
2 Wissensstand	3
2.1 Beurteilung der Eigenschaften neu eingeführter Holzarten	3
2.2 Natürliche Dauerhaftigkeit des Holzes	5
2.3 Holzabbau durch Pilze	6
2.4 Holzabbau durch Bakterien.....	11
2.5 Spezielle Untersuchungen zur Topochemie des Holzabbaus.....	15
3 Material.....	16
4 Methoden	17
4.1 Einbettung des Probenmaterials für die mikroskopischen Untersuchungen	18
4.2 Lichtmikroskopie	18
4.3 Universal Mikrospektralphotometrie (UMSP 80 / MSP 800).....	19
4.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	20
5 Zusammenfassung der Ergebnisse	21
5.1 Beurteilung der Holzeigenschaften neu eingeführter Wirtschaftsbaumarten für den konstruktiven Außenbau (Publikationen I, V, VI und X)	21
5.2 Topochemische Untersuchungen zum Holzabbau durch den Braunfäulepilz <i>Antrodia vaillantii</i> (Publikation III).....	26
5.3 Topochemische und feinstrukturelle Untersuchungen zum Zellwandabbau durch Bakterien (Publikationen IV und VIII)	31
5.4 Topochemische Untersuchungen zum Vergleich des mikrobiellen und chemischen Zellwandabbaus (Publikation II).....	40
6 Schlussfolgerungen	44
7 Literaturverzeichnis	45
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	55
9 Publikationen.....	57
9.1 Liste der zusammenfassend dargestellten Publikationen (s. Kap. Ergebnisse).....	57
9.2 Erläuterungen zu den eigenen Anteilen an den vorgelegten Arbeiten.....	58

Abkürzungen

ASR = Accelerated Solvent Extraction

CIE L*a*b* = Commission Internationale de l'Éclairage, mit den Farbkoordinaten L*a*b*

DHK = Dauerhaftigkeitsklasse entsprechend DIN EN 350-1/2:1994

FESEM = Feldemissions-Raster-Elektronenmikroskop

GK = Gebrauchsklasse entsprechend DIN EN 335-2:2006

ICP-OES = Optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma

ML = Mittellamelle

MSP = Mikrospektralphotometrie

NSSC = Neutral Sulfit Semi-Chemical Verfahren

PW = Primärwand

REM = Raster-Elektronenmikroskop

RP-HPLC = Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

S1 = Sekundärwand 1

S2 = Sekundärwand 2

S3 = Sekundärwand 3

spp. = Species pluralis

TEM = Transmissions-Elektronenmikroskop

u = Holzfeuchte in Prozent, bezogen auf das Darrgewicht entsprechend DIN 52183:1977

UMSP = Universalmikrospektralphotometrie

Zz = Zellzwickel

Zusammenfassung

Im Rahmen der interdisziplinären Forschungsarbeit wurde der mikrobielle Zellwandabbau durch den Braunfäulepilz *Antrodia vaillantii* und durch *Erosion*-Bakterien topochemisch und feinstrukturell untersucht. Schwerpunktmäßig wurden dabei die Frühstadien des mikrobiellen Holzabbaus auf subzellulärer Ebene analysiert, für die bisher noch keine grundlegenden Ergebnisse vorliegen.

Die topochemischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe der speziellen UMSP-Methode, deren hochauflösendes, UV-spektroskopisches Scanning-Verfahren (Ortsauflösung von 0,25 µm x 0,25 µm) sich besonders für die bildgebende Charakterisierung chemischer Veränderungen innerhalb der einzelnen Zellwandschichten eignet. Ergänzende UV-spektroskopische Punktmessungen mit einer Ortsauflösung von 1 µm² ermöglichten eine chemische Analyse abgebauter Zellwandbereiche und deren Abbauprodukte. Zur detaillierten Beschreibung der mikrobiellen Besiedlungsabfolge auf Gewebe- und Zellwandniveau wurden die Untersuchungen mit elektronenmikroskopischen Methoden (TEM und FESEM) kombiniert.

Die UV-spektroskopischen Analysen zeigen, dass bereits nach drei Tagen Inkubation eine Ligninmodifikation durch die Aktivität des Braunfäuleerregers *Antrodia vaillantii* topochemisch nachgewiesen werden kann. Infolge des mikrobiellen Zellwandabbaus konnten hoch absorbierende Ligninderivate im Bereich der äußeren S2 und der S1 der Tracheiden detektiert werden, die eine eindeutige Selektivität und frühzeitige Ligninmodifikation im Anfangsstadium des Zellwandabbaus bestätigen.

Die topochemischen Analysen des bakteriellen Holzabbaus zeigen im Frühstadium initiale Veränderungen der UV-Absorptionswerte im Bereich der Tüpfelkanäle, ohne das morphologische Strukturabweichungen elektronenmikroskopisch in diesem Stadium nachweisbar sind. Eine chemische Charakterisierung befallener Bereiche der Sekundärwand erfolgte durch ergänzende UV-spektroskopische Punktmessungen im Wellenlängenbereich von 240-400 nm. Die Auswertung der UV-Spektren bestätigt, dass die bakteriellen Abbauprodukte aus biochemisch modifizierten und unmodifizierten Ligninen bestehen, die durch höhere UV-Absorptionswerte charakterisiert werden.

Vergleichende UV-spektroskopische Untersuchungen zu einem chemischen Holzaufschluss (NSSC) zeigen Parallelen zur beschriebenen mikrobiellen Lignin-Modifikation durch *A. vaillantii* auf. Beide Prozesse sind durch eine frühzeitige und selektive Ligninmodifikation innerhalb individueller Zellwandschichten charakterisiert. Die vorliegenden Ergebnisse der topochemischen Analysen liefern einen wichtigen Beitrag zur Beschreibung frühzeitiger sukzessiver Abbauprozesse auf zellulärer Ebene.

Zur Charakterisierung eines fortgeschrittenen Zellwandabbaus erfolgten zusätzlich anatomische, strukturelle und feinstrukturelle Untersuchungen an archäologischem Holz (Sarg der Moorleiche „Frau von Peiting“). Die angewendeten Untersuchungen zeigen, dass der in seiner Intensität variierende Zellwandabbau, insbesondere durch *Erosion*-Bakterien verursacht wurde. Der insgesamt verhältnismäßig gute Erhaltungszustand des Sarges muss auf die spezifischen Lagerungsbedingungen (saurer Bodenmilieu unter Sauerstoffarmut) zurückgeführt werden.

Im Rahmen weiterführender praktischer Untersuchungen wurden zudem die natürliche Dauerhaftigkeit und Eigenschaften neu eingeführter Handelshölzer (Bintangor, *Calophyllum* spp.; Kasai, *Pometia pinnat*; Durian, *Durio* spp.; Merpauh, *Swintonia* spp. und Massaranduba, *Manilkara bidentata*) sowie speziell die natürliche Dauerhaftigkeit der Sibirischen Lärche untersucht. Die Ergebnisse der standardmäßigen Normprüfungen und zusätzlichen chemischen Analysen sind eine wichtige Voraussetzung für die Zulassung der neuen Handelssortimente.

Liste der Publikationen

Publikationen in Zeitschriften mit Reviewsystem

- I** Koch, G., **Rehbein, M.** (2009) Hölzer für den Fensterbau – Kennwerte und Eigenschaften neu eingeführter Hölzer. Holztechnologie 6:5-9
- II** **Rehbein, M.**, Pereira, M., Koch, G., Kordsachia, O. (2010) Topochemical investigation into the delignification of *Eucalyptus globulus* chips during semi-chemical sulfite pulping. Wood Sci Technol 44:435-449
- III** **Rehbein, M.**, Koch, G. (2011) Topochemical investigation of early stages of lignin modification within individual cell wall layers of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sapwood infected by the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv. Intern Biodet Biodeg 65:913-920
- IV** **Rehbein, M.**, Koch, G., Schmitt, U., Huckfeldt, T. () Topochemical and transmission electron microscopic studies of bacterial decay in pine (*Pinus sylvestris* L.) harbour foundation piles. Intern Biodet Biodeg, submitted 04.2011

Publikationen in nationalen Zeitschriften

- V** Koch, G., **Rehbein, M.**, Lenz, M. T. (2007) Natürliche Dauerhaftigkeit Sibirischer Lärche. Untersuchung mehrerer Herkunftsgebiete - Inhaltstoffe ursächlich für unterschiedliche Dauerhaftigkeit. Holz-Zentralblatt 22:593-594
- VI** **Rehbein, M.**, Koch, G. (2007) Eignung von Massaranduba für die Außenverwendung. Uneingeschränkt einsetzbar für den Einsatz im konstruktiven Außenverbau in den Gebrauchsklassen 1 bis 4. Holz-Zentralblatt 28:784-785
- VII** **Rehbein, M.** (2008) Terrassendielen – neue Hölzer und andere Alternativen. Holz-Zentralblatt 16:442-443
- VIII** **Rehbein, M.**, Koch, G., Klein, P. (2009) Moorleiche „Frau von Peiting“. Holzbiologische Befunde vom Sarg. Restaura 5:320-325
- IX** **Rehbein, M.** (2010): Terrassenbeläge und die neue Holzschutznorm. Holz-Zentralblatt 12:313-314
- X** **Rehbein, M.**, Koch, G. (2010) Wie dauerhaft ist Sibirische Lärche? Wissenschaftliche Untersuchungen am vTI in Hamburg bestätigen praktische Erfahrungen. Holz-Zentralblatt 34:847-848

Proceedings

- XI** **Rehbein, M.**, Koch, G. (2010) Topochemical investigation within individual cell wall layers of brown-rotted scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sapwood, degraded by the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii*. COST, FP0802, 57

Buchbeiträge

- XII** **Rehbein, M.** (2009) Grundlagen des Quell- und Schwindverhaltens hölzerner Bauteile. In: Huckfeldt, T., Wenk, H-J. (Hrsg.). Holzfenster: Konstruktion, Schäden, Sanierung, Wartung. Rudolf Müller Verlag
- XIII** **Rehbein, M.**, Koch, G., Klein, P. (2009) Holzbiologische Befunde vom Sarg der „Frau von Peiting“. Bayerische Vorgeschichtsblätter. Verlag C. H. Beck, 74:269-278
- XIV** Koch, G., **Rehbein, M.**, Pitt, W. (Hrsg.) (2010) 33 Farbtafeln Parkett: Nadel-, Laub-, Exotenhölzer vor und nach UV-Einstrahlung. Holzmann Verlag
- XV** Huckfeldt, T., **Rehbein, M.** (2011) Biotische Schäden an Holz- und Fachwerkfassaden. In: Venzmer H. (Hrsg.). Fassadensanierung: Praxisbeispiele - Produkteigenschaften – Schutzfunktionen. Beuth Verlag
- XVI** **Rehbein, M.** (2011) Grundlagen des Quell- und Schwindverhaltens hölzerner Bauteile. In: Huckfeldt T., Wenk H-J. (Hrsg.). Holzfenster: Konstruktion, Schäden, Sanierung, Wartung. Korr. Nachdruck. Rudolf Müller Verlag
- XVII** **Rehbein, M.** (2011) Natürliche und durch den Menschen bedingte Veränderungen der Materialeigenschaften an Spielgeräten. In Huckfeldt, T., Rehbein, M. (Hrsg.). Holzspielplätze: Planung, Konstruktion, Schäden, Instandhaltung. Beuth Verlag
- XVIII** **Rehbein, M.**, Koch, G., Melcher, E. (2011) Verwendungsrelevante Kennwerte der Sibirischen Lärche für Normung und Praxis. In: Johann Heinrich von Thünen-Institut, Jahresbericht 2010

Bücher als Herausgeber

- XIX** Huckfeldt, T., **Rehbein, M.** (Hrsg.) (2011) Holzspielplätze: Planung, Konstruktion, Schäden, Instandhaltung. Beuth Verlag

1 Einleitung

Der Rohstoff Holz unterliegt einem Lebenszyklus, der durch Wachstum und Zersetzung geprägt ist. Die Zersetzung, d.h. der biotische Abbau des Holzes, ist zum einen ein wesentlicher Bestandteil im natürlichen Stoffkreislauf, zum anderen ein bedeutender wirtschaftlicher Faktor. Holzkonstruktionen, die langfristig eine Holzfeuchte von $u > 18\%$ aufweisen, unterliegen einem erhöhten biotischen Befallsdruck. Gefährdet sind insbesondere Konstruktionen in den Gebrauchsklassen 3 und 4 nach DIN EN 335-2:2006, wie Holzfenster und -fassaden oder Hölzer im Garten- und Landschaftsbau wie z.B. Terrassendielen oder Pfosten mit Erdkontakt. Derart exponierte Hölzer können Algen, Flechten, Moosen, Pilzen und Insekten als Lebensraum dienen (Freystein und Reisser, 2011; Huckfeldt und Rehbein, 2011; Noldt, 2005). Nur wenige dieser Organismen sind in der Lage, lignifizierte Zellwände als Substrat für ihren Metabolismus zu nutzen. Zu diesen Spezialisten zählen einige Pilze, Bakterien und Insekten (u.a. Huckfeldt und Schmidt, 2006). Entsprechen Holzart, Holzfeuchte und die Umgebungstemperatur den Ansprüchen dieser Organismen, hat ihre Gegenwart einen entscheidenden Einfluss auf die Gebrauchsdauer der Holzbauteile. Verschiedene Ansätze, vom Einbringen chemischer Schutzmittel über die thermische und chemische Modifikation bis zu rein konstruktiven bzw. baulichen Schutzmaßnahmen sind geeignet, die Gebrauchsdauer von Holz in Abhängigkeit von der Beanspruchung zu erhöhen. Sind derartige Maßnahmen nicht gewünscht oder nicht möglich, kann die Gebrauchsdauer durch den Einsatz natürlich dauerhafter Hölzer verlängert werden. Die natürliche Dauerhaftigkeit, d.h. die Widerstandsfähigkeit des Holzes gegen einen biotischen Abbau, variiert in direkter Abhängigkeit von der Art und Zusammensetzung holzeigener chemischer Verbindungen in der Zellwand. Die Anzahl der nachweisbaren und identifizierten Inhaltsstoffe unterscheidet sich dabei zwischen den Holzarten. In einem Holzextrakt können mehr als hundert Substanzen detektiert werden (Faix, 2002). Nach Hillis (1971) kann der Extraktstoffgehalt, in Abhängigkeit von der Holzart, bis zu 20%, in seltenen Fällen bis zu 40% von der Einwaage betragen. Die Synthese der Inhaltsstoffe erfolgt in der Regel im Verlauf der obligatorischen, d.h. genetisch fixierten Kernholzbildung. Zu den die natürliche Dauerhaftigkeit einer Holzart beeinflussenden Verbindungen zählen vor allem Chinone (Tectochinon, *Tectona grandis*), Stilbene (Pinosylvin, *Pinus* spp.), Tropolone (Thujaplicin, *Thuja plicata*) und Flavonoide (Taxifolin, *Pseudotsuga menziesii*; Quercitin, *Quercus* spp.) (Willeitner und Peek, 1997; Haupt et al., 2003; Faix, 2002). Aufgrund dieser großen Bandbreite der einzelnen Extraktstoffe und möglicher Synergieeffekte lässt sich der individuelle Einfluss einzelner Verbindungen nur schwer quantifizieren. Grundsätzlich ist das Splintholz aller Holzarten aus Mangel an bioziden Inhaltsstoffen – auch der Holzarten mit sehr dauerhaftem Kernholz – wenig bis nicht dauerhaft (Eslyn und Highley, 1976).

Die hohe Variabilität der natürlichen Dauerhaftigkeit der weltweit gehandelten Holzarten, begründet die Notwendigkeit einer Klassifizierung der Kernhölzer entsprechend ihres Resistenzverhaltens gegenüber holzabbauenden Organismen. Eine Auflistung etablierter Holzarten entsprechend ihrer natürlichen Dauerhaftigkeit gibt DIN EN 350-2:1994. Ein genereller Zusammenhang zwischen der Farbausprägung oder der Dichte und der natürlichen Dauerhaftigkeit einer Holzart besteht nicht (Scheffer und Morrell, 1998). Für

neu eingeführte bzw. auf dem deutschen Markt selten gehandelte Holzarten liegen in der Regel keine bzw. weniger verlässliche Daten über die individuellen Holzeigenschaften insbesondere die natürliche Dauerhaftigkeit vor. Die Notwendigkeit der Eigenschaftsermittlung wird offensichtlich, wenn die gewählte Holzart den Anforderungen nach der Verarbeitung nicht entspricht. Der Mangel an Hintergrundinformationen führt dann häufig zu Reklamationen oder im schlimmsten Fall zum Versagen von Bauteilen. Die frühzeitige Ermittlung der relevanten Kennwerte, insbesondere der Resistenz gegenüber holzabbauenden Pilzen, kann derartige Probleme verhindern.

Die für den Holzabbau verantwortlichen Organismen, insbesondere die holzersetzenen Pilze und Bakterien, stehen seit langem im Fokus der Forschung. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, kombiniert mit chemischen Analysen ermöglichen ein generelles Verständnis des mikrobiellen Zellwandabbaus. Ergänzende physikalische Untersuchungen erweitern das Wissen über Festigkeitsverluste abgebauter Hölzer. Der zum Teil hohe Verlust der Festigkeiten zu Beginn des Holzabbaus durch Braunfäulepilze verdeutlicht die potentielle Gefahr, die von befallenen insbesondere tragenden Bauteilen ausgeht (Bariska et al., 1983).

Der aktuelle Stand des Wissens über die Vorgänge beim enzymatischen Ligninabbau durch Weißfäulepilze und der Ligninmodifikation durch Braunfäulepilze und Bakterien zeigt noch ungeklärte Fragestellungen. In Bezug auf den Zellwandabbau durch Weißfäulepilze sind die grundsätzlichen biochemischen Abläufe bekannt und die für den Ligninabbau verantwortlichen Enzyme sowie ihre Wirkungsweise erforscht (u.a. Goodell, 2003). Im direkten Vergleich ist der Kenntnisstand über den Holzabbau durch Braunfäulepilze und Bakterien (insbesondere der Frühstadien) weniger umfassend. Im Detail sind die relevanten biochemischen Prozesse der Ligninmodifikation noch nicht vollständig verstanden. Insbesondere das Wissen um die frühen Abbaustadien des Holzes, d.h. erste Veränderungen des Lignin-Grundgerüsts der individuellen Zellwandschichten, ist begrenzt. Strukturelle (morphologische) Veränderungen der Gewebe können unter Anwendung der Lichtmikroskopie und ultrastrukturelle Veränderungen durch die Elektronenmikroskopie dargestellt werden. Die Modifikation der lignocelluloseischen Komponenten innerhalb der individuellen Zellwandschichten kann dagegen durch die genannten Methoden nur unzureichend, z.B. durch eine selektive Färbung der Zellwand, dargestellt werden. Als spezielle Methode hat sich hierfür die hochauflösende zelluläre UV-Spektroskopie erwiesen, deren bildgebendes Verfahren eine topochemische Differenzierung der Zellwandmodifikation auf dem Niveau individueller Zellwandschichten ermöglicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten strukturelle, ultrastrukturelle sowie zelluläre UV-spektroskopische Untersuchungen an durch Pilze und Bakterien abgebauten Hölzern. Der Schwerpunkt lag dabei auf der topochemischen Charakterisierung sukzessiver Veränderungen individueller Zellwandschichten, insbesondere in den frühen Stadien des Zellwandabbaus bzw. der Ligninmodifikation. Um feinstrukturelle Veränderungen innerhalb der Zellwand hochauflösend darzustellen, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Methoden kombiniert (Rehbein et al., 2010; Rehbein und Koch, 2011; Rehbein et al., submitted 2011).

2 Wissensstand

2.1 Beurteilung der Eigenschaften neu eingeführter Holzarten

Holz ist ein Rohstoff mit langer Tradition (Trendelenburg und Mayer-Wegelin, 1955). Auf dem deutschen Holzmarkt werden einheimische bzw. europäische Holzarten sowie Importhölzer, z.B. aus Südostasien, Südamerika, Afrika, Australien, Kanada und Sibirien, angeboten. Die Gründe für den Holzimport sind vielfältiger Natur und basieren zum Teil auf den individuellen Holzeigenschaften, wie einer guten bis sehr guten natürlichen Dauerhaftigkeit oder einer besonderen bzw. stark nachgefragten Farbgebung der Importhölzer.

Dem Holzhandel stehen aktuell Veränderungen bevor. Etablierte Importholzarten wie z.B. Rote-Meranti-Hölzer (*Shorea* spp., subg. *Rubroshorea*) oder Bangkirai (*Shorea* spp., subg. *Shorea*) aus der Familie der Dipterocarpaceae, stehen nicht mehr in den gewünschten Mengen und Qualitäten zur Verfügung. Die intensive und langjährige Holzeinfuhr, in Kombination mit einer nicht nachhaltig betriebenen Bewirtschaftung der Wälder, führt zu einer Übernutzung der vorhandenen Ressourcen. Die wachsende Nachfrage nach FSC (Forest Stewardship Council) oder PEFC (Programme for the Endorsement of Forest Certification Schemes) zertifizierten Holzarten aus nachhaltig bewirtschafteten Wäldern zeigt ein Umdenken in der Bevölkerung. Dennoch bewirkt der stetig ansteigende Importholzbedarf, z.B. für den Garten- und Landschaftsbau, weiterhin eine Verknappung einzelner Wirtschaftsbaumarten. Etablierte, aus Südostasien und Afrika stammende Hölzer (z.B. Bangkirai (*Shorea* spp., Sektion *Shorea*), Bilinga (*Nauclea diderrichii*), Gerutu (*Parashorea* spp.) und Iroko (*Milicia excelsa*)) können praktisch nicht mit den anerkannten Zertifikaten (z.B. FSC) erworben werden. Insbesondere lokale Herkunfts- und Nachhaltigkeitszertifikate für Bangkirai sind zunehmend fragwürdig geworden, da die Hölzer zum Teil aus illegalem Einschlag stammen (Dieter, 2009). Zusätzlich wird im Rahmen des internationalen Artenschutzes CITES = „Convention on International Trade in Endangered Species“ der Handel mit geschützten Baumarten wie z.B. Afrormosia (*Pericopsis elata*) oder Echtes Mahagoni (*Swietenia* spp.) eingeschränkt bzw. verboten.

Die anhaltende Importholz-Nachfrage hat in den letzten Jahren zur Einfuhr relativ unbekannter, vor allem aus Südamerika stammender Arten geführt. Für die z.T. FSC-zertifizierten Hölzer, wie z.B. Garapa (*Apuleia leiocarpa*) und Massaranduba (*Manilkara bidentata*), lagen i.d.R. nur wenige Informationen über deren individuelle Holzeigenschaften vor, so dass diese im Einzelfall geprüft werden mussten (Rehbein und Koch, 2007; Weber und Koch, 2007). Eine weitere Folge der verminderten Verfügbarkeit traditioneller Importholzarten ist neben einem starken Preisanstieg die Abnahme der Holzqualität. Dies zeigt sich besonders am Beispiel der lamellierten Fensterkanteln. Die angebotenen schichtverleimten Meranti-Kanteln der Qualität Dark Red Meranti (*Shorea* spp., Sektion *Rubroshorea*) erreichen häufig nicht die vorgegebenen bzw. erwarteten Rohdichtewerte (Rohdichte > 0,55 g/cm³), entsprechend den Malaysian Grading Rules. Weiterhin ist eine stetig wachsende Anzahl von falsch oder unzureichend deklarierten Mischsortimenten sowie ein vermehrtes Aufkommen von falsch deklarierten schichtverleimten Kanteln, zum Teil aus unterschiedlichen Holzarten, sog. „Mixed tropical

species“, auf dem deutschen Markt zu beobachten (Koch, 2006; Koch und Rehbein, 2009; Abb. 1 und 2).



Abb. 1: Querschnitt einer Fensterkante aus drei unterschiedlichen Holzarten, sog. „mixed tropical species“: Von oben nach unten: *Heritiera* spp., *Shorea* spp., *Terminalia* spp.

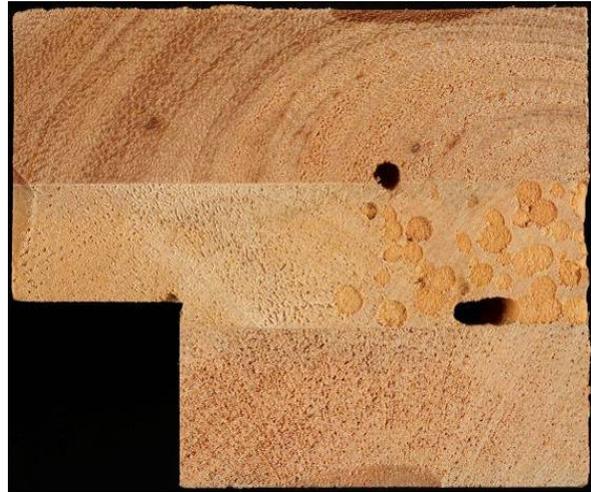


Abb. 2: Fensterkante aus einer nicht dauerhaften Holzart (*Durio* spp.) mit Insektenbefall (*Bostrichidae* spp.) im Bereich der Mittellage.

Probleme können bei schichtverleimten Kanteln insbesondere dann auftreten, wenn es sich bei den verarbeiteten Lamellen um Hölzer handelt, die nicht die verwendungsrelevanten Rohdichtewerte oder Dauerhaftigkeiten aufweisen oder bei denen die Verklebung der Lamellen nicht den erforderlichen Standards entspricht. Weiterhin führen Mischsortimente mit Hölzern unterschiedlicher physikalischer und mechanischer Eigenschaften zu erheblichen Problemen bei der Bearbeitung und Oberflächenbehandlung der Kanteln (Schwab et al., 1997). Von der aktuellen Marktsituation ausgehend, ist auch in den kommenden Jahren weiterhin mit der Einfuhr neuer bzw. falsch deklarerter Hölzer zu rechnen.

Hier muss der Holzhandel gezielt reagieren, denn diese zum Teil minderwertigen Sortimente stellen die gesamte Branche vor die Problematik einer ungewollten Qualitätsminderung, die ohne ein „aktives Gegensteuern“ (z.B. durch permanente Stichprobennahme mit anschließender Holzarten- bzw. Qualitäts-Bestimmung) zu einem schwerwiegenden Imageverlust führen kann (Rehbein, 2007). Um weiterhin die gewohnten Standards und geforderten Holzmen gen anbieten zu können, werden ausgehend von der beschriebenen Marktsituation aktuell noch (relativ) unbekannte Holzarten (lesser known species) sog. „Substitutionshölzer“ gesucht, deren Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten für den Außenbereich im Einzelfall geprüft werden müssen. Eines der wichtigsten Prüfkriterien ist dabei die natürliche Dauerhaftigkeit (DIN EN 350-1:1994) der Hölzer gegen holzabbauende Pilze. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden relevante Holzeigenschaften wie z.B. die natürliche Dauerhaftigkeit neu eingeführter Holzarten normgerecht untersucht (Rehbein und Koch, 2007; Koch et al., 2007; Koch und Rehbein, 2009; Rehbein und Koch, 2010).

2.2 *Natürliche Dauerhaftigkeit des Holzes*

Die natürliche Dauerhaftigkeit, als Widerstandsfähigkeit des Holzes gegenüber der Zersetzung durch holzabbauende Organismen, ist eine verwendungsrelevante Materialeigenschaft. Steht die Gebrauchsdauer des Holzes im Vordergrund, muss der Abbauprozess des Holzes verlangsamt oder im Idealfall unterbrochen werden. Bei vielen Holzprodukten oder –konstruktionen besteht keine oder nur eine zu vernachlässigende Gefährdung eines biotisch bedingten Holzabbaus. Bei feuchteexponierten Konstruktionen kann der Einsatz einer natürlich dauerhaften Holzart den biotischen Abbau verzögern und somit die Nutzungsdauer verlängern. Nicht dauerhafte Holzarten sind demgegenüber anfällig für Schädlingsbefall (Willeitner, 1981). Als natürliche Dauerhaftigkeit einer Holzart wird nach DIN EN 350-1:1994 „die dem Holz eigene Widerstandsfähigkeit gegen einen Angriff durch holzerstörende Organismen“ bezeichnet. Sie variiert deutlich zwischen den verschiedenen Holzarten und schwankt, wie alle Holzeigenschaften, zwischen Wuchsgebieten, von Stamm zu Stamm und selbst innerhalb eines Stammes, ohne das dies äußerlich deutlich wird (Willeitner, 1981; Scheffer und Morrell, 1998).

Der Abbau des Holzes durch Pilze ist seit rund 150 Jahren Gegenstand eingehender wissenschaftlicher Untersuchungen (Liese, 1963). Erste systematische Laborversuche zur Klassifizierung der natürlichen Dauerhaftigkeit des Holzes gegenüber Basidiomyceten gehen auf W. Bavendamm und J. Liese zurück (nach Tackmann et al., 2009). Die Prüfung der natürlichen Dauerhaftigkeit basiert entweder auf langjährigen Versuchen im Freiland, mit und ohne Erdkontakt, oder erfolgt innerhalb verkürzter Zeiträume unter Laborbedingungen. In Europa basiert die Prüfung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz auf der zurzeit geltenden DIN EN 350-1:1994. Es wird zwischen der natürlichen Dauerhaftigkeit gegenüber

- holzabbauenden Pilzen,
- Larven von Trockenholzkäfern,
- Termiten
- und Holzschädlingen im Meerwasser

unterschieden. Die Differenzierung nach Schadorganismen verdeutlicht, dass die Dauerhaftigkeit keine absolute Eigenschaft ist, sondern in Abhängigkeit von der Beanspruchung variieren kann. So sind nach Willeitner und Peek (1997) mehr Holzarten dauerhafter gegen einen Holzabbau durch Pilze als gegen Termiten oder Meerwasserschädlinge.

Zur Ermittlung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz entsprechend DIN EN 350-1:1994 oder DIN CEN/TS 15083-1:2005 werden Kolleschalen oder Rundgefäße mit einem Nährmedium (Malzagar) befüllt und mit Basidiomyceten-Monokulturen beimpft. Die Prüfhölzer (50 mm x 25 mm x 15 mm) werden sterilisiert und anschließend über 16 Wochen dem Pilzangriff bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und $70 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchte ausgesetzt. Im Anschluss wird der Holzabbau durch den Masseverlust der Prüfhölzer quantifiziert, d.h. entweder direkt durch den Masseverlust selbst (DIN CEN/TS 15083-1: 2005) oder durch einen Relativwert (x-Wert) aus dem Masseverlust der Prüfhölzerart und dem Masseverlust der Referenzholzart (DIN EN 350-1:1994). Entsprechend dem Ergebnis wird die geprüfte Holzart einer von fünf Dauerhaftigkeitsklassen zugeordnet; dabei definiert die Dauerhaftigkeitsklasse 1 eine sehr dauerhafte, die Dauerhaftigkeitsklasse 5 eine nicht

dauerhafte Holzart. Die Anwendung normierter Prüfmethode – insbesondere unter Laborbedingungen – zur Klassifizierung der natürlichen Dauerhaftigkeit individueller Holzarten ist nicht unumstritten. Zum einen kann von Laborergebnissen nicht ohne weiteres auf Freilandergebnisse geschlossen werden (Hedley, 1993; Nilsson und Edlund, 1995), zum anderen birgt die Prüfung sowie das Probenkollektiv an sich eine Vielzahl von Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen. Durch die Vereinheitlichung der Prüfung können Einflüsse z.B. durch die Prüfkörpergröße, die Art der Sterilisation, die Virulenz der Prüfpilze oder die Dauer der Prüfung ausgeschlossen bzw. in das System integriert werden. Wichtige Grundlagen, wie die Auswahl der Prüfpilze oder die Anzahl, Herkunft und Entnahmestelle der Prüfhölzer, sind in der jeweiligen Norm definiert, finden aber in der praktischen Anwendung oft ihre Grenzen. Unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren bieten Laborversuche vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse (Da Costa, 1975) in einem vergleichsweise kurzen Zeitrahmen.

2.3 Holzabbau durch Pilze

Der Holzabbau durch Pilze bedarf geeigneter Umgebungsbedingungen. Nahrungsangebot, Feuchtigkeit, Luftsauerstoff und Temperatur müssen vorhanden, die drei letztgenannten aber weder zu hoch noch zu niedrig sein. Dabei variieren die Ansprüche deutlich zwischen den Arten (u.a. Schmidt, 1994; Huckfeldt und Schmidt, 2006; Abb. 3 - 5).



Abb. 3: Holzfenster (*Shorea* spp.) mit massivem Weißfäulebefall (*Phellinus* spp.).



Abb. 4: Durchfeuchtete Außenwand einer Schießbahn, bewachsen mit *Asterostroma cervicolor*.



Abb. 5: Kompostwerk, die Unterkonstruktion eines Biofilters (*Lophira alata*), wurde durch Moderfäulepilze zerstört.

Viele Pilze nutzen den Rohstoff Holz als Lebensraum, d.h. sie sind in der Lage, die Oberfläche zu besiedeln. Einige Pilze wachsen durch das Holzstrahlgewebe und die Tüpfel tiefer in den Holzkörper ein und können - ohne die Fähigkeit lignifizierte Zellwände abzubauen - durch ihre Stoffwechselprodukte bzw. die Eigenfarbe ihrer Hyphen Farbänderungen im Gewebe hervorrufen (Shigo, 1965; Levy, 1967; Schmidt, 1994; Croan, 1997; Tackmann, 2009; Abb. 6 und 7). Diese Pilze, gemeinhin als Schimmel- und Bläuepilze bezeichnet, gehören zu den Asco- bzw. Deuteromyceten und ernähren sich von frei zugänglichen Zuckern und anderen leicht abbaubaren Bestandteilen (Kühne et al., 1970; Liese, 1970a, b; Wolf und Liese, 1977; Schmidt und Wahl, 1987; Zink und Fengel, 1988, 1989; White-McDougall et al., 1998; Huckfeldt und Schmidt, 2006, Kim et al., 2007; Göbelsmann, 2008; Huckfeldt und Rehbein, 2011).



Abb. 6: Lagerschaden: Bläue in Kombination mit Rotstreifigkeit (*Pinus sylvestris*), Maßstab 20 mm.

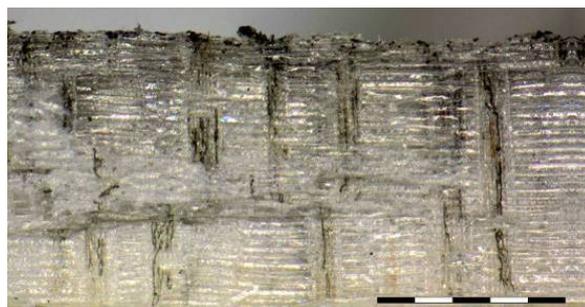


Abb. 7: Mikroskopische Abbildung eines Bläueschadens. Die Hyphen wachsen durch die Holzstrahlen in tiefer liegendes Gewebe ein, Maßstab 1000 µm.

Pilze, die in der Lage sind Bestandteile der lignifizierten Zellwände für ihren Metabolismus zu nutzen, können entsprechend ihrer Abbaumuster in Braun- und Weißfäulepilze (Falck, 1926, sowie frühere Veröffentlichungen seit 1913, siehe dazu Falck, 1927) und Moderfäulepilze (Findlay und Savory, 1954) unterschieden werden.

Braunfäulepilze zählen zu den Basidiomyceten, sie bauen die Kohlenhydrate des Holzes (Cellulose, Hemicellulosen und Pektin) enzymatisch ab (Vorreiter, 1949; Liese und Schmid, 1962), Lignin oder Lignin-Derivate bleiben zurück. Die Namensgebung wurde an die, bei fortgeschrittenem Befall, in variierender Intensität auftretende Braunfärbung des Holzes angelehnt (Abb. 8). Durch den Cellulose-Abbau und dem damit einhergehenden Festigkeitsverlust neigen befallene Hölzer beim Trocknen zum sog. Würfelbruch. Die Oberfläche des Holzes reißt quer zur Faser ein, wobei die Größe und Ausprägung der Würfel pilzspezifisch sein können (Huckfeldt und Schmidt, 2006). In der finalen Abbauphase zerfällt das Holz unter leichtem Druck zu Pulver. Braunfaules Holz weist bereits zu Beginn des Befalls einen intensiven Verlust der Festigkeiten und der Dimensionsstabilität auf (Seifert, 1968; Wilcox, 1978). Nach Untersuchungen von v. Pechmann und Schaile (1950) konnten für drei verschiedene Braunfäulepilze bei 5% Gewichtsverlust Festigkeitsverluste des Holzes von jeweils ca. 60% ermittelt werden. Kommt es zum Bruch weist das Holz, bedingt durch die Depolymerisation der Cellulose, ein kurzfaseriges, stumpfes bzw. muschelförmiges Bruchbild auf.

Nach Huckfeldt und Schmidt (2006) verursachen die Braunfäuleerreger etwa 65 bis 80% aller Holzschäden in Gebäuden, wobei Nadelhölzer von Braunfäulepilzen stärker abgebaut werden als Laubhölzer (Eslin und Highley, 1976). Innerhalb von Gebäuden kommen der Echte Hausschwamm (*Serpula lacrymans*), der Braune Kellerschwamm (*Coniophora puteana*) sowie verschiedene Arten aus der Gattung der Porenschwämme (*Antrodia* spp.) und Blättlinge (*Gloeophyllum* spp.), wie zum Beispiel der Weiße Porenschwamm (*Antrodia vaillantii*), und weitere Braunfäuleerreger regelmäßig vor (Schmidt, 2007).

Exkurs zum Zellwandabbau durch Braunfäulepilze: Das Wissen über die Prozesse beim Zellwandabbau durch Braunfäulepilze ist im Vergleich zu den Weißfäulepilzen noch immer nicht umfassend. Die einzigartige Fähigkeit zum selektiven Ligninabbau hat die Weißfäulepilze schon sehr früh in den Fokus der Wissenschaft sowie der industriellen

Forschung gerückt (Schwarze, 2007). Die genauen Vorgänge beim Zellwandabbau durch Braunfäulepilze sind auch nach 150 Jahren Forschung nicht generell verstanden. Braunfäulepilze können die Kohlenhydrate, inklusive der kristallinen Cellulose enzymatisch depolymerisieren (Blanchette, 1991). Der Zellwandabbau beginnt nachweislich im äußeren Bereich der S2 (Rehbein und Koch, 2011). Die Hyphen der Braunfäulepilze wachsen jedoch vornehmlich im Lumen, d.h. ohne direkten Kontakt zur Zellwand. Die Hyphen produzieren Enzyme und weitere niedermolekulare Agenzien, die im wässrigen Milieu durch die S3 penetrieren und in tieferliegende Zellwandschichten diffundieren (u.a. Daniel, 1994; Suzuki et al., 2006; Baldrian und Valášková, 2008). Die Zugänglichkeit der Zellwand ist jedoch sehr begrenzt. Flournoy et al. (1991) ermittelten für Sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) eine Zellwand-Porengröße von $< 3,8$ nm und schlossen daraus, dass die für den Celluloseabbau notwendigen Enzyme die relativ kleinen Poren nicht ohne weiteres passieren können. Um die Kohlenhydrate innerhalb der Zellwand aufzuspalten, muss zuerst das Lignin-Grundgerüst der Zellwand modifiziert werden. Lignin ist ein komplexes, heterogenes, aus Phenylpropaneinheiten aufgebautes Polymer. Es bildet die Matrix der hölzernen Zellwand und stellt durch seinen makro-molekularen Aufbau eine physische sowie chemische Barriere für den biotischen Abbau der Cellulose und Hemicellulosen dar. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens erfolgt die Modifikation des Lignins in einem, dem enzymatischen Abbau der Kohlenhydrate vorangestellten Prozess. Durch eine Diffusion niedermolekularer oxidativ wirkender Agenzien (Goodell, 2003; Schmidt, 2006; Schwarze, 2007) wird das Lignin zunächst soweit modifiziert, dass die Zugänglichkeit für die wesentlich größeren Enzyme gegeben ist. Nachfolgend werden die Kohlenhydrate aufgespalten und vermutlich durch Diffusionsvorgänge dem Pilz zugänglich gemacht.



Abb. 8: Braunfäule: Dielenbrett, abgebaut durch *Serpula lacrymans*. Auffällig ist der in der Größe variierende Würfelbruch und die Braunfärbung des Holzes, Maßstab 20 mm.

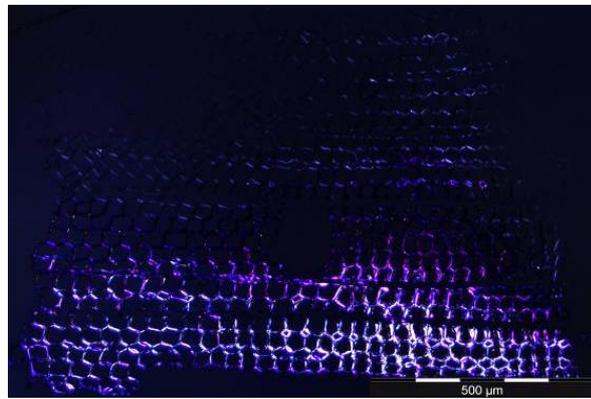


Abb. 9: Braunfäule: *Pinus sylvestris* abgebaut durch *Antrodia vaillantii* im polarisierten Licht. Die abgebauten Gewebebereiche weisen einen intensiven Verlust der Doppelbrechung der kristallinen Bereiche der Cellulose auf.

Lichtmikroskopisch zeichnet sich braunfaules Holz durch eine verminderte oder fehlende Doppelbrechung der Cellulose im polarisierten Licht aus (Abb. 9). Frühe Stadien des Zellwandabbaus durch Braunfäulepilze können unter Anwendung der Polarisationsmikroskopie nicht diagnostiziert werden (Anagnost, 1998). Wird ein Verlust der Doppelbrechung beobachtet, sollte dieser lediglich als Hinweis und nicht als

Bestätigung eines Braunfäulebefalls angesehen werden, da der bakterielle sowie der durch Moderfäulepilze verursachte Holzabbau im fortgeschrittenen Stadium ähnliche Verluste aufzeigen und somit zu einer Fehleinschätzung bei der Identifizierung führen können. Die Hyphen von Braunfäulepilzen wachsen in der Regel durch die Holzstrahlen und Tüpfel in das Holzgewebe ein, wobei die Substrathyphen bevorzugt im Lumen der Zellen und selten direkt an der S3 angelagert vorkommen. Zellwanddurchwachsungen kommen vor, sind aber eher selten zu finden. Stark abgebaute Gewebe verlieren an „Substanz“, d.h. die Sekundärwände erscheinen ausgedünnt gegenüber intakten Bereichen. Insgesamt ist der Holzabbau durch Braunfäulepilze durch wenige Merkmale geprägt. Infektionen im Anfangsstadium sind lichtmikroskopisch nicht (Anagnost, 1998) bzw. nur indirekt über artspezifische Merkmale der Pilze zu identifizieren.

Weißfäulepilze zählen vorwiegend zu den Basidiomyceten, es sind aber auch einige Ascomyceten in der Literatur beschrieben, die Weißfäule an Laubhölzern hervorrufen (Schmidt, 1994; Schwarze et al., 2007). Nach Untersuchungen von Gilbertson (1980) zählen von den 1600-1700 in Nordamerika vorkommenden holzabbauenden Basidiomyceten ca. 94% zu den Weißfäulepilzen, wobei der größere Anteil dieser Pilze an Laubhölzern vorkommt. Innerhalb von Gebäuden dominiert hingegen der Holzabbau durch Braunfäulepilze (Huckfeldt und Schmidt, 2006). Im Unterschied zu Braunfäulepilzen sind Weißfäulepilze in der Lage Lignin ebenso wie die Kohlenhydrate des Holzes (Cellulose, Hemicellulosen und Pektin) im direkten Umfeld der Hyphen enzymatisch abzubauen (Vorreiter, 1949; Rypáček, 1966; Kirk und Chang, 1975). Der Abbau kann simultan oder sukzessiv erfolgen (Liese und Schmid, 1962; Liese 1970b; Blanchette, 1984a, 1984b). Bei der Simultanfäule werden in Abhängigkeit von der Pilzart und der Intensität des Holzabbaus die Kohlenhydrate und Lignin „simultan“ abgebaut (Schmidt, 1994). Die Hyphen liegen lumenseitig an der Zellwand und erodieren diese enzymatisch im direkten Umfeld bzw. großflächig. Anagnost (1998) beschreibt als lichtmikroskopische Merkmale eines simultanen Weißfäulebefalls; an den Spitzen abgerundete, dem Hyphenverlauf folgende Erosionskanäle sowie U- oder halbkreisförmige Vertiefungen in der Sekundärwand, bis hin zu großflächig abgebauten runden Durchbrechungen (Abb. 10 und 11).



Abb. 10: Weißfäule: Detailansicht einer Fensterkante (*Khaya* spp.) abgebaut durch *Trametes versicolor*. Das Holz wird faserig und nimmt eine helle Farbe an, Maßstab 20 mm.

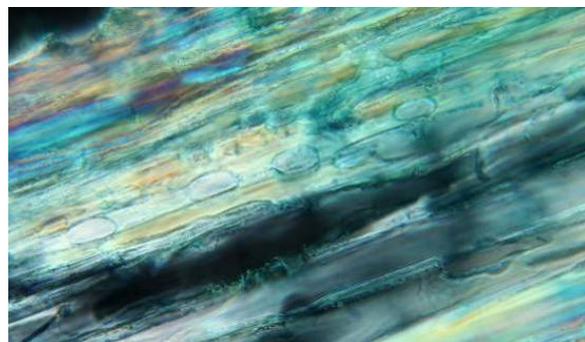


Abb. 11: Weißfäulekavernen im polarisierten Licht. Durch den simultanen Abbau der Kohlenhydrate und des Lignins wurde die Zellwand im direkten Umfeld der Hyphen „kavernenartig“ erodiert.

Der sukzessive Abbau erfolgt in vielerlei Hinsicht ähnlich dem simultanen Abbau durch Weißfäulepilze (Anagnost, 1998). Der Unterschied liegt im schnelleren bzw. bevorzugten Ligninabbau zu Beginn der sukzessiven Weißfäule (Schmidt, 2006) durch niedermolekulare Agenzien (Messner et al., 2003). In Folge des Ligninabbaus kann es zur Aufhebung des Zellverbundes im Bereich der Mittellamelle, d.h. zur Separierung einzelner Zellen kommen. Um den Verlauf der Delignifizierung lichtmikroskopisch zu untersuchen können histochemische Methoden, wie die Färbung mit Safranin und Astrablau, sowie fluoreszenzmikroskopische Untersuchung hinzugezogen werden (Liese, 1970a; v. Aufsess, 1972; Srebotnik und Messner, 1994). Die Festigkeitsminderung des Holzes hängt vom Fäuletyp und der Intensität des Befalls ab. Allgemein gehen die Festigkeiten bei einem Befall durch Weißfäulepilze weniger stark zurück als bei Braunfäulepilzen (Bariska et al., 1983). Schmidt (1994) begründet die Unterschiede bei gleichem Masseverlust durch den verminderten Celluloseabbau durch Weißfäulepilze. Hierdurch werden die Festigkeiten des Holzes weniger stark verringert als bei einem vergleichbaren Braunfäulebefall.

Moderfäulepilze zählen zu den Asco- bzw. Deuteromyceten (Liese und Schmid, 1962; Liese, 1970a; Schwarze et al., 1995; Daniel und Nilsson, 1998; Kim und Singh, 2000). Erste Untersuchungen gehen auf Findlay und Savory (1954), Savory (1954) und Liese (1955) zurück, wobei die Namensgebung auf der bei feuchtem Holz dunkel verfärbten und modrig-weichen Oberfläche befallener Hölzer beruht (Schmidt, 1994). Der Holzabbau durch Moderfäulepilze dominiert in feuchten bis sehr feuchten Umgebungsbedingungen wie z.B. in Kühltürmen, Berieselungs- und Biofilteranlagen oder Hölzern im Erdkontakt wie Masten, Pfosten und Schwellen (Liese, 1959; Liese und Ammer, 1964; Blanchette et al., 1991; Worrall et al., 1991; Singh et al., 1992; Nelson et al., 1995; Blanchette, 2000; Huckfeldt und Melcher, 2008). Kommt es zu einer längerfristigen Befeuchtung, werden auch chemisch geschützte oder modifizierte Hölzer (Da Costa und Kerruish, 1963; Singh et al., 1992; Skyba et al., 2008) sowie innerhalb von Gebäuden verbautes Holz (Huckfeldt und Melcher, 2008) abgebaut. Befallene Hölzer weisen nach dem Trocknen häufig ein Braunfäule-ähnliches Schadbild mit Würfelbruch auf (Schmidt, 1994; Blanchette, 2000; Huckfeldt und Schmidt, 2006; Abb. 12).



Abb. 12: Moderfäule: Holz aus einem Kühlturm, die Oberfläche weist einen feinen Würfelbruch auf, Maßstab 20 mm.



Abb. 13: Moderfäulekavernen (Typ 1) im polarisierten Licht. Die spitz zulaufenden Kavernen sind perlschnurartig, dem Mikrofibrillenwinkel folgend, angeordnet.

Moderfäulepilze bauen Cellulose und Hemicellulosen enzymatisch ab (Daniel und Nilsson, 1998), wobei zwei unterschiedliche Abbautypen in der Literatur beschrieben werden (Corbett, 1965; Nilsson, 1973). Typ 1 ist charakterisiert durch T-förmige Verzweigungen sowie Kavernen, die innerhalb der S2 dem Mikrofibrillenwinkel folgend, zum Teil perlschnurartig angeordnet sind (Courtois, 1963; Nilsson, 1974; Crossley und Levy, 1977; Hale und Eaton, 1986; Anagnost et al., 2000; siehe Abb. 13). Ein vergleichbares Abbaubild wird unter bestimmten Umgebungssituationen, wie z.B. Holzfeuchten nahe der Fasersättigung (Kleist und Schmitt, 2001), auch für einige Basidiomyceten beschrieben (Daniel et al., 1992; Schwarze et al., 1995; Schwarze und Engels, 1998; Kleist et al., 2002; Huckfeldt und Schmidt, 2006). Anagnost et al. (1994) beschreiben in ihren Untersuchungen eine seltene Variante mit diffusen, irregulären Kavernen in der Sekundärwand von *Pinus taeda* Tracheiden. Typ 2 ist gekennzeichnet durch eine vom Lumen ausgehende Erosion der S3 und der S2, weitestgehend ohne Abbau der S1, Primärwand und Mittellamelle (Nilsson und Daniel, 1989).

Durch den Abbauprozess werden die Festigkeitseigenschaften des Holzes stark verringert. So kann nach Liese (1963) ein Gewichtsverlust von nur 5% bereits zu einer Abnahme der Bruchschlagarbeit um etwa 50% führen. Das Bruchbild kann ähnlich einem Braunfäulebefall stumpf erscheinen.

2.4 Holzabbau durch Bakterien

Bakterien sind in der Lage frei zugängliche Zucker sowie Bestandteile der lignifizierten Zellwände abzubauen. Geeignete Umgebungsbedingungen finden sich im stehenden Stamm, beim Flößen oder der Nasslagerung von Sturmwurf-Hölzern sowie Hölzern im Wasser- oder Erdkontakt, wie z.B. Schiffswracks und Gründungspfähle (u.a. Liese, 1950; Liese, 1955; Harmsen und Nissen, 1965; Kim et al., 1996; Björdal et al., 1999, 2000, 2005; Gelbrich et al., 2008; Klaassen, 2008, 2009; Rehbein et al., 2009). Auch mit Holzschutzmitteln behandelte Hölzer werden befallen (Eaton, 1994).

Der Holzabbau durch Bakterien findet zumeist im „Verborgenen“ statt. Holzabbauende Bakterien zählen zu den Prokaryonten, genauer den Eubakterien, durch ihre geringe Größe (0,4 µm, Liese, 1955) bleiben sie selbst unter dem Lichtmikroskop, mit Ausnahme einiger stabförmiger Bakterien (Liese und Karnop, 1968; Karnop, 1972), unkenntlich. Für die diagnostische Charakterisierung hilfreiche übergeordnete Strukturmerkmale, wie das Oberflächenmycel oder die Fruchtkörperausbildung holzabbauender Pilze, fehlen ihnen. Lichtmikroskopisch erfolgt die Diagnose eines bakteriellen Befalls, unterstützt durch spezifische Färbemethoden, in der Regel indirekt, d.h. über das Abbaumuster (Greaves, 1969; Karnop, 1972; Peek und Liese, 1979; Schmidt und Liese, 1994). Erst unter Anwendung der hochauflösenden Elektronenmikroskopie kann der Bakterienkörper sowie Einzelheiten des Zellwandabbaus dargestellt werden (Nilsson und Singh, 1984; Singh und Butcher, 1986; Singh, 1989; Daniel, 1994; Schmidt und Liese, 1994; Kim und Singh, 2000; Blanchette, 2000; Powell et al., 2001; Schmitt und Melcher, 2004; Rehbein et al., 2009). Die Beurteilung einer bakteriellen Holzinfektion sollte nicht pauschal erfolgen. In Abhängigkeit vom zeitlichen Auftreten sowie dem Schadbild ist es sinnvoll, den Befall detailliert zu differenzieren. Im stehenden Stamm treten Bakterien, im Rahmen einer Sukzession synergistisch mit Pilzen auf (Shigo, 1965). Häufig geschieht dies im Zusammenhang mit der

Erkrankung eines Baumes, dem Vorkommen eines Nasskerns oder einer exogen ausgelösten fakultativen Verkernung (Schmidt, 1985). Hierbei treten Bakterien oft als Erstbesiedler auf (Schmidt, 1994). Im Holz ernähren sich Bakterien von frei zugänglichen Zuckern, Inhaltsstoffen der Parenchymzellen, und bauen nicht-lignifizierte Tüpfelmembranen ab (Liese, 1970b). Durch die Synthese von Stoffwechselprodukten kommt es im Holz zu Veränderungen des pH-Wertes, zum Teil unangenehmen Gerüchen nach z.B. Buttersäure sowie zu Verfärbungsreaktionen (Liese und Karnop, 1968; Schmidt et al., 1986; Schmidt und Mehringer, 1989).

Das Holz von Stämmen, die z.B. nach einem Windwurf zum Schutz gegen Austrocknung über einen längeren Zeitraum berieselt oder wassergelagert wurden, wies anschließend eine erhöhte Permeabilität auf. Durch vertiefende Untersuchungen von Ellwood und Ecklund (1959) und Knuth und McCoy (1962) an wassergelagertem Kiefern-Splintholz konnten Bakterien isoliert und unter Laborbedingungen ein Permeabilitätsanstieg des Holzes nachgestellt werden. Durch spätere Untersuchungen gelang es zahlreiche Bakterienstämme aus berieselten bzw. wassergelagerten Hölzern zu isolieren (Berndt und Liese, 1973, Schmidt und Wahl, 1987) und einen Abbau der nicht lignifizierten Margofäden der Hoftüpfelmembranen im Splintholz nachzuweisen (Liese und Karnop, 1968; Karnop, 1972). Der bakterielle Abbau kann Verfärbungsreaktionen induzieren (Koch et al., 2000) sowie durch die lokal veränderte Permeabilität des Holzes zu Spannungen bis hin zur Rissbildung bei der technischen Trocknung führen. Weiterhin wird durch die erhöhte Wegsamkeit das Aufnahmeverhalten von z.B. schützenden oder farbgebenden Behandlungen verändert (Willeitner, 1971), d.h. es kommt zur lokalen Überaufnahme (Abb. 14 und 15).

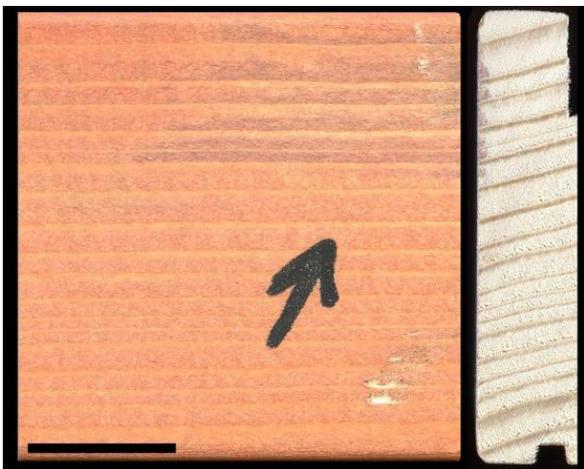


Abb. 14: Fensterkante (*Picea abies*) mit lokaler Überaufnahme der Oberflächenbehandlung; Detailansicht, Maßstab 20 mm.

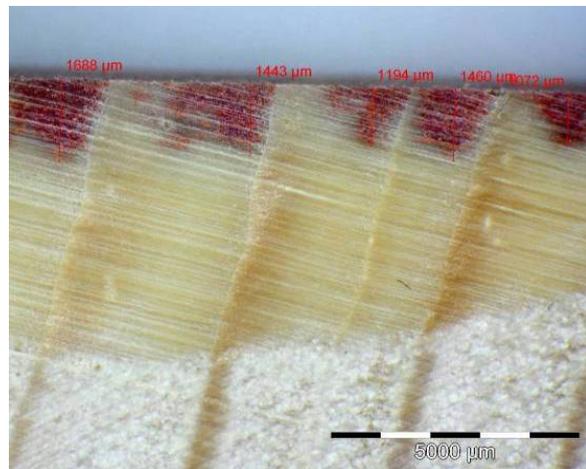


Abb. 15: Detail aus Abb. 14: Die Überaufnahme der Beschichtung erfolgt im Frühholz.

Eine nicht bekannte Anzahl von Bakterienstämmen ist in der Lage lignifizierte Zellwände für ihren Metabolismus zu nutzen, wobei der bakterielle Abbauprozess - im Vergleich zu holzabbauenden Pilzen - langsam erfolgt (Klaassen, 2009). Die Holzfeuchte muss hoch, d.h. weitestgehend wassergesättigt und der Sauerstoffanteil gering bis nahezu anaerob sein. Bakterien sind in feuchter Erde und in wässriger Umgebung allgegenwärtig (Schmidt, 2006). Unter diesen Bedingungen spielen sie eine wichtige Rolle beim Holzabbau (Liese,

1955; Daniel et al., 1987; Björdal et al., 1999) und verursachen zum Teil hohe wirtschaftliche Schäden (Klaassen, 2008). Wissenschaftliche Untersuchungen an Hölzern, die über Jahrzehnte bis mehrere Jahrhunderte bzw. Jahrtausende einem permanenten Erd- oder Wasserkontakt ausgesetzt waren, wie z.B. Gründungspfähle, Bühnen, Konstruktionen in Kühltürmen, Schiffswracks oder hölzerne Kulturgüter aus archäologischen Funden (Abb. 16 und 17), weisen häufig Abbaumuster durch Bakterienbefall im Holzgewebe auf, auch in Gesellschaft mit Moderfäulepilzen (Singh, 1997; Schmitt et al., 2005). Eine abschließende Kenntnis über die genauen Vorgänge beim bakteriellen Holzabbau besteht aktuell noch nicht (Blanchette, 2000).



Abb. 16: Gründungspfahl einer Lagerhalle im Hamburger Hafen (Tidezone). Heller Bereich: Bohrloch der Probenentnahme zur mikroskopischen Untersuchung des Gewebes.



Abb. 17: Moorleiche „Frau von Peiting“. Durch die Lagerung im sauerstoffarmen und sauren Milieu weisen Holz und Leichnam einen guten Erhaltungszustand auf.

Holzabbauende Bakterien werden entsprechend der Morphologie ihrer Abbaumuster in zwei häufig beschriebene und eine dritte selten vorkommende Variante unterteilt (Singh und Butcher, 1986; Daniel et al., 1987; Singh und Butcher, 1991; Nilsson et al., 1992; Daniel, 1994; Blanchette, 2000), wobei die dritte Variante auch nur eine ungewöhnliche Form der zweiten sein kann (Daniel und Nilsson, 1998; Kim und Singh, 2000). Eine taxonomische Klassifizierung erfolgt anhand der Befallsbilder nicht. Unterschieden werden der *Tunnelling*-, *Erosion*- und der *Cavitation*-Typ, wobei die Namensgebung vom jeweiligen mikroskopischen Abbaubild abgeleitet wurde.

1) *Tunnelling*-Bakterien bauen entsprechend ihrer Namensgebung die Zellwand in einem tunnelförmigen Befallsbild ab, wobei vornehmlich die S2, bei fortgeschrittenem Befall aber auch die S3, S1, Primärwand und Mittellamelle abgebaut werden (Daniel and Nilsson, 1998). Die Tunnel sind durch wiederholt auftretende, halbkreisförmige Wände geprägt

(Abb. 18). Innerhalb der Tunnel befindet sich nur wenig bis kein granuläres Abbauprodukt (Daniel et al., 1987). Nach Singh and Butcher (1991) können die Abbaumuster in Abhängigkeit vom Substrat variieren.

2) *Erosion*-Bakterien bauen die S2 in einem halbkreis- oder rhomben- bzw. diamantenförmigen Muster ab, wobei die Längsachse der Hohlräume entsprechend dem Mikrofibrillenwinkel ausgerichtet verläuft (Nilsson, 1984). Im fortgeschrittenen Befall kann auch ein großflächiger Abbau der S3 erfolgen. Die S1, Primärwand und die Mittellamelle werden nicht abgebaut (u.a. Kim und Singh, 2000). Abgebaute Zellwandbereiche weisen variable Mengen eines granulären Abbauproduktes aus Lignin oder Lignin Bestandteilen auf (Singh et al., 1990; Abb. 19).

3) Der Zellwandabbau durch *Cavitation*-Bakterien wurde zuerst von Nilsson (1984) und Nilsson und Singh (1984) an mit Holzschutzmittel behandelten Stützpfehlen (*Pinus radiata*) für die Kiwi-Pflanze in Neuseeland beobachtet und charakterisiert. Das Befallsbild ist gekennzeichnet durch kleine Löcher sowie diamantförmige oder unregelmäßig geformte Hohlräume in der S2, deren Längsachse im rechten Winkel zum Verlauf der Tracheiden ausgerichtet ist (Nilsson, 1984; Nilsson und Singh, 1984; Singh and Butcher, 1991).

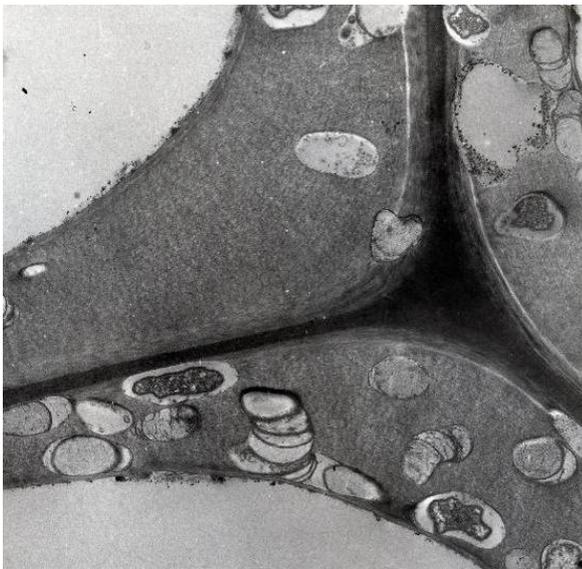


Abb. 18: *Tunneling*-Bakterien (TEM); die gesamte Zellwand (*Pinus radiata*) wird in einem tunnelförmigen Befallsbild abgebaut. Die Tunnel sind durch Querwände geprägt, granuläre Abbauprodukte sind selten. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt durch Dr. A. Singh, Neuseeland (Maßstab = ohne weitere Angaben).

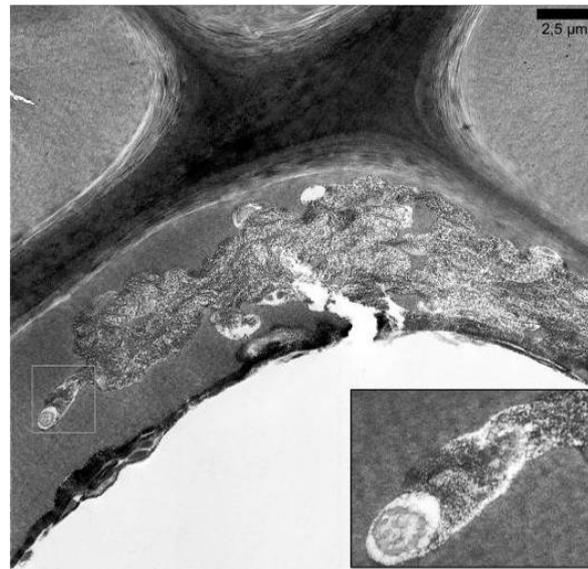


Abb. 19: *Erosion*-Bakterien (TEM); die S2 (*Pinus sylvestris*) wird großflächig abgebaut, es verbleibt ein granuläres Abbauprodukt. Die S1, Primärwand und Mittellamelle werden nicht abgebaut. Detail: Tunnelartiges Befallsbild mit granulärem Abbauprodukt aber ohne deutliche Querwände.

Der bakterielle Holzabbau wird vornehmlich im Zuge wissenschaftlicher Untersuchungen an wirtschaftlich, kulturell oder historisch relevanten hölzernen Konstruktionen in der Literatur beschrieben. Unter Berücksichtigung der geringen Größe holzabbauender Bakterien und der begrenzten Auflösung lichtmikroskopischer Untersuchungen ist zu vermuten, dass eine unbekannte Anzahl bakterieller Befälle, insbesondere wenn es sich um einen kombinierten Befall mit holzabbauenden Pilzen handelt, nicht diagnostiziert wird.

2.5 Spezielle Untersuchungen zur Topochemie des Holzabbaus

Die Anwendung lichtmikroskopischer Methoden eignet sich zur Charakterisierung von mikrobiellen Besiedlungsstrategien sowie zur Untersuchung geschädigter Bereiche des Holzes, beim Zellwandabbau durch Pilze auch zur Beschreibung bzw. Bestimmung der Substrathyphen im Gewebe (u.a. Rypáček, 1966; Huckfeldt und Schmidt, 2006, Schmidt, 2006). Holzabbauende Bakterien können lichtmikroskopisch nur beim Vorkommen größerer Stabbakterien oder Konglomeraten dargestellt werden. Die Visualisierung der Bakterien innerhalb der einzelnen Zellwandschichten erfolgt durch höher auflösende elektronenmikroskopische Methoden (u.a. Nilsson und Singh, 1984; Schmidt und Liese, 1994; Blanchette, 2000; Schmitt und Melcher, 2004; Rehbein et al., 2009). Feinstrukturelle Veränderungen innerhalb der individuellen Zellwandschichten können unter Anwendung lichtmikroskopischer Methoden, auch gestützt durch spezifische Färbemethoden, nicht oder nur in einem begrenzten Umfang analysiert werden. Hierfür hat sich die Elektronenmikroskopie, insbesondere die Transmissionselektronenmikroskopie, als geeigneter erwiesen. Topochemische Untersuchungen des Holzgewebes erfolgen unter Anwendung der hochauflösenden zellulären UV-Spektroskopie. Die Universalmikrospektralphotometrie ermöglicht die Visualisierung aromatischer Komponenten (u.a. Lignin) innerhalb der individuellen Zellwandschichten (u.a. Fergus et al., 1969; Fergus und Goring, 1970; Okuyama et al., 1998) und hat sich nach Koch und Grünwald (2004) als geeignet für die Untersuchung bzw. Charakterisierung

- der Ligninverteilung innerhalb eines Jahrringes (u.a. Fukazawa und Imagawa, 1981; Takabe et al., 1992; Gindl und Grabner, 2000; Gindl, 2001; Schmitt et al., 2003),
- der Zellwandbildung (Grünwald et al., 2002a, b),
- der Ligninverteilung bei transgenen Pappeln (Grünwald et al., 2001),
- acetylierter und thermisch verändertetes Gewebe (Sander und Koch, 2001),
- der Lokalisierung und Analyse von Holz-Extraktstoffen (u.a. Bland und Hillis, 1969; Hillis et al., 1976; Imagawa und Fukazawa, 1978; Kleist und Bauch, 2001; Koch et al., 2003),
- der chemischen Zusammensetzung bzw. des feinstrukturellen Aufbaus der Tüpfelmembran der Gymnospermen (u.a. Bauch und Berndt, 1973; Sano und Nakada, 1998)

erwiesen. Ergänzend zur Charakterisierung der natürlichen Ligninverteilung innerhalb der individuellen Zellwandschichten können chemische bzw. biochemische Prozesse wie

- die Delignifizierung des Holzgewebes bei der Zellstoff-Herstellung (Procter et al., 1967; Saka et al., 1979; Whiting und Goring, 1981; Yoshizawa et al., 1996; Rehbein et al., 2010),
- die generelle Veränderung lignifizierter Gewebe beim Zellwandabbau durch Pilze (u.a. Bauch et al., 1976; Kleist und Seehann, 1997; Schmidt et al., 1997; Kleist und Schmitt, 2001)

dargestellt werden. Sukzessive Veränderungen, insbesondere in den frühen Stadien des Zellwandabbaus bzw. der Zellwandmodifikation, können topochemisch detailliert charakterisiert werden und sind ein wesentlicher Bestandteil der eigenen Untersuchungen (Rehbein et al., 2010; Rehbein und Koch, 2011; Rehbein et al., submitted 2011).

3 Material

Die Materialauswahl der in dieser Arbeit zusammenfassend dargestellten Publikationen erfolgte zum einen anwendungsorientiert, d.h. unter spezieller Berücksichtigung aktueller Fragestellungen, zum anderen grundlagenorientiert und durch die Ergebnisse umfangreicher Vorversuche begründet. Der interdisziplinäre Charakter und der umfangreiche Aufbau der Versuche lässt eine Einzeldarstellung der verwendeten Materialien nicht zusammenfassend beschreiben. Detaillierte Angaben zum Versuchsaufbau und -umfang, zur Vorbehandlung der Proben sowie eine generelle Charakterisierung des Probenmaterials sind in den jeweiligen Publikation ausführlich dargestellt. Eine Zusammenfassung der untersuchten Hölzer ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Zusammenfassung des verwendeten Untersuchungsmaterials nach Publikationen dargestellt.

Publikation* ¹	Handelsbezeichnung	Botanische Bezeichnung	Kurzzeichen nach DIN EN 13556:2003
I	Bintangor	<i>Calophyllum</i> spp. Familie: GUTTIFERAE	CLXX
	Durian	<i>Durio</i> spp. Familie: BOMBACACEAE	DUXX
	Kasai	<i>Pometia pinnata</i> Forst. Familie: SAPINDACEAE	PMPN
	Merpauh	<i>Swintonia</i> spp. Familie: ANACARDIACEAE	
II	Fichte* ²	<i>Picea abies</i> (L.) Karst. Familie: PINACEAE	PCAB
	Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill. Familie: MYRTACEAE	EUGL
	Eucalyptus* ²	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill. Ex Maid. Familie: MYRTACEAE	EUSL
	Paricá* ²	<i>Parika</i> spp. Familie: MIMOSACEAE	
III	Kiefer	<i>Pinus sylvestris</i> L. Familie: PINACEAE	PNSY
	Sibirische Lärche* ²	<i>Larix sibirica</i> Ledeb. Familie: PINACEAE	
	Buche* ²	<i>Fagus sylvatica</i> L. Familie: FAGACEAE	FASY
	Light Red Meranti* ²	<i>Shorea</i> spp. Subg. Rubroshorea Familie: DIPTEROCARPACEAE	SHLR
	Weißeiche* ²	<i>Quercus</i> spp. Familie: FAGACEAE	QCXE
IV	Kiefer	<i>Pinus sylvestris</i> L. Familie: PINACEAE	PNSY
V	Sibirische Lärche	<i>Larix gmelinii</i> (Rupr.) Kuzen Familie: PINACEAE	LAGM
		<i>Larix sibirica</i> Ledeb. Familie: PINACEAE	
VI* ³	Massaranduba	<i>Manilkara bidentata</i> (A. DC) A. Chev. Familie: SAPOTACEAE	MNXX
VIII	Esche	<i>Fraxinus excelsior</i> L. Familie: OLEACEAE	FXEX
	Fichte	<i>Picea abies</i> (L.) Karst. Familie: PINACEAE	PCAB
X	Sibirische Lärche	<i>Larix gmelinii</i> (Rupr.) Kuzen Familie: PINACEAE	LAGM
		<i>Larix sibirica</i> Ledeb. Familie: PINACEAE	

*¹ Siehe Kapitel V Liste der Publikationen; *² Ergebnisse sind nicht in der Publikation aufgeführt, werden noch veröffentlicht bzw. Versuche ergaben keine weiterführenden Ergebnisse; *³ Prüfung erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit Rehbein (2007)

4 Methoden

Die im Rahmen der interdisziplinär ausgerichteten Arbeit angewendeten Methoden dienen der Darstellung, Analyse und Bestimmung grundlegender biologischer, chemischer und technischer Prozesse bzw. der Charakterisierung der Holzeigenschaften. Eine Zusammenfassung der Methoden ist in Tabelle 2 dargestellt. Nachfolgend wird exemplarisch auf spezielle mikroskopische Untersuchungen vertiefend eingegangen. Weiterführende Informationen zu den nicht abgehandelten Methoden sind der jeweiligen Veröffentlichung zu entnehmen.

Tab. 2: Zusammenfassung der angewendeten Methoden nach Publikationen dargestellt.

Publikation ^{*1}	Biologische Untersuchungen ^{*4}	Chemische Untersuchungen ^{*4}	Technische Untersuchungen ^{*4}
I	natürliche Dauerhaftigkeit Lichtmikroskopie ^{*2} zelluläre UV-Spektroskopie (UMSP) ^{*2}	ASE-Extraktion ^{*2} Extraktstoffanalyse (RP-HPLC) ^{*2}	Roh-, Darrdichte Biege-, Druckfestigkeit Brinellhärte Quell- und Schwindverhalten
II	Lichtmikroskopie zelluläre UV-Spektroskopie (UMSP 80 area / line scan)	Neutral Sulfit Aufschluss (NSSC) ^{*3}	
III	Abbauversuch Lichtmikroskopie Polarisationsmikroskopie Elektronenmikroskopie (TEM/FE-SEM ^{*2}) zelluläre UV-Spektroskopie (UMSP 80, area scan, point analysis)		Nanoindentation ^{*2}
IV	Lichtmikroskopie Polarisationsmikroskopie Elektronenmikroskopie (TEM) zelluläre UV-Spektroskopie (UMSP 80 area scan) zelluläre UV-Spektroskopie (MSP 800 point analysis)		
V	natürliche Dauerhaftigkeit Lichtmikroskopie ^{*2} zelluläre UV-Spektroskopie (UMSP) ^{*2}	ASE-Extraktion gravimetrische Extraktstoffbestimmung	Roh-, Darrdichte Jahrringanalyse
VI ^{*5}	natürliche Dauerhaftigkeit Lichtmikroskopie ^{*2}		Roh-, Darrdichte Biege-, Druckfestigkeit Brinellhärte Quell- und Schwindverhalten künstliche Bewitterung UV-Belichtung CIE-L*a*b*-Farbwertmessung
VIII	Holzartenbestimmung Lichtmikroskopie Polarisationsmikroskopie Elektronenmikroskopie (TEM/FE-SEM)	Elementanalytische-Untersuchung (ICP-OES)	dendrochronologische Altersbestimmung
X	natürliche Dauerhaftigkeit Lichtmikroskopie ^{*2}	ASE-Extraktion gravimetrische Extraktstoffbestimmung Extraktstoffanalyse (RP-HPLC) ^{*2}	Roh-, Darrdichte Jahrringanalyse

^{*1} Siehe Kapitel V Liste der Publikationen.
^{*2} Ergebnisse sind nicht in der Publikation aufgeführt, werden noch veröffentlicht bzw. Versuche ergaben keine weiterführenden Ergebnisse.
^{*3} Weiterführende Informationen über die Kochung und die chemischen Analysen der Proben sind der Dissertationsschrift von Dr. Miguel Pereira (2008) zu entnehmen.
^{*4} Die verwendeten Normen sind der jeweiligen Publikation zu entnehmen.
^{*5} Prüfung erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit Rehbein (2007).

Zur strukturellen und topochemischen Untersuchung mikrobiologisch und chemisch modifizierter Hölzer, unter besonderer Berücksichtigung frühzeitiger Veränderungen der individuellen Zellwandschichten, wurden lichtmikroskopische, UV-spektroskopische und

transmissionselektronenmikroskopische Methoden angewendet. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen dienten zum einen der ersten Charakterisierung struktureller Veränderungen des Holzgewebes, zum anderen zur Vorbereitung und Unterstützung der UV-spektroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen. Die UV-Spektroskopie wurde zur subzellulären, topochemischen Charakterisierung der modifizierten Gewebe genutzt, während die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen die Darstellung ultrastruktureller Veränderungen ermöglichten.

4.1 Einbettung des Probenmaterials für die mikroskopischen Untersuchungen

Für einen Teil der lichtmikroskopischen sowie die gesamten UV-spektroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Transversal- sowie teilweise Radialproben aufsteigender Behandlungs- bzw. Abbaustadien eingebettet. Die Probengröße betrug einheitlich $1,5 \times 1,5 \times 5 \text{ mm}^3$. Ein Teil der Proben wurde bis zu drei Tage in ein Gemisch aus Paraform- und Glutaraldehyd (Karnovsky, 1965) gegeben (fixiert) und nachfolgend dreimal mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gewaschen. Die Proben wurden nachfolgend in einer Acetonreihe entwässert, über sechs Propylenoxid-Epoxydharz-Infiltrationsstufen in reines Epoxydharz, bestehend aus dem Harz (ERL-4221-D), dem Härter (Nonenylbernsteinsäureanhydrid), einem Weichmacher (Diepoxid) und einem Beschleuniger (Dimethylaminoethanol), überführt (Spurr, 1969) und anschließend bei 70°C in einem Wärmeschrank auspolymerisiert. Ein zweiter Teil der Proben wurde nach Kleist und Schmitt (1999) ohne vorherige Entwässerung direkt über sechs Propylenoxid-Epoxydharz-Infiltrationsstufen in reines Epoxydharz überführt (Spurr, 1969) und auspolymerisiert, um Reaktionen mit Lösungsmitteln zu vermeiden.

4.2 Lichtmikroskopie

Bei der Präparation des Probenmaterials für die lichtmikroskopischen Untersuchungen kamen zwei Methoden zur Anwendung.

Methode 1: Zur allgemeinen Untersuchung befallener Bereiche wurden Handschnitte in radialer und tangentialer Richtung mit einer Rasierklinge (Rothbart, zweischneidig) angefertigt. Die Schnitte wurden nachfolgend mit einer Baumwollblau/Milchsäure Lösung zur besseren Kontrastierung eingefärbt, auf Glasobjektträger überführt und mit einem Zeiss Ultraphot II Durchlichtmikroskop, ausgestattet mit einer Canon EOS 500D Digitalkamera, untersucht.

Methode 2: Von den in Epoxydharz eingebetteten Proben wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung) 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Glasobjektträger überführt, bei ca. 70°C auf einer Wärmeplatte ausgerichtet, gestreckt und fixiert. Anschließend wurde eine Schnellfärbung mit einer 1%igen Borax-Toluidinblau-Lösung (Mischungsverhältnis 4:1 mit einer 1%igen Pyronin G-Lösung) und nachfolgendem Waschen in Aqua bi-dist. und Ethanol durchgeführt. Als Übersichtsfärbung für die Durchlichtmikroskopie färbt Toluidinblau lignifizierte Zellwände grünblau. Anhand der lichtmikroskopischen Schnitte konnten gezielt Bereiche für die UV-spektroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ausgewählt werden. Die Mikroskopie sowie die Fotografie der Schnitte erfolgte mit einem Olympus BX 51 Durchlichtmikroskop ausgestattet mit einer Digitalkamera und der CELL F Software (Olympus).

Zur Ergänzung der lichtmikroskopischen Untersuchung erfolgte eine Beurteilung der mikrobiologisch modifizierten Proben unter Anwendung der Polarisierungstechnik.

4.3 Universal Mikrospektralphotometrie (UMSP 80 / MSP 800)

Analog zur Lichtmikroskopie (Methode 2) wurden von den in Epoxydharz eingebetteten Proben 1 µm dicke ungefärbte Semidünnschnitte in transversaler und radialer Ausrichtung angefertigt. Die Schnittebene lag, sofern möglich, direkt unterhalb der Ebene der lichtmikroskopischen Schnitte, um die Vergleichbarkeit der Gewebe zu gewährleisten. Die Schnitte wurden auf Quarz-Objektträger überführt und mit UV-Licht durchlässigem Immersionsöl und einem Quarz-Deckglas abgedeckt.

Flächenmessung (UMSP 80)

Die topochemische Untersuchung chemisch und mikrobiologisch modifizierter Hölzer erfolgte an einem Universal-Mikro-Spektral-Photometer (UMSP 80, Zeiss), ausgerüstet mit einer Flächenscan-Einrichtung und Ultrafluor-Objektiven (Vergrößerung: 32:1, 100:1). Die Untersuchung ermöglicht die semi-quantitative Darstellung aromatischer Verbindungen (Lignin) in den individuellen Zellwandschichten. Hierzu wurden Aufnahmen mit konstanten Wellenlängen von 278 nm bei Laubholz und 280 nm bei Nadelholz (Koch und Grünwald, 2004) durchgeführt. Die gewählten Wellenlängen entsprechen dabei jeweils dem Absorptionsmaximum von Guajacyl- und Syringyl-lignin. Die Messungen erfolgten, indem definierte Flächen mit Hilfe des Scan Programms APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Fa. Zeiss, Ortsaufnahmen von 0,25 µm x 0,25 µm) gescannt und die detektierbaren 4096 Graustufen in 14 bzw. 56 Grundfarben konvertiert wurden, welche dann die gemessenen Absorptionsintensitäten repräsentieren (Koch und Kleist, 2001).

Punktmessung (UMSP 80 / MSP 800)

Zur chemischen Charakterisierung der absorbierenden Substanzen im Holzgewebe wurden Punktmessungen an zwei UV-Spektrometern (UMSP 80, MSP 800) durchgeführt.

I: Beim UMSP 80 werden Semidünnschnitte sequentiell mit monochromatischem Licht in einem variablen Wellenlängenbereich von 240-700 nm in 1 nm Schritten im Durchlicht (Transmission) gemessen. Jede Punktmessung besteht aus einem Mittelwert von 50 automatisch wiederholten Einzelmessungen. Die Absorption der Messpunkte wird analog mit einem Dioden-Array-Detektor in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgezeichnet (Koch, 2004) und mit der Software LAMWIN ausgewertet.

II: Beim TIDAS MSP 800 werden ebenfalls Semidünnschnitte im Durchlicht (Transmission) gemessen. Die Messung erfolgt mit definiertem polychromatischem Licht, welches im Anschluss durch ein Spektrometer (CCD-MCS UVNIR) in die einzelnen Wellenlängen zerlegt wird. Der nutzbare Wellenlängenbereich des Spektrometers beträgt 190-1010 nm, ist aber bedingt durch die optischen Eigenschaften des Mikroskops (Zeiss Axio Imager.D1m) auf 240-900 nm begrenzt (j&m, 2011). Die Aufnahme eines Spektrums (240-400 nm) mittels Dioden-Array-Detektor erfolgt mit 3 automatisch wiederholten Einzelmessungen in weniger als 20 Sekunden. Die Messfeldgröße kann flexibel eingestellt werden und betrug für die eigenen Messungen 1,4 µm² bei Verwendung eines 40x Objektivs. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Panorama.

4.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Analysen erfolgten an Proben, die zuvor für eine lichtmikroskopische Charakterisierung der Gewebe und Zellwandschichten ausgewählt und präpariert wurden. Von den ausgewählten Bereichen wurden Ultradünnschnitte (80-100 nm) hergestellt und mit Kaliumpermanganat (KMnO₄) kontrastiert (Donaldson, 1992; Schmitt und Melcher, 2004). Zur Verbesserung der Schnittqualität wurden die Schnitte im Auffangtrog des Diamantmessers mit einem Gemisch aus Chloroform und Xylol (1:1) gestreckt und auf unbefilmte Kupfernetze (Maschenweite 300) aufgezogen. Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Elektronenmikroskop „CM 12 TEM“ (Philips) bei einer Beschleunigungsspannung von 40 oder 60 kV durchgeführt. Bei der TEM Untersuchung handelt es sich um ein indirektes, bildgebendes Verfahren. Die visuelle Darstellung der Schnitte beruht auf einer Anfärbung des Lignins mit Kaliumpermanganat (KMnO₄), dessen Ionen bevorzugt die funktionellen Gruppen der Alkohole des Lignins oxidieren (Schmitt und Melcher, 2004). Eine Differenzierung der einzelnen Zellwandschichten wird durch die variierende Elektronendichte und damit einhergehende unterschiedliche Farbaufnahme des Gewebes möglich. Die Technik eignet sich somit zur Visualisierung der natürlichen Ligninverteilung (u.a. Singh et al., 2002) und zur Dokumentation der Veränderung der Elektronendichte, d.h. der optischen Dichte des Gewebes im Verlauf des Zellwandabbaus durch Pilze (Huckfeldt, 2003; Schmitt und Melcher, 2004).

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Werkstoff Holz definiert sich über seine Materialeigenschaften. Eine fachgerechte und anwendungsorientierte HolzAuswahl kann ohne detaillierte Kenntnis der Holzeigenschaften nicht erfolgen. Hölzer, die einer erhöhten Beanspruchung unterliegen, können ihre Funktion nur dann erfüllen, wenn sie entsprechend gute Kennwerte aufweisen. Im Falle einer biotischen Beanspruchung, z.B. durch holzabbauende Pilze, ist die natürliche Dauerhaftigkeit des Holzes eine wichtige selektierende Materialeigenschaft. Ungeachtet der hohen wirtschaftlichen Schäden, die insbesondere durch holzabbauende Pilze an Konstruktionen im Innen- und Außenbau hervorgerufen werden, sind die biochemischen Prozesse beim Holzabbau durch Braunfäulepilze und Bakterien noch nicht vollständig verstanden.

5.1 Beurteilung der Holzeigenschaften neu eingeführter Wirtschaftsbaumarten für den konstruktiven Außenbau (Publikationen I, V, VI und X)

Der deutsche Holzhandel steht vor dem Problem, dass für den Fenster- sowie Garten- und Landschaftsbau etablierte Importhölzer aufgrund langjähriger intensiver Nachfrage und Übernutzung nicht mehr in den gewünschten Mengen und Qualitäten zur Verfügung stehen (Rehbein und Koch, 2007; Koch und Rehbein, 2009). Die Verknappung etablierter Handelshölzer hat zu einem Preisanstieg und einer verstärkten Einfuhr aktuell noch relativ unbekannter Holzarten, sog. Substitutionshölzer, geführt (Rehbein und Koch, 2007).

Ermittlung grundlegender Materialeigenschaften von Substitutionshölzern

Die Eignung einer Holzart für den Garten- und Landschafts- sowie konstruktiven Rahmenbau definiert sich über die individuellen Holzeigenschaften. Als relevante Eigenschaften sind zu nennen: die Rohdichte, die natürliche Dauerhaftigkeit und die Dimensionsstabilität. Bei neu eingeführten bzw. weniger bekannten Holzarten müssen diese Eigenschaften vorab ermittelt werden, da die verfügbaren Literaturdaten zum Teil aus nicht nachvollziehbaren Quellen stammen oder abweichenden nicht normkonformen Standards entsprechen.

Infolge der beschriebenen Marktsituation wurden die Materialeigenschaften von fünf Substitutionshölzern ermittelt und hinsichtlich ihrer Eignung für den konstruktiven Rahmenbau bzw. den Garten- und Landschaftsbau überprüft.

Die aus Südostasien stammenden Hölzer Bintangor (*Calophyllum* spp.), Kasai (*Pometia pinnata*), Durian (*Durio* spp.) und Merpauh (*Swintonia* spp.) werden als Ersatzhölzer für das etablierte Handelssortiment Rotes Meranti (*Shorea* spp., Sektion *Rubroshorea*) auf dem deutschen Markt angeboten. Die Holzart Massaranduba (*Manilkara bidentata*) aus Südamerika wurde vor ca. 4-6 Jahren als Substitutionsholz für das etablierte Bangkirai (*Shorea* spp., subg. *Shorea*) für den Garten- und Landschaftsbau, insbesondere für die Verwendung als Terrassendielen, eingeführt.

Geeignete Holzarten für die Konstruktion maßhaltiger Bauteile wie z.B. Fenster und Außentüren sind vom Verband der Fenster und Fassadenhersteller e. V. (VFF) im Merkblatt HO.06-1:2009 zusammengefasst. Die aktuelle Version umfasst 10 Nadel- und 24 Laubhölzer. Auf der Grundlage der ermittelten Kennwerte (siehe Tab. 3) und praktischen

Erfahrungen wurden die beiden Hölzer Bintangor und Kasai als geeignet für den Fensterbau eingestuft und neu in das VFF Merkblatt HO.06-1:2009 aufgenommen (Koch und Rehbein, 2009). Die Hölzer Durian und Merpauh zeichnen sich durch gute bis sehr gute Festigkeiten sowie eine gute Verklebbarkeit aus. Die Prüfung der natürlichen Dauerhaftigkeit entsprechend DIN EN 350-1 ergab für die Holzart Durian die Einstufung in die Dauerhaftigkeitsklasse 4 bis 5 (wenig bis nicht dauerhaft) und für die Holzart Merpauh die Dauerhaftigkeitsklasse 5 (nicht dauerhaft). Beide Hölzer erfüllen somit nicht die Bewertungskriterien der Gütegemeinschaften und wurden insbesondere aufgrund der geringen natürlichen Dauerhaftigkeit des Kernholzes nicht für den konstruktiven Rahmenbau zugelassen (Tab. 3).

Tab. 3: Bezeichnung, Herkunft und Materialeigenschaften geprüfter Substitutionshölzer.

Handelsname	Botanische Bezeichnung	Verbreitung	Materialeigenschaften
Bintangor	<i>Calophyllum</i> spp. Familie: CLUSIACEAE	Indien Südost-Asien Indonesien	Rohdichte: 0,45 - 0,68 - 0,85 g/cm ³ E-Modul: 8.000 - 15.300N/mm ² Biegefestigkeit: 74 - 94 - 106 N/mm ² Dauerhaftigkeitsklasse 3 (variabel)
Kasai	<i>Pometia pinnata</i> J. R. Forst. & G. Forst. Familie: SAPINDACEAE	Südost-Asien Indonesien	Rohdichte: 0,63 - 0,72 - 0,92 g/cm ³ E-Modul: 12.800 - 17.500N/mm ² Biegefestigkeit: 77 - 101 - 112 N/mm ² Dauerhaftigkeitsklasse 3
Durian	<i>Durio</i> spp. Familie: BOMBACACEAE	Vietnam Kambodscha Indonesien	Rohdichte: 0,40 - 0,69 - 0,75 g/cm ³ E-Modul: 9.500 - 13.000N/mm ² Biegefestigkeit: 60 - 69 - 78 N/mm ² Dauerhaftigkeitsklasse 4 bis 5
Merpauh	<i>Swintonia</i> spp. Familie: ANACARDIACEAE	Burma Indonesien	Rohdichte: 0,60 - 0,71 - 0,82 g/cm ³ E-Modul: 15.000 - 18.100 N/mm ² Biegefestigkeit: 82 - 141 - 169 N/mm ² Dauerhaftigkeitsklasse: 5
Massaranduba	<i>Manilkara bidentata</i> (A. DC.) A. Chev. Familie: SAPOTACEAE	Guayana Brasilien	Rohdichte: 0,90 - 1,07 - 1,17 g/cm ³ E-Modul: 17.885 N/mm ² Biegefestigkeit: 131 - 179 - 227 N/mm ² Dauerhaftigkeitsklasse: 1

Nach Auswertung der biologischen und physikalischen Prüfwerte konnte der Holzart Massaranduba, unter der Voraussetzung einer fachgerechten, dem Einsatzzweck angepassten Vortrocknung, eine Empfehlung für den Einsatz im Außenbau, speziell als Terrassendielen, ausgesprochen werden (Rehbein und Koch, 2007). Bedingt durch die hohe Dichte des Gewebes findet die Feuchteabgabe und -aufnahme bei Massaranduba sehr verzögert statt. Nach dem Fällen werden die Stämme i.d.R. ohne technische Trocknung im Erzeugerland zu Halb- oder Fertigwaren verarbeitet. Die Holzfeuchte dieser Produkte liegt bei der Verarbeitung in Deutschland daher nicht selten bei $u = 40-60\%$. Infolge der beschleunigten Abtrocknung der Mantelfläche, z.B. durch direkte Sonneneinstrahlung,

kommt es nach der Verarbeitung häufig zur Ausbildung innerer Spannungen im Holzkörper und in deren Folge zur Rissbildung, zumeist entlang der Holzstrahlen. Eine angemessene Holzfeuchte von $u = 15-18\%$ muss als Grundvoraussetzung für die Verwendung dieser Holzart im Außenbau angesehen werden, um die Neigung zur Ausbildung von holzstrahlparallelen Rissen zu vermindern.

Erweiterte Untersuchungen zur natürlichen Dauerhaftigkeit der Sibirischen Lärche

Aktuell wird die Sibirische Lärche (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, LAGM) als ein „relativ“ neues Sortiment auf dem deutschen Holzmarkt angeboten. Die gleichmäßig und feinjährig gewachsenen Hölzer sollen sich insbesondere für die Verwendung im Außenbau eignen (Abb. 20). Detaillierte Informationen über die natürliche Dauerhaftigkeit der Sibirischen Lärche lagen zu Beginn der Untersuchung noch nicht vor. Die bisher gehandelten Arten (*Larix decidua*, *L. kaempferi*, *L. x eurolepis* und *L. occidentalis*) sind in der DIN EN 350-2:1994 als mäßig bis wenig dauerhaft (DHK 3-4) gelistet. Die besonderen Klimabedingungen mit kurzen Wuchsperioden in Sibirien begrenzen den jährlichen Zuwachs der Bäume und fördern einen besonders feinen und gleichmäßigen Jahrringaufbau. Bei Nadelhölzern erhöht sich der Spätholzanteil mit abnehmender Jahrringbreite, d.h. umso feiner der Jahrringaufbau, desto höher der Spätholzanteil mit höherer Dichte des Holzgewebes. Diese „Faustformel“ gilt bis zu einer Jahrringbreite von ca. 1 mm. Unterhalb dieser Grenze nimmt der Frühholzanteil zugunsten der lebensnotwendigen Wasserleitung nicht weiter ab. Die Dichte hat einen direkten Einfluss auf die Materialeigenschaften und lässt innerhalb einer Gattung Rückschlüsse auf die natürliche Dauerhaftigkeit des Kernholzes, in diesem Fall der Sibirischen Lärche im direkten Vergleich zur Europäischen Lärche, zu. Eine derartige Korrelation besteht nur für wenige Holzarten wie z.B. die Gruppe der Meranti Hölzer (*Shorea* spp.) aus Südostasien.

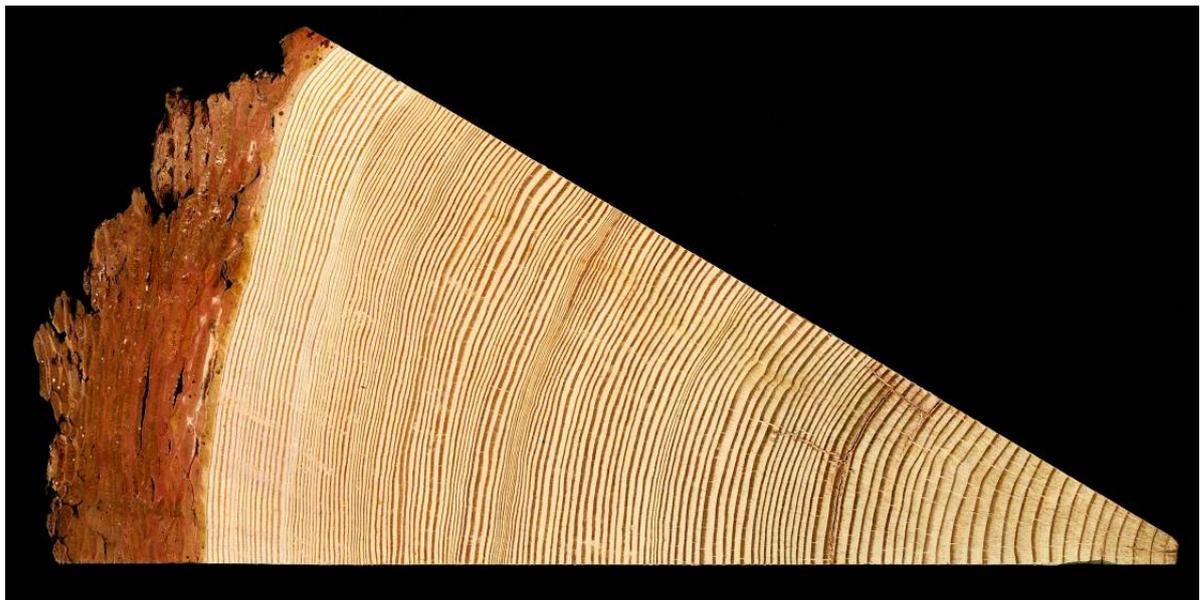


Abb. 20: Stammabschnitt einer Sibirischen Lärche mit dem typischen engringigen Jahrringaufbau und ausgeprägter Rinde.

Zur Klassifizierung der natürlichen Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche wurden in den Jahren 2007 und 2009/10 umfangreiche Laborprüfungen entsprechend DIN

CEN/TS 15083-1:2005 und DIN EN 350-1:1994 durchgeführt (Koch et al., 2007; Rehbein und Koch, 2010). Die ausgewählten Prüfkörper wurden zum einen entsprechend ihrer lokalen Herkunft in Sibirien (Irkutsk, Lesosibirsk, Ust Ilimsk, im Jahr 2007), zum anderen als gemischtes Handelssortiment mit einer erweiterten Anzahl von Prüfpilzen (im Jahr 2009/10) nach Norm getestet. Zur grundlegenden Beurteilung der speziellen Holzeigenschaften wurden umfangreiche quantitative Extraktstoff- und Rohdichtebestimmungen sowie Jahrringmessungen durchgeführt. Ergänzende Freilanduntersuchungen stehen noch aus.

Die Laborprüfung der natürlichen Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche im Jahr 2007 ergab für die Prüfkörper aus dem Herkunftsgebiet Irkutsk die Dauerhaftigkeitsklasse 2 (dauerhaft), für die der Herkunftsgebiete Lesosibirsk und Ust Ilimsk die Dauerhaftigkeitsklasse 3 (mäßig dauerhaft) (Koch et al., 2007). Durch erweiterte Untersuchungen im Jahr 2009/10 konnten die vorherigen Ergebnisse bestätigt werden (Rehbein und Koch, 2010). Die Prüfung ergab für das praxisnahe Handelssortiment Sibirische Lärche die Dauerhaftigkeitsklasse 3 (mäßig dauerhaft). Variationen in der natürlichen Dauerhaftigkeit innerhalb des Sortimentes traten in Abhängigkeit von der Rohdichte (bei $u = 11-12\%$) der einzelnen Prüfkörper auf. Hölzer mit einer Rohdichte $< 0,70 \text{ g/cm}^3$ lagen im Bereich der Dauerhaftigkeitsklassen 2 bis 4 - (5). Oberhalb einer Rohdichte von $0,70 \text{ g/cm}^3$ verliert sich die Streuung der Einzelwerte zunehmend, die Proben lagen alle im Bereich der Dauerhaftigkeitsklasse 3 und besser (Abb. 21). Die Korrelation zwischen der Rohdichte und dem ermittelten Masseverlust der einzelnen Prüfkörper zeigt mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$ eine sehr hohe Signifikanz.

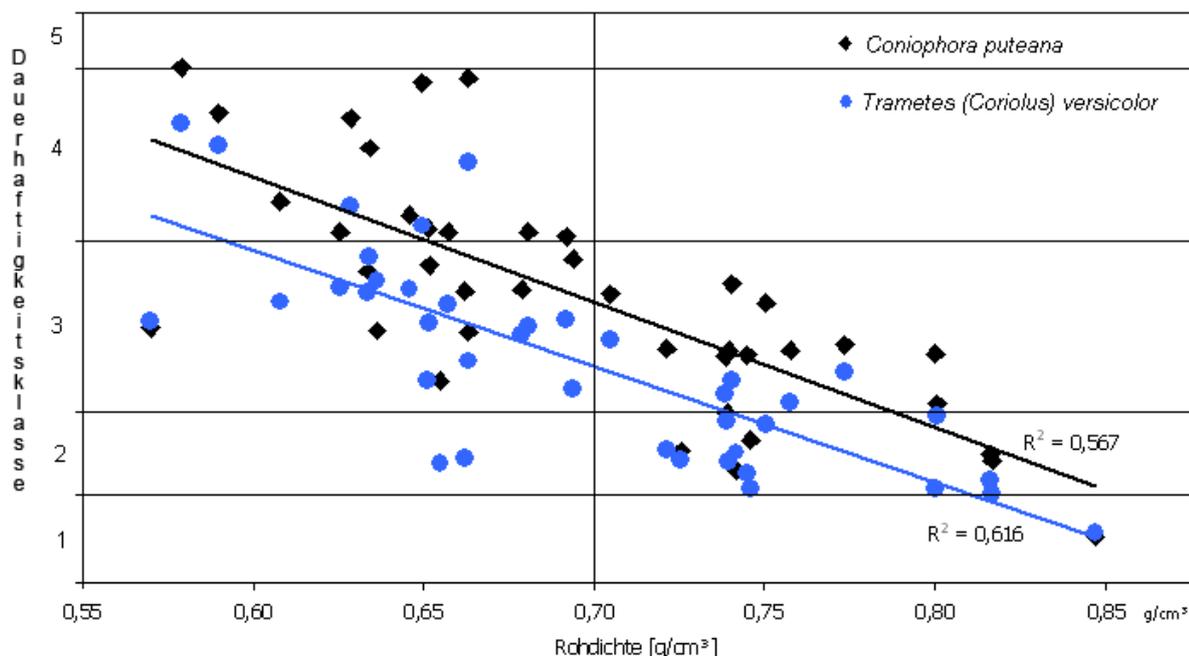


Abb. 21: Sibirische Lärche, Untersuchung 2009/10: Dauerhaftigkeitsklassen nach Rohdichte (bei $u = 11-12\%$) dargestellt. Ab einer Rohdichte von $0,70 \text{ g/cm}^3$ lagen alle Proben im Bereich $\text{DHK} \leq 3$.

Ergänzende quantitative Extraktstoffbestimmungen und Jahrringmessungen der Proben aus dem Kollektiv 2009/10 ermöglichten eine grundlegende Beurteilung des untersuchten

Sortimentes hinsichtlich der maßgebenden, die Dauerhaftigkeit beeinflussenden Faktoren. Die natürliche Dauerhaftigkeit einer Holzart wird im Wesentlichen durch die Einlagerung fungizid wirkender Inhaltsstoffe unterschiedlicher Stoffklassen beeinflusst. Für die quantitative Bestimmung der Extraktstoffgehalte wurden Parallelproben der Dauerhaftigkeitsprüfung gemahlen und sukzessive mit Petrolether und Aceton/Wasser [9:1] extrahiert (ASE, Accelerated Solvent Extraction). Der Feststoffgehalt wurde nachfolgend durch Abdampfen des Lösungsmittels gravimetrisch bestimmt und mit dem Darrgewicht der Einwaage ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung belegt eine eindeutige Beziehung zwischen der ermittelten Extraktstoffmenge und der natürlichen Dauerhaftigkeit. Proben mit der höchsten natürlichen Dauerhaftigkeit („sehr dauerhaft“) weisen den höchsten Extraktstoffgehalt auf. Insbesondere der Vergleich der Dauerhaftigkeitsklassen 2 bis 3 und 4 bis 5 weist signifikante Unterschiede bezogen auf die Extraktstoffgehalte der einzelnen Kollektive auf (Rehbein und Koch, 2010; Abb. 22). Eine nachfolgend durchgeführte RP-HPLC Analyse (Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography) bestätigte die quantitative Relevanz der individuellen Extraktstoffe. Aufgrund fehlender Stammdaten gelang es jedoch nicht einzelne Verbindungen mit ausreichender Sicherheit zu bestimmen.

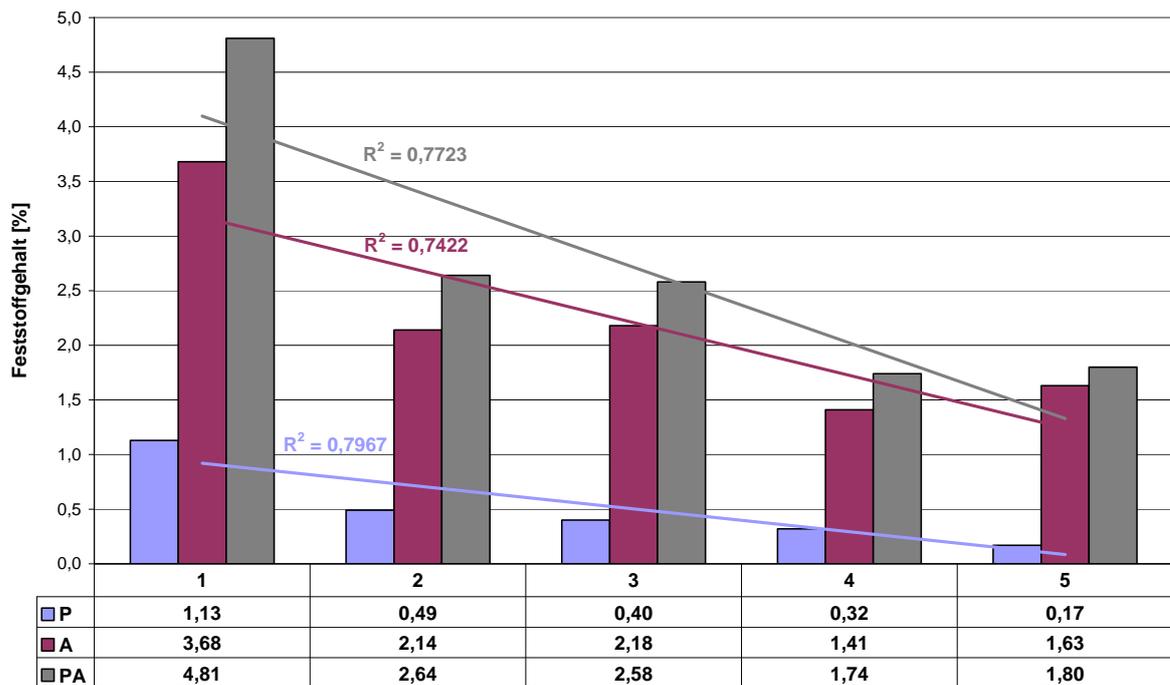


Abb. 22: Sibirische Lärche, Untersuchung 2009/10: Prozentualer Extraktstoffgehalt nach Dauerhaftigkeitsklassen (DHK) dargestellt. X-Achse: 1 bis 5 = DHK; P = Petrolether; A = Aceton/Wasser (9:1); PA = Summe P + A.

Da das Holz der Sibirischen Lärche durch einen besonders feinen Jahrringaufbau geprägt ist, wurde der Einfluss der Jahrringstruktur auf die natürliche Dauerhaftigkeit durch Auszählen und Vermessen des Früh- und Spätholzanteils untersucht. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Prüfkörper mit einer höheren natürlichen Dauerhaftigkeit einen signifikant höheren Spätholzanteil aufweisen ($R^2 = 0,90$).

Aufgrund der erzielten Ergebnisse, insbesondere der signifikanten Korrelation zwischen Rohdichte und Dauerhaftigkeit, konnte dem Holzhandel die Empfehlung einer Rohdichte-Vorsortierung der Sibirischen Lärche für eine praxisnahe Zuordnung bzw. Beurteilung ihrer natürlichen Dauerhaftigkeit ausgegeben werden (Rehbein und Koch, 2010).

Die Ergebnisse der Dauerhaftigkeitsprüfung werden im Zuge der Überarbeitung bzw. Neufassung der DIN 68800, im neuen Teil 1 „Allgemeines“, aufgenommen. Parallel hierzu gilt es, die Ergebnisse zur natürlichen Dauerhaftigkeit dahingehend aufzubereiten, dass sie über den nationalen Spiegelausschuss im DIN beim CEN eingereicht und somit nach Möglichkeit in die Überarbeitung von DIN EN 350-2 einfließen (Rehbein et al., 2011).

5.2 Topochemische Untersuchungen zum Holzabbau durch den Braunfäulepilz *Antrodia vaillantii* (Publikation III)

Das Wissen über den Holzabbau durch Pilze ist durch grundlegende Untersuchungen in den letzten 150 Jahren stetig erweitert worden. Viele dieser Arbeiten stützen sich auf die licht- bzw. elektronenmikroskopische Beschreibung der Abbaumuster. Weniger ist über die topochemischen Veränderungen innerhalb der individuellen Zellwandschichten, insbesondere beim beginnenden Zellwandabbau durch Braunfäulepilze bekannt (Rehbein und Koch, 2011).

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde der Beginn und Fortschritt des Holzabbaus, verursacht durch den Weißen Porenschwamm (*Antrodia vaillantii* (Fr.) Ryv.), unter Anwendung der Licht- und Elektronenmikroskopie sowie der zellulären UV-Spektroskopie grundlegend untersucht (Rehbein und Koch, 2011). *A. vaillantii* ist ein in Deutschland häufig vorkommender Hausfäulepilz; er verursacht eine Braunfäule und kommt regelmäßig an Nadelholz vor. Für die vorliegende Versuchsreihe wurde Splintholz der Holzart Kiefer (*Pinus sylvestris* L., Auswahl entsprechend DIN EN 113:1996) einem Pilzabbau über 22 Tagen ausgesetzt (Abb. 23). Nach 3, 7, 11, 16 und 22 Tagen wurden die inkubierten Proben entnommen, inklusive steriler Kontrollproben bei -18°C gelagert und nach Abschluss der Versuchsreihe für die topochemischen und elektronenmikroskopischen Analysen in Epoxydharz eingebettet.

Der spezifische Versuchsaufbau basiert auf den Ergebnissen unterschiedlich konzipierter Vorversuche, die zur Festlegung einer geeigneten Kombination der Holz- und Pilzart, der Probengeometrie, dem Einbauverfahren sowie der Inkubationszeit durchgeführt wurden.

Entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche wurde das Probenformat von ursprünglich 25 x 25 x 5 mm³ auf 1,5 x 1,5 x 5 mm³ verkleinert. Das geringere Probenvolumen ermöglicht die vollständige Epoxydharz-Einbettung der gesamten Probe ohne vorherige Modifikation der Mantelfläche, vereinfacht die Präparation oberflächennaher Schnitte sowie die UV-spektroskopische Untersuchung früher Abbaustadien.

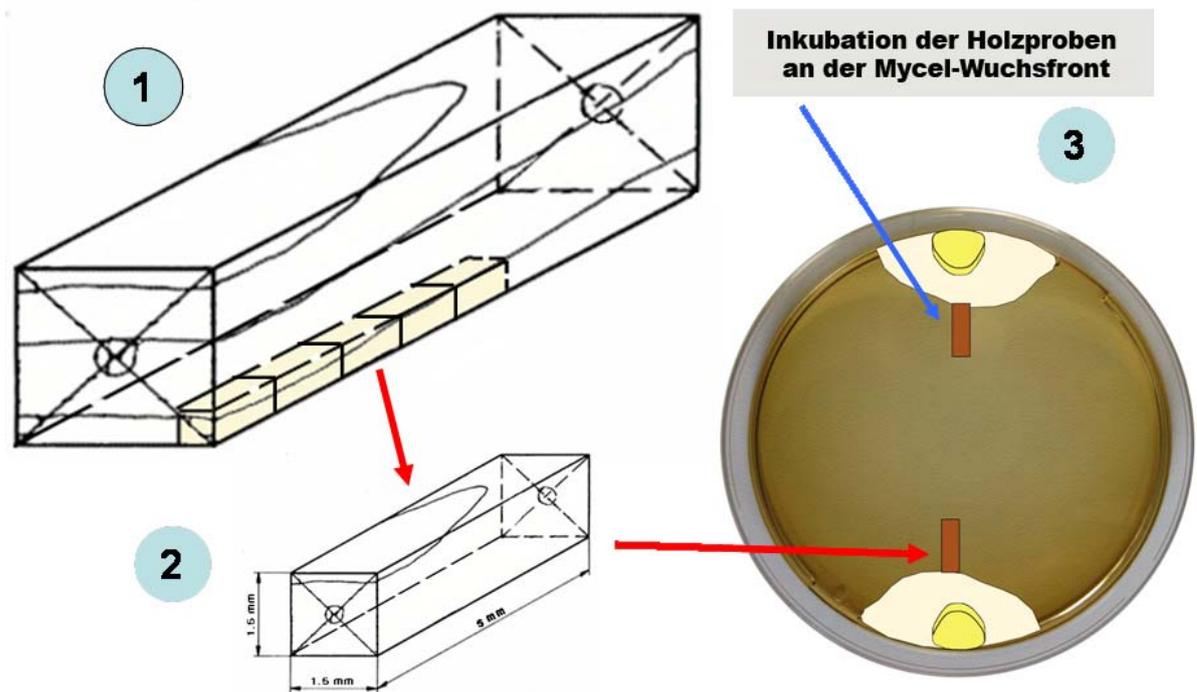


Abb. 23: Probenentnahme (*Pinus sylvestris*) sowie Positionierung der Prüfkörper in Bezug zur Mycel-Wuchsfrente des Prüfpilzes *Antrodia vaillantii*.

Die Kombination *P. sylvestris* und *A. vaillantii* wurde aufgrund des gleichmäßigen Aufbaus des tracheidalen Grundgewebes des Nadelholzes sowie der guten und anspruchslosen Präparations- und Wuchseigenschaften des Braunfäulepilzes gewählt. Im Fokus der Untersuchung lag die topochemische Charakterisierung früher Befallsstadien. Die lichtmikroskopische Auswertung der Vorversuchsreihen bestätigte ein Einwachsen von Substrathyphen bereits innerhalb der ersten drei Tage. Nach sieben bis elf Tagen war ein Masseverlust gravimetrisch zu ermitteln, nach 22 Tagen zeigte das Holzgewebe beim Ausbau bereits einen deutlichen Verlust der Festigkeiten auf, daher wurde die Laufzeit von ursprünglich 44 auf 22 Tage begrenzt.

Bedingt durch die in das Holzgewebe einwachsenden Hyphen war eine anfängliche Gewichtszunahme der Proben messbar. Erst nach sieben Inkubationstagen war ein gravimetrischer Masseverlust von im Mittel 1,2% nachweisbar. Nach 22 Tagen lag der mittlere Masseverlust bei 17,1% (Tab. 4).

Tab. 4: Masse der Proben im Relation zur Inkubationsdauer mit dem Prüfpilz *Antrodia vaillantii*.

Exposition in Tagen	Prozentuale Masseveränderung		
	Minimum	Mittelwert	Maximum
3	-5,8	-0,8	2,9
7	-3,0	1,2	4,4
11	-1,7	1,9	6,8
16	2,4	12,0	24,0
22	12,7	17,1	23,7

Im Rahmen der lichtmikroskopischen Charakterisierung des beginnenden Zellwandabbaus, verursacht durch *A. vaillantii*, wurden die befallenen Gewebe auf braunfäulespezifische Abbaumuster und auf den Verlust der Doppelbrechung im polarisiertem Licht untersucht.

Erste Veränderungen der Zellwand bzw. der Gewebestruktur konnten nach elf Tagen Inkubation im Frühholz der Proben lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Zellwände der weitlumigen Tracheiden wirkten „ausgedünnt“, das Zellgefüge erschien weniger gleichmäßig und einzelne Zellen waren, bedingt durch den Festigkeitsverlust im Verlauf des Zellwandabbaus, kollabiert bzw. gestaucht.

Ergänzende Untersuchungen im polarisierten Licht bestätigten diesen Eindruck. Durch den Abbau kristalliner Bereiche der Cellulose veränderte sich das Erscheinungsbild der Zellwände. Nach elf Tagen Inkubation sind erste Veränderungen der Doppelbrechung im Frühholzbereich der Proben sichtbar. Das Spätholz erscheint weiterhin hell, intensiver befallene Zonen im Frühholz hingegen dunkel bis schwarz. Nach 22 Tagen Inkubation weist das gesamte Gewebe einen deutlichen Verlust der Doppelbrechung auf.

Zur ultrastrukturellen Darstellung und Charakterisierung des sukzessiven Zellwandabbaus wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Nach drei Tagen Inkubation konnten bereits zahlreiche Hyphen in den oberflächennahen Gewebebereichen der Proben detektiert werden. Die Anzahl der Hyphen vervielfachte sich mit fortschreitender Dauer der Inkubation. Nach elf Tagen Inkubation traten erste strukturelle Veränderungen im Bereich der Kreuzungsfeld-Tüpfel zwischen dem radial verlaufenden Holzstrahlgewebe und den Längstracheiden auf. Von den Holzstrahlen ausgehend, durchwuchsen Substrathyphen die Tüpfelmembran und besiedelten tiefer liegende Bereiche des tracheidalen Grundgewebes. Nach 22 Tagen Inkubation war das gesamte Gewebe von Hyphen durchwachsen. Die meisten Hyphen befanden sich im Lumen der Zellen, nur wenige waren direkt an die Zellwand der Tracheiden angelagert. Veränderungen der Elektronendichte im frühen Stadium des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii* konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nicht nachgewiesen werden. Auch nach 22 Tagen Inkubation und einem mittleren Masseverlust von 17,1% war keine sichere Unterscheidung zwischen abgebauten bzw. modifizierten und gesunden Bereichen innerhalb der individuellen Zellwandschichten elektronenoptisch möglich (Rehbein und Koch, 2011).

Zur topochemischen Charakterisierung früher Abbaustadien wurden die befallenen Proben aufsteigender Zeitreihen sowie unbefallene Kontrollen unter Anwendung der zellulären UV-Spektroskopie untersucht. Die zwei- und dreidimensional dargestellten Flächenmessungen, mit einer Ortsauflösung von $0,25 \times 0,25 \mu\text{m}$ pro Pixel, belegen deutliche Veränderungen im Absorptionsverhalten (Wellenlänge $\lambda_{280\text{nm}}$) über den zeitlichen Verlauf des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii*. Die UV-spektroskopische Untersuchung erfolgte vornehmlich an den stärker ausgebildeten Sekundärwänden der Spätholztracheiden. Das Ziel war die Darstellung topochemischer Veränderungen aromatischer Komponenten zu Beginn und über den weiteren Verlauf des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii*. Die Kontrollproben zeigen das typische Absorptionsprofil von Spätholztracheiden (Abb. 24). Die Mittellamelle/Primärwand (ML/PW) und Zellwinkel (Zz) weisen die höchste Absorption im Bereich von $\lambda_{280 \text{ nm}} = 0,5\text{-}0,8$ auf. Die homogener absorbierenden

Sekundärwände liegen mit Werten im Bereich von $\lambda_{280\text{ nm}} = 0,2-0,3$ deutlich niedriger als die ML/PW und Zz.

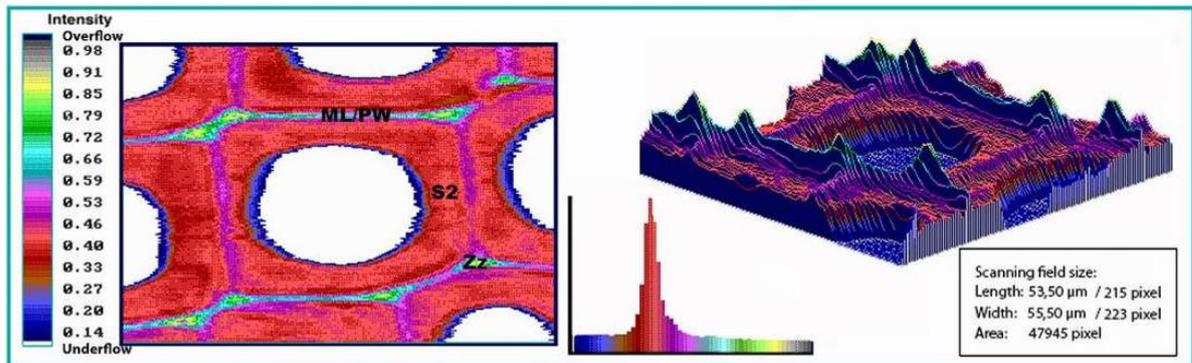


Abb. 24: Repräsentative UV-spektroskopische Darstellung einer Spätholztracheide (Kontrolle, *Pinus sylvestris*). Der Farbton der Pixel definiert die unterschiedliche Absorption des Gewebes bei $\lambda_{280\text{ nm}}$. Die höchste Absorption erfolgt im Bereich der Mittellamelle (ML/PW) und der Zellwinkel (Zz), die S2 erscheint weitestgehend homogen.

Bereits nach drei Tagen Inkubation zeigten die Querschnitte ein verändertes Absorptionsmuster gegenüber den Kontrollproben auf (Abb. 25). Das Absorptionsverhalten veränderte sich im Bereich der äußeren S2 und der S1 der Tracheiden. Es traten inhomogene, weniger intensiv absorbierende Flächen sowie lokal begrenzte, höher absorbierende Linien auf, die eine beginnende Depolymerisierung bzw. Modifikation der Lignin-Cellulose-Matrix durch wahrscheinlich niedermolekulare Agenzien aufzeigen (Rehbein und Koch, 2011). Die inneren Bereiche der S2 zeigen wenig bis keine Veränderungen im Absorptionsverhalten. Die Ergebnisse belegen die hohe Selektivität der Ligninmodifikation im Anfangsstadium des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii*.

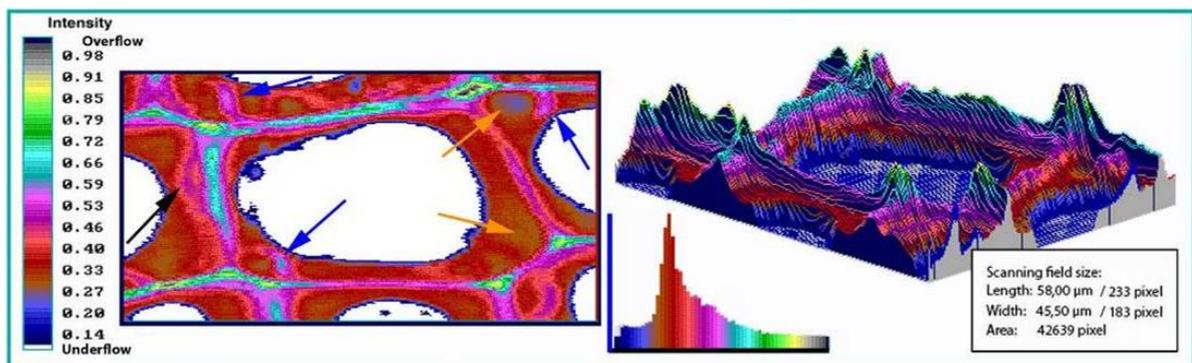


Abb. 25: UV-spektroskopische Darstellung des Gewebes (*Pinus sylvestris*) nach drei Tagen Inkubation: Der beginnende Zellwandabbau durch *Antrodia vaillantii* verändert das Absorptionsverhalten ($\lambda_{280\text{ nm}}$). Die S2 zeichnet sich durch Flächen mit verringerter Absorption [\uparrow] sowie hoch absorbierende Linien [\uparrow], die zum Teil parallel zur Mittellamelle verlaufen [\uparrow] aus.

Nach elf Tagen Inkubation ist die gesamte Sekundärwand durch den Prozess der Ligninmodifikation beeinflusst. Auffällig ist die Verlagerung der höher absorbierenden Linien von der äußeren zur inneren S2. Auch die ML/PW weist sowohl in radialer als auch in tangentialer Richtung eine beginnende Veränderung im Absorptionsverhalten auf. Elf

Tage später, nach 22 Tagen Inkubation mit einem mittleren Masseverlust von 17,1%, weist das gesamte Gewebe ein deutlich verändertes Absorptionsverhalten auf. Die radial verlaufende ML/PW verliert an UV-Intensität und zeitgleich steigt die Absorption der parallel zur ML verlaufenden Linien im Bereich der inneren S2 deutlich an. Im direkten Kontrast dazu, zeigen die inneren Bereiche der S2 und die S3 lokal begrenzte Flächen mit stark verringerter Absorption auf. Eine Erklärung für die intensive Modifikation der Lignin-Zellulose Matrix der radial orientierten Zellwände kann der morphologische Aufbau des Gewebes, genauer die bevorzugte Ausrichtung der Tüpfel in tangentialer Richtung geben. Die Tüpfelkanäle ermöglichen eine bessere Zugänglichkeit zu den inneren Zellwandschichten und somit eine Diffusion niedermolekularer Agenzien in die S2 der Tracheiden. Der lokale Verlust der Absorption zeigt eine weitere Facette des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii* im fortgeschrittenen Stadium des Befalls auf (Rehbein und Koch, 2011).

Zur chemischen Charakterisierung der Zellwandmatrix über den zeitlichen Verlauf der Modifikation durch *A. vaillantii* wurden zusätzlich UV-spektroskopische Punktmessungen der S2 mit einer Ortsauflösung von $1 \mu\text{m}^2$ im Wellenlängenbereich von 250-400 nm durchgeführt (Abb. 26). Die UV-Spektren der S2 der Kontrollproben ergaben einen für Nadelholz-Tracheiden typischen Kurvenverlauf mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{280 \text{ nm}} 0,2$. Nach drei Tagen Inkubation belegen die Messungen bereits erste Veränderungen im Absorptionsverhalten der S2. Die Absorption steigt auf ein Maximum von $\lambda_{280 \text{ nm}} 0,24$ und nach elf Tagen Inkubation auf $\lambda_{280 \text{ nm}} 0,41$. Zwischen Tag 11 und Tag 22 stagniert die Zunahme der Absorption. Neben intensiv befallenen Zellwandschichten mit $\lambda_{280 \text{ nm}} 0,43$ befanden sich nahezu intakte Bereiche mit $\lambda_{280 \text{ nm}} 0,24$.

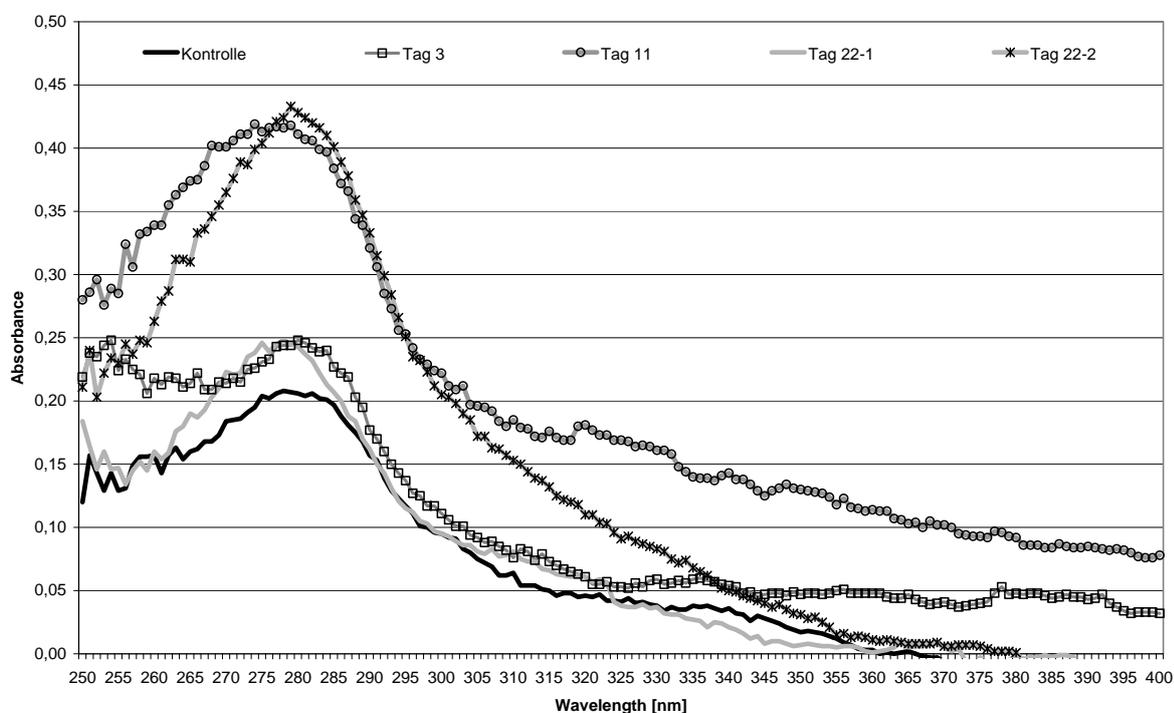


Abb. 26: UV-spektroskopische Punktmessungen (Absorptionsspektren bei 250-400 nm) intakter sowie durch *Antrodia vaillantii* abgebauter Spätholztracheiden (*Pinus sylvestris*) in Relation zur Inkubationsdauer.

Die Zunahme der Absorption über den zeitlichen Verlauf des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii* kann durch eine Depolymerisierung der Lignin-Cellulose-Matrix erklärt werden. Infolge der Modifikation des Lignin Makromoleküls durch niedermolekulare oxidativ wirkende Agenzien, entstehen hoch absorbierende Ligninderivate. Der stagnierende Verlauf der Absorption zwischen Tag 11 und 22 bestätigt die systematische Abfolge des Zellwandabbaus. Zuerst wird das Lignin Makromolekül durch niedermolekulare Agenzien modifiziert (Anstieg der Absorption). Ist die Zugänglichkeit für die wesentlich größeren Enzyme gegeben (Stagnation der Absorption), kann der Abbau der Cellulose und Hemicellulosen erfolgen. Insgesamt belegen die Spektren die Intensität sowie die Selektivität bzw. Inhomogenität des Zellwandabbaus durch *A. vaillantii*. Eine Verschiebung der Absorptionsmaxima in Richtung höherer Wellenlängen wurde nicht beobachtet.

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen zeigen grundsätzlich, dass der Zellwandabbau durch den Braunfäuleerreger *A. vaillantii* durch eine frühzeitige Modifikation des Lignin-Grundgerüsts durch niedermolekulare Agenzien erfolgt. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse müssen weitere Untersuchungen mit alternativen Pilz- und Holzartenkombinationen den Stand des Wissens erweitern und Anstöße für neue Forschungsansätze geben.

5.3 Topochemische und feinstrukturelle Untersuchungen zum Zellwandabbau durch Bakterien (Publikationen IV und VIII)

Das Wissen über den bakteriellen Holzabbau ist im Vergleich zum Holzabbau durch Pilze noch relativ begrenzt. Erste Forschungsansätze gehen auf die 40er Jahre des letzten Jahrhunderts zurück. Die frühen Arbeiten stützten sich auf die lichtmikroskopische Beschreibung der Abbaumuster. Vertiefende Erkenntnisse brachte die Anwendung der hochauflösenden Elektronenmikroskopie. Mit ihr ist es möglich, die Bakterien innerhalb der Zellwand darzustellen und detaillierte Informationen über die unterschiedlichen Abbauprozesse zu erlangen. Über die topochemischen Veränderungen innerhalb der individuellen Zellwandschichten, insbesondere beim beginnenden Zellwandabbau durch Bakterien, liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Untersuchungen zum Zellwandabbau durch Bakterien an Gründungspfählen einer Kaimauer im Hamburger Hafen

Der bakterielle Holzabbau an Gründungspfählen (*Pinus sylvestris* L.) wurde unter Anwendung der Licht- und Elektronenmikroskopie sowie der zellulären UV-Spektroskopie grundlegend charakterisiert (Rehbein et al., submitted 2011). Das Untersuchungsmaterial entstammt einem umfassenden Gutachten über Gründungspfähle einer Kaimauer aus dem Hamburger Hafen. Offizielle Angaben über die Standzeit der Pfahlgründung bestehen nicht. Generelle Informationen zur Historie des Hafens lassen ein Alter der Pfähle von mehr als 50 – 80 Jahren vermuten. Die Probenentnahme erfolgte mit einem 30 mm Kernbohrer im Bereich der unteren Tidezone. Die Bohrkerne wurden nach einer ersten lichtmikroskopischen Voruntersuchung in drei Zonen unterschiedlicher Abbaustadien mit einer Entfernung von 1,5, 6 und 7,5 cm von der Mantelfläche unterteilt. Die äußeren Proben (1,5 cm) zeigten einen massiven Abbau, die mittleren Proben (6 cm) einen inhomogenen, in der Intensität stark variierenden Abbau und die inneren Proben (7,5 cm) einen beginnenden

Abbau des Holzgewebes. Aus jedem der drei Bereiche wurden Proben für die mikroskopischen und spektroskopischen Untersuchungen entnommen und in Epoxydharz eingebettet.

Die lichtmikroskopische Untersuchung des bakteriellen Holzabbaus erfolgte anhand typischer Abbaumuster (Abb. 27 und 28). Der Fortschritt bzw. die Intensität des bakteriellen Holzabbaus lässt sich durch die differenzierte Betrachtung der inneren und äußeren Proben dokumentieren. Die inneren Proben (7,5 cm) zeigen einen beginnenden Zellwandabbau mit wenigen rhombischen oder halbmondförmigen Erosionsflächen und diamantförmigen Kavernen in den Sekundärwänden der Spätholztracheiden. Der überwiegende Anteil des Gewebes wies lichtmikroskopisch keine sichtbaren Schäden auf. Die äußeren Proben (1,5 cm) zeigen intensiv abgebaute Bereiche mit erweiterten Kavernen, großflächiger Erosion der Sekundärwand und feinen, eisblumenartig ausgebreiteten Tunneln als Befallsmerkmale (Abb. 28). Dabei ist zu erwähnen, dass bei fortgeschrittenem Befall die lichtmikroskopische Differenzierung der Befallsbilder nur noch begrenzt möglich war.

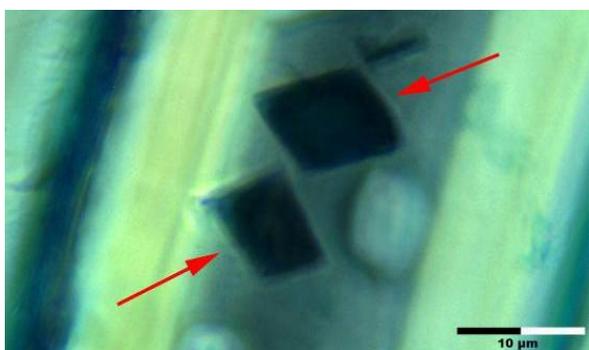


Abb. 27: Innere Probe im polarisierten Licht. Die erodierten, rhombenförmigen Flächen [↑] „verschmelzen“ bei fortschreitendem Bakterienbefall zu großflächig erodierten Bereichen (siehe dazu Abb. 28).

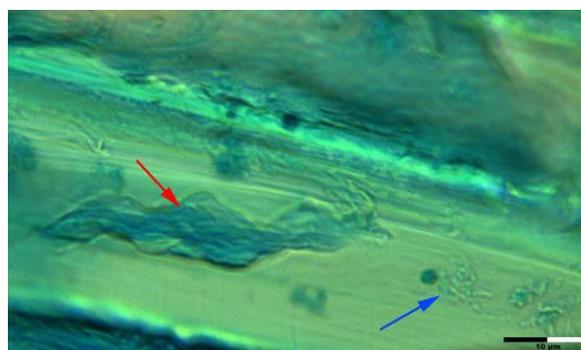


Abb. 28: Äußere Probe: Fortgeschrittener Zellwandabbau durch Bakterien; „verschmolzene“ erodierten Flächen [↑] und beginnender Abbau mit feinen, eisblumenartig ausgebildeten Tunneln [↑].

Die Untersuchungen der mittleren Proben (6 cm) belegen, dass der bakterielle Holzabbau nicht gleichmäßig von der Mantelfläche zum Zentrum der Pfähle erfolgte. Direkt neben lokal begrenzten Zellwandbereichen mit fortgeschrittenem Abbaubild befinden sich optisch intakt wirkende Zellen. Ergänzende Untersuchungen im polarisierten Licht bestätigten die lichtmikroskopischen Ergebnisse. Durch den fortgeschrittenen Zellwandabbau, genauer den Abbau kristalliner Bereiche der Cellulose, verändert sich das Erscheinungsbild des Gewebes. Kavernen und Erosionsflächen sind als dunkle Bereiche innerhalb der S2 deutlich zu erkennen. Die Untersuchung der inneren Proben (7,5 cm, Abb. 27) zeigt einen beginnenden Zellwandabbau im Spätholz, der durch lokale Veränderungen der Doppelbrechung und Kavernen in der S2 geprägt ist. Die Zellwandschichten des Frühholzes der Proben erscheinen intakt. Ein nahezu vollständiger Verlust der Doppelbrechung konnte bei den intensiv abgebauten Zellwänden der äußeren Proben (1,5 cm) im Früh- und Spätholz festgestellt werden. Abgebaut wurden die kristallinen Bereiche der Cellulose der Längstracheiden und Holzstrahl-Parenchymzellen, lediglich die Holzstrahl-Tracheiden erschienen intakt. Insgesamt zeigt die Polarisationsmikroskopie eine Selektivität des

bakteriellen Holzabbaus ähnlich einem Befall durch Moderfäulepilze auf (Rehbein und Koch, submitted 2011).

Die feinstrukturellen Veränderungen innerhalb der individuellen Zellwandschichten wurden transmissions-elektronenmikroskopisch (TEM) untersucht. Die hochauflösende Technik ermöglicht eine bessere Differenzierung zwischen den bakteriellen Abbaumustern als die Lichtmikroskopie und eignet sich besonders zur Darstellung und Lokalisierung der Bakterien innerhalb des Gewebes. Die inneren Proben (7,5 cm) zeigen auf feinstruktureller Ebene den Beginn des bakteriellen Zellwandabbaus, genauer der Zellwanderosion der S3 und S2 der Spätholztracheiden. Es wird angenommen, dass die Besiedlung der S2 auch von den Tüpfelkanälen aus erfolgt, dies konnte aber im Verlauf der TEM Untersuchung nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Abgebaute Zellwandbereiche zeichnen sich im frühen Befallsstadium durch eine granuläre, weniger dicht erscheinende Struktur im Bereich der S2 und eine dichter erscheinende Struktur der erodierten S3 aus. Der Fortschritt des bakteriellen Zellwandabbaus zeigt sich deutlich an den mittleren Proben (6 cm). Das Holzgewebe weist intakte Zellen parallel zu geringfügig bis stark abgebauten Zellwandbereichen auf. Die TEM Untersuchung zeigt, dass eine Besiedlung der Zellwand vom Lumen der Tracheiden aus erfolgt. Die Bakterien haften von einer Schleimschicht umgeben an der S3 (Abb. 35). Im weiteren Verlauf erodieren bzw. durchdringen die Bakterien die S3 und bauen bevorzugt die dickwandige S2 ab (Abb. 29). Der Abbau zeichnet sich durch ein flächiges oder tunnelförmiges Befallsbild mit einer unterschiedlich dicht erscheinenden granulären Struktur innerhalb der Tunnel bzw. erodierter Bereiche aus.

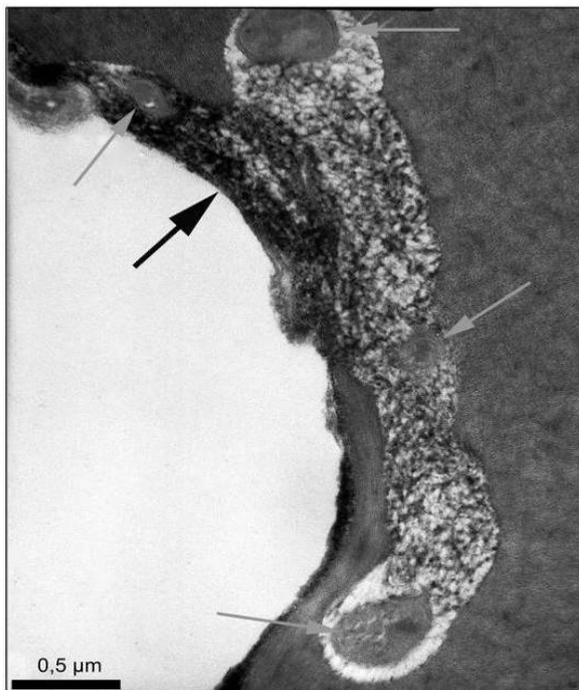


Abb. 29: TEM-Aufnahme der mittleren Probe: Die Bakterien [↑] erodieren bzw. durchdringen die S3 [↑] und bauen die S2 in einem tunnelförmigen Abbaumuster ab. Die Tunnel sind geprägt durch ein granuläres Material, sie weisen jedoch keine deutlichen Querwände auf.

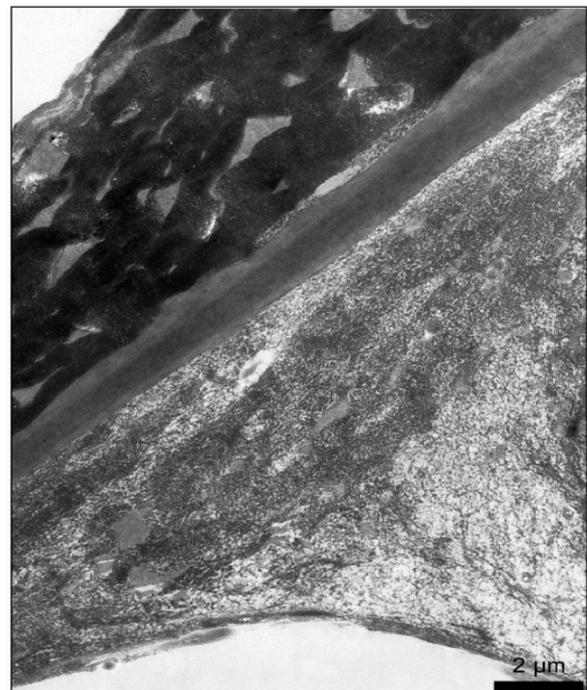


Abb. 30: TEM-Aufnahme der äußeren Probe: Die S2 ist durch Bakterien großflächig abgebaut und weist eine in ihrer Dichte variierende granuläre Struktur auf. Die ML/PW und S1 erscheinen weitestgehend intakt.

Die Untersuchung der äußeren Proben (1,5 cm) belegen die Intensität und die Selektivität des bakteriellen Zellwandabbaus der Gründungspfähle. Die inneren Zellwandschichten (S2/S3) sind über den gesamten Probenquerschnitt befallen und großflächig abgebaut. Sie weisen die bereits beschriebene, in ihrer Dichte variierende granuläre Struktur, auf. Die S1 ist durch wenige lokal erodierte Bereiche geprägt, erscheint aber weitestgehend intakt (Abb. 30). Ohne jeglichen mikroskopisch nachzuweisenden Abbau stellen sich die äußeren Zellwandschichten (ML/PW und Zz), bedingt durch den höheren Grad der Lignifizierung, elektronenoptisch dar. Die unter Anwendung der Polarisationsmikroskopie beobachtete Resistenz der Holzstrahltracheiden gegenüber einem bakteriellen Zellwandabbau kann durch die TEM-Untersuchung bestätigt werden. Auch in final abgebauten Gewebebereichen ist kein Zellwandabbau an den Holzstrahltracheiden ersichtlich (Rehbein und Koch, submitted 2011).

Die beschriebenen Befallsbilder weisen strukturelle Merkmale auf, die sowohl einem Befall durch *Tunneling*- als auch durch *Erosion*-Bakterien zuzuordnen sind. Der flächige Abbau, die granuläre Struktur sowie der selektive Abbau der äußeren Zellwandschichten zeigen die typischen Merkmale eines Befalls durch *Erosion*-Bakterien auf. Die Ausbildung von Tunneln mit mehr oder weniger deutlichen Querwänden hingegen entspricht dem Befallsbild der *Tunneling*-Bakterien. Eine örtlich begrenzte oder zeitliche Differenzierung der Befallsbilder über den Verlauf des bakteriellen Zellwandabbaus war nicht möglich.

Zur topochemischen Darstellung der Zellwandmodifikation und zur chemischen Charakterisierung der granulären Struktur abgebauter Zellwandbereiche wurden die Proben UV-spektroskopisch untersucht. Die zwei- und dreidimensional dargestellten Flächenmessungen mit einer Ortsauflösung von $0,25 \times 0,25 \mu\text{m}$ pro Pixel zeigen deutliche Veränderungen im Absorptionsverhalten (Wellenlänge $\lambda_{280\text{nm}}$) der Proben über den zeitlichen Verlauf des Zellwandabbaus durch Bakterien auf (Abb. 31). Erste Veränderungen im Absorptionsverhalten der inneren Proben (7,5 cm) sind im Bereich der Hoftüpfel und der tangential ausgerichteten Tüpfelkanäle zu beobachten (Abb. 31B).

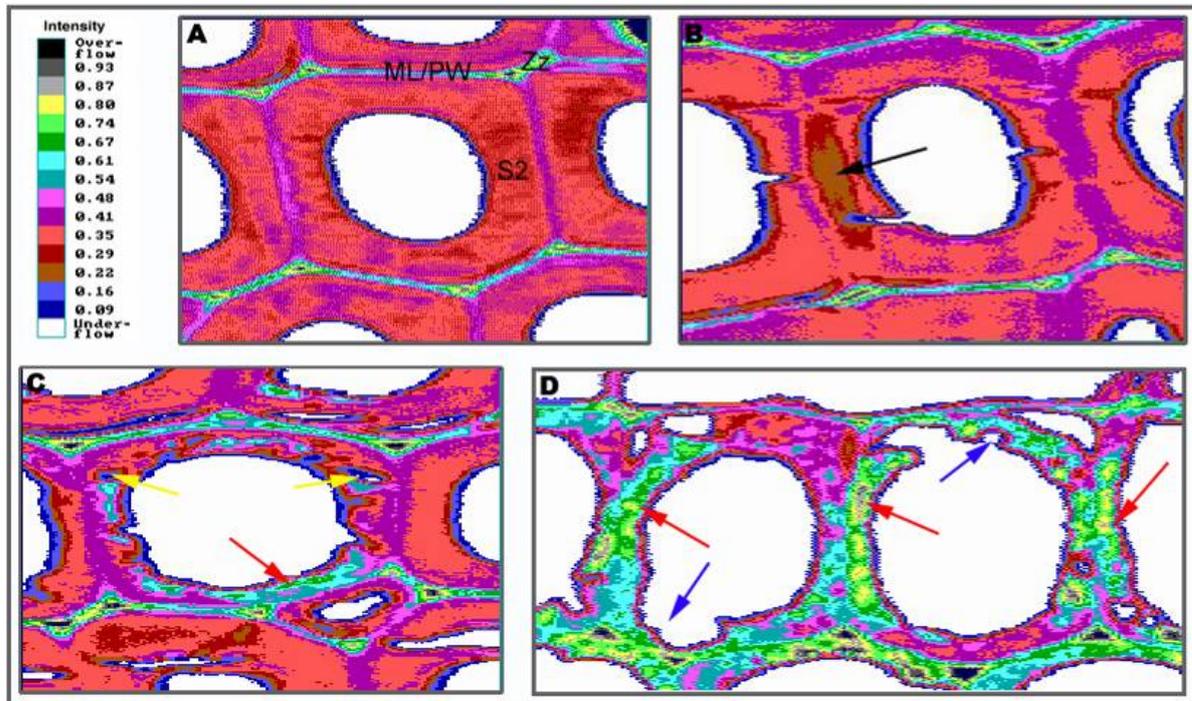


Abb. 31: UV-spektroskopische Darstellung des fortschreitenden bakteriellen Zellwandabbaus einer Pfahlgründung (*Pinus sylvestris*). A: Kontrolle; repräsentative topochemische Darstellung einer intakten Spätholztracheide. Der Farbton der Pixel definiert die unterschiedliche Absorption des Gewebes bei $\lambda_{280\text{nm}}$. Die höchste Absorption erfolgt im Bereich der Mittellamelle (ML/PW) und der Zellwinkel (ZZ), die S2 erscheint weitestgehend homogen. B: Innere Probe; der beginnende bakterielle Zellwandabbau wird im Bereich der Tüpfel durch eine Abnahme der Absorption deutlich [↑]. C: Mittlere Probe; die S2 ist geprägt durch intensiv [↑] sowie schwach [↑] absorbierende Flächen. D: Äußere Probe; hoch absorbierende Flächen im Bereich der S2 [↑] sowie vollständig erodierte Bereiche [↑] liegen eng nebeneinander.

Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die initiale Besiedlung des Gewebes von den Tüpfelkanälen aus erfolgt. Die UV-Profile der mittleren Proben (6 cm) zeigen ein heterogenes Absorptionsverhalten. Die S2 der befallenen Zellen ist durch Flächen mit verringerter sowie deutlich erhöhter Absorption gekennzeichnet (Abb. 31C). Die erhöhte Absorption ist auf das Vorkommen modifizierter, hochkondensierter aromatischer Verbindungen des Lignins oder auf Ligninderivate mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{280\text{nm}}$ (siehe spektroskopische Punktmessungen) zurückzuführen. Zellwandbereiche mit verringerter Absorption sind durch lokal begrenzte, flächig bzw. trichterförmig erodierte Felder mit einer geringeren Konzentration UV-aktiver Ligninderivate geprägt. Das Absorptionsverhalten der äußeren Proben (1,5 cm) insbesondere der S2 der Tracheiden hat sich durch den bakteriellen Zellwandabbau am deutlichsten verändert. Parallel zur radial verlaufenden Mittellamelle treten vermehrt hochabsorbierende Flächen oder Linien innerhalb der S2 auf. Zellwandbereiche mit verringerter Absorption fehlen oder sind selten. Im direkten Kontrast zu den hochabsorbierenden Flächen weist die S2 erodierte Bereiche auf, in denen keine Zellwandrückstände oder UV-aktive Ligninderivate nachzuweisen sind (Abb. 31D). Für die tangential verlaufende Mittellamelle und die Zellwinkel wurden keine Veränderungen im Absorptionsverhalten beobachtet. Der bevorzugte Abbau der Radialwände kann morphologisch durch das vermehrte Vorkommen von tangential verlaufenden Tüpfelkanälen erklärt werden. Die Ergebnisse der UV-spektroskopischen

Flächenmessungen bestätigen die TEM Ergebnisse und belegen darüber hinaus eine mehr oder weniger intensive topochemische Veränderung aller Zellwandschichten über den Verlauf des bakteriellen Zellwandabbaus (Rehbein und Koch, submitted 2011).

Zur chemischen Charakterisierung der bakteriell modifizierten Sekundärwand sowie der Abbauprodukte innerhalb der S2 wurden zusätzlich UV-spektroskopische Punktmessungen mit einer Ortsauflösung von $1,4 \mu\text{m}^2$ im Wellenlängenbereich von 240-400 nm durchgeführt (Abb. 32). Die Spektren zeigen eine direkte Relation zwischen der Absorption und der Intensität des bakteriellen Zellwandabbaus. Intakte Sekundärwandbereiche der inneren Proben (7,5 cm) weisen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{280 \text{ nm}}$ von im Mittel 0,3 auf. Ein leichter Anstieg der Absorption konnte für die mittleren Proben (6 cm) bei $\lambda_{280 \text{ nm}}$ von im Mittel 0,32 gemessen werden. Die intensiv abgebauten Sekundärwände der äußeren Proben (1,5 cm, es wurden nur Bereiche mit noch vorhandenen Zellwandfragmenten gemessen) sind charakterisiert durch einen intensiven Anstieg der Absorption bei $\lambda_{280 \text{ nm}}$ auf im Mittel 0,42. Bei keiner Messung wurde eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung höherer Wellenlängen festgestellt. Die Charakteristik der ermittelten Spektren bestätigt die Annahme, dass die bakteriellen Abbauprodukte aus biochemisch modifiziertem und unmodifiziertem Lignin bestehen, und dass der Anstieg der Absorption durch eine Depolymerisierung der Lignin-Cellulose-Matrix verursacht wird.

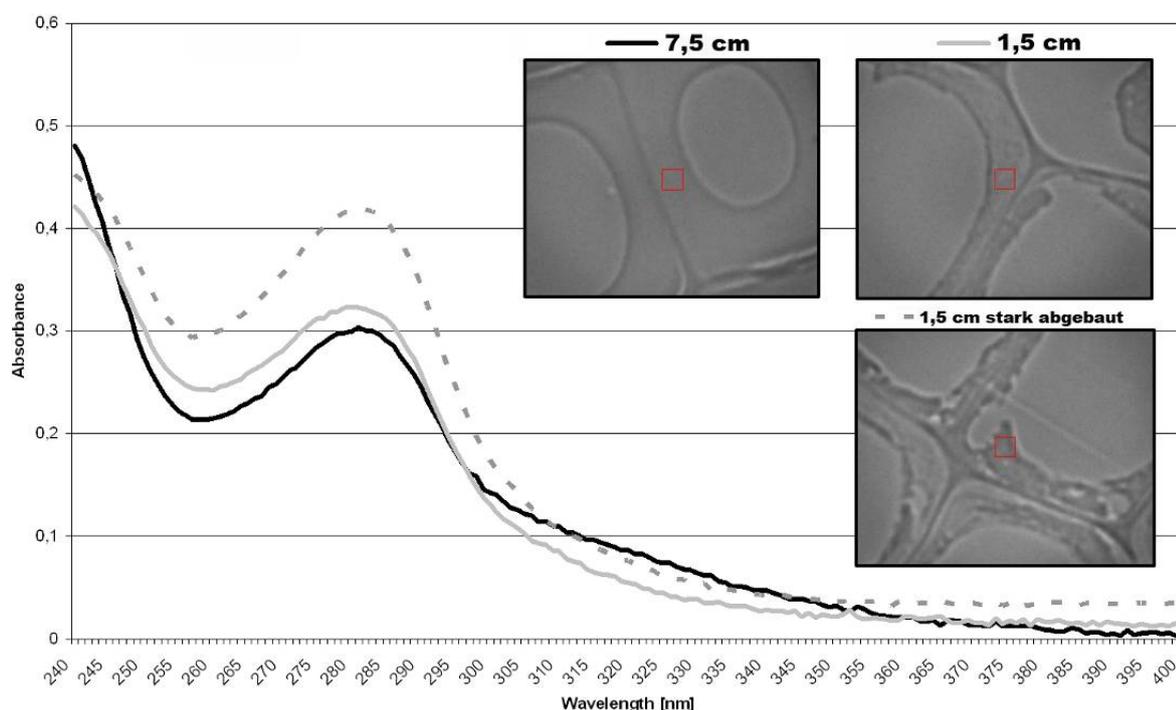


Abb. 32: UV-spektroskopische Punktmessungen (Absorptionsspektren bei 240-400 nm) intakter sowie bakteriell abgebauter Spätholztracheiden (*Pinus sylvestris*) in Relation zur Befallsintensität und zur Position im Gründungspfahl (s. Messfelder in den Abbildungen).

Untersuchungen zum bakteriellen Holzabbau an kulturhistorischen Objekten (Sarg der Moorleiche Frau von Peiting)

Am 23 Juli 1957 wurde beim Abbau des Moores Schwarzer Laich, zwischen Peiting und Hohenpeißenberg in Oberbayern, ein hölzerner Sarg mit der gut konservierten Leiche einer Frau gefunden (Rehbein et al., 2009; Abb. 17). Die Konservierung und Aufbewahrung erfolgte im Textilmuseum Neumünster. Es wurden erste wissenschaftliche Untersuchungen in Neumünster und - durch das Versenden diverser Körperteile - an internationalen Institutionen durchgeführt. Nur wenig ist heute über den Verbleib der Proben und die Ergebnisse der Untersuchungen bekannt. Im Jahr 2007 ergab sich für das Johann Heinrich von Thünen-Institut die Möglichkeit, weiterführende Untersuchungen am Sarg der Moorleiche, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, durchzuführen.

Zur holzbiologischen Charakterisierung wurden ein Holzspan aus der Seitenwand sowie ein Holzdübel des Sarges zur Verfügung gestellt (Abb. 33). Die Untersuchungen umfassten die anatomische Holzartenbestimmung, eine dendrochronologische Altersbestimmung sowie mikrobiologische und elementanalytische Untersuchungen der Holzgewebe.



Abb. 33: Untersuchungsmaterial: Holzspan aus der Seitenwand (siehe Detailaufnahme) und Holzdübel vom Sarg der Moorleiche „Frau von Peiting“

Für die anatomische Holzartenbestimmung wurden Mikrotomschnitte (Schichtdicke 10-15 µm) vom Holz der Seitenwand und des Dübels in den drei holzatomischen Richtungen hergestellt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Holzartenbestimmung ergab für das Seitenbrett eine vollständige Übereinstimmung mit dem Holz der botanischen Art Fichte (*Picea abies*) und für den Dübel eine Übereinstimmung mit der Holzart Esche (*Fraxinus excelsior*). Die Ergebnisse widerlegen frühere Untersuchungen, in denen der Korpus des Sarges aus dem Holz der Kiefer (*Pinus sylvestris*) beschrieben wurde.

Für eine mögliche dendrochronologische Datierung des Sarges wurden die Jahrringe der verarbeiteten Fichtenbretter ausgezählt. Dendrochronologische Untersuchungen können verlässlich an einigen Laub- und Nadelbäumen durchgeführt werden, die aufgrund ihrer Strukturmerkmale einem Jahreszuwachs entsprechende Zuwachszonen ausbilden. Die für den Korpus des Sarges verarbeitete Fichte eignet sich prinzipiell für die dendrochronologische Untersuchung. Voraussetzung ist jedoch, dass das zu untersuchende

Objekt mindestens 50 Jahrringe auf einem durchgehenden Querschnitt aufweist. Die Anzahl der Jahrringe der Korpusbretter liegt bei < 35 , so dass eine verlässliche Altersbestimmung des Holzes nicht möglich war. Eine Datierung des Sarges aus dem Jahr 1965 (^{14}C -Isotopen-Methode) ergab ein Ergebnis von 1110 ± 80 Jahre, welches nach aktueller Kalibrierung einer Zeitstellung von 840 ± 80 BP entspricht (1087-1247 nach Christus). Eine Altersbestimmung der Leiche aus dem Jahr 2007 (^{14}C -Isotopen-Methode) ergab 552 ± 44 B.P. Mit 95,4%iger Wahrscheinlichkeit ist die Leiche der „Frau von Peiting“ somit einer Zeit zwischen 1290-1370 oder 1380-1440 nach Christus zuzuordnen (Haas-Gebhard und Püschel, 2009). Der Widerspruch zwischen den beiden Ergebnissen kann zurzeit nicht erklärt werden und muss über eine erneute Datierung des Holzсарges erfolgen, deren Ergebnis nach Wissensstand des Autors derzeit noch aussteht.

Die mikrobiologische Charakterisierung der Holzproben erfolgte lichtmikroskopisch an Hand- und Mikrotomschnitten ($10\text{-}15\ \mu\text{m}$) sowie zur feinstrukturellen Charakterisierung unter Anwendung der Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie (REM/TEM). Das Holzgewebe der Fichte (Seitenbrett), deren natürliche Dauerhaftigkeit nach DIN EN 350-2:1994 als „wenig dauerhaft“ (Klasse 4) eingestuft wird, weist einen außergewöhnlich guten Erhaltungszustand auf. Lichtmikroskopisch lassen sich im Randbereich der Probe (Moorseite) abgebaute Zellwände erkennen. Die befallenen Bereiche breiten sich von den Holzstrahlen ausgehend über die Kreuzungsfeldtüpfel in das benachbarte Grundgewebe aus. Ergänzende polarisationsmikroskopische Untersuchungen lassen einen vom Lumen ausgehenden Abbau der Sekundärwände und einen geringfügigen Verlust der Doppelbrechung am Randbereich der Probe erkennen. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung bestätigen den z.T. sehr guten Erhaltungszustand des Fichtenholzes (Abb. 34). Befallene Zellen weisen eine Erosion der S3 und S2 sowie einzelne Kavernen im Bereich der S2 auf. Verursacht wurde der Holzabbau durch Bakterien, die zum Teil noch in bzw. auf den Sekundärwänden der Tracheiden nachzuweisen sind (Abb. 35). Über den bakteriell bedingten Zellwandabbau hinaus weist das Holz des Seitenbrettes einzelne, durch Moderfäulepilze verursachte Kavernen in der S2 der Tracheiden auf.

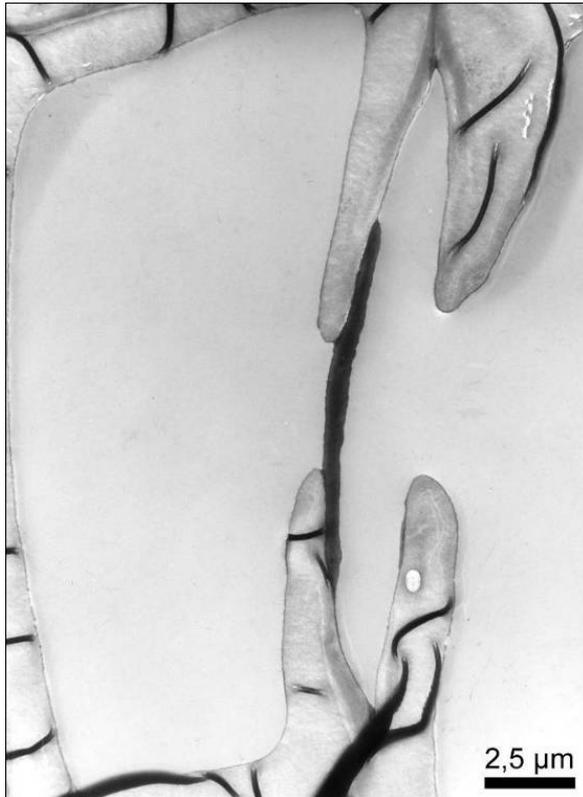


Abb. 34: Seitenwand (TEM-Aufnahme, *Picea abies*): Intakter Tüpfel mit aufgelagerter und deutlich verdickter Tüpfelmembran.

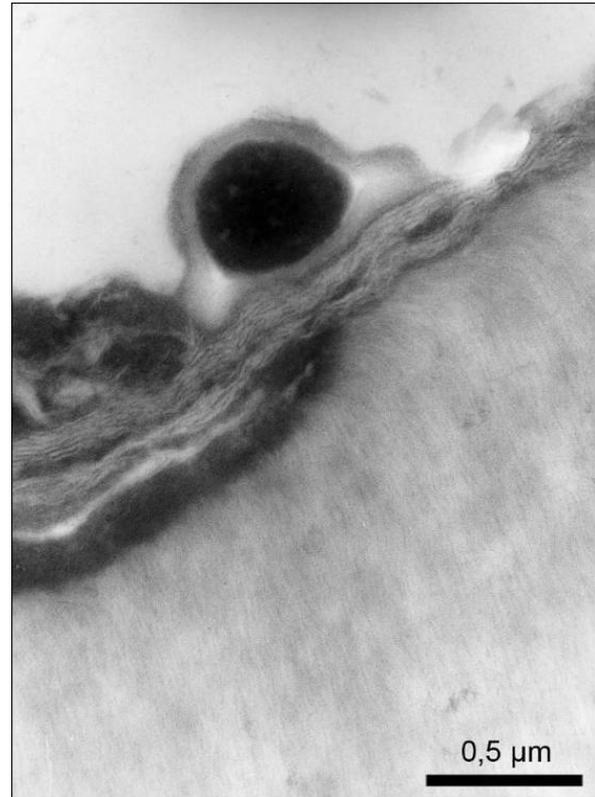


Abb. 35: Seitenwand (TEM-Aufnahme, *Picea abies*): Detailansicht der S3 / S2 mit anhaftendem, von einer Schleimschicht umgebenen Bakterium.

Das Holz der Esche ist entsprechend DIN EN 350-2:1994 in die Dauerhaftigkeitsklasse 5 „nicht dauerhaft“ eingestuft und weist somit im Vergleich zur Fichte (DHK 4) eine geringere Resistenz gegenüber holzabbauenden Pilzen auf. Lichtmikroskopische Untersuchungen bestätigen einen intensiveren Abbau der Sekundärwände insbesondere im Frühholz der Probe. Die polarisationsmikroskopische Untersuchung lässt einen deutlichen Verlust der Doppelbrechung lichtmikroskopisch intakt erscheinender Fasern erkennen. In Kombination mit einem spröden, kurzfasrigen Bruchbild weisen diese Strukturen auf einen Holzabbau durch Braunfäulepilze hin. Eine sichere Diagnose konnte durch das Fehlen von Substrathyphen nicht erfolgen. Die TEM Untersuchung lässt einen z.T. intensiven Abbau der Sekundärwandschichten, verursacht durch holzabbauende Bakterien, erkennen (Abb. 36). Die S1 und die PW/ML erscheinen größtenteils intakt bzw. ein Abbau dieser Zellwandschichten wurde nicht beobachtet (Abb. 37). Der Bakterienbefall wird als Hauptverursacher des Zellwandabbaus angesehen. Ein Befall durch Braunfäulepilze kann aufgrund der beschriebenen Merkmale jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es ist anzunehmen, dass dieser Befall bereits vor dem Versenken des Sarges im Moor am gelagerten Holz aufgetreten und im sauren und sauerstoffarmen Milieu abgestorben ist (Rehbein et al. 2009).

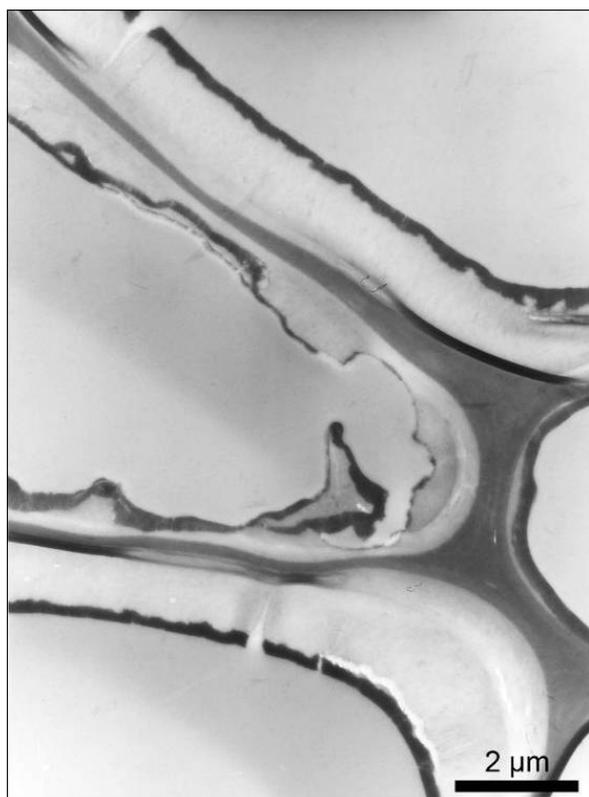


Abb. 36: Dübel (TEM-Aufnahme, *Fraxinus excelsior*): Der Abbau der Sekundärwände erfolgte vom Lumen ausgehend. Auffällig sind die unterschiedlichen Abbaustadien benachbarter Zellen.



Abb. 37: Dübel (TEM-Aufnahme, *Fraxinus excelsior*): Fortgeschrittener Abbau; in den Resten der Sekundärwand befinden sich Bakterien, die S1 und die Primärwand/Mittellamelle werden nicht abgebaut bzw. erscheinen intakt.

Die elementanalytische Untersuchung (ICP-OES) der beiden Holzproben (Fichte / Esche) ermöglicht eine qualitative und quantitative Charakterisierung anorganischer Verbindungen im Holzgewebe. Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf die Umgebungsbedingungen im Moor und die Konservierung des Sarges zu. Die Elementanalyse belegt für beide Proben einen signifikanten Anstieg der Aluminium- und Eisenkonzentration. Die Elemente werden im Umfeld des Sarges, bedingt durch den sauren Boden-pH-Wert (pH 3,3) im Moor freigesetzt und in das Holzgewebe aufgenommen. Die ebenfalls bei beiden Proben messbare signifikante Zunahme der Schwermetalle Zink, Kupfer und Chrom (dienen u. a. der Fixierung) wird auf die Behandlung des Holzes mit Konservierungsmitteln zurückgeführt.

5.4 Topochemische Untersuchungen zum Vergleich des mikrobiellen und chemischen Zellwandabbaus (Publikation II)

Neben der natürlichen, für Pilze und Bakterien lebensnotwendigen Zersetzung des Holzes erfolgten in dieser Arbeit Untersuchungen über die selektive industrielle Delignifizierung verholzter Gewebe. Die Möglichkeit, selektiv Bestandteile der Zellwand zielgerichtet zu entfernen steht, insbesondere im Fokus der Zellstoffindustrie. Gelingt es – möglichst schonend – das Lignin aus der Mittellamelle zu entfernen, kann eine energetisch effiziente Separierung intakter Fasern erfolgen. Die Selektivität ebenso wie die Effektivität der Kochung hängen dabei von der verwendeten Holzart sowie vom Aufschlussverfahren, insbesondere dem pH-Wert, ab (Rehbein et al., 2010). Der Verlauf der Delignifizierung der

Holzart *Eucalyptus globulus* (Herkunft Chile) durch ein spezielles Neutral Sulfit Semi-Chemical Verfahren (NSSC) ohne alkalischen Puffer wurde chemisch und topochemisch untersucht. Die Kochung der Hackschnitzel erfolgte bei 170°C und wurde zur zeitabhängigen Darstellung der Delignifizierung nach der Aufheizphase sowie nach 20, 45, und 180 Minuten Kochzeit unterbrochen. Für jede Abbruchstufe wurde der Abbau der Kohlenhydrate, der Lignin Gehalt und der Sulfonierungsgrad der Proben ermittelt. Es wurde festgestellt, dass sich ein Abfall des pH-Werts unter 6,0 negativ auf die Ausbeute und den Weißgrad des Zellstoffs auswirkt. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Festigkeitseigenschaften des Zellstoffes im Wesentlichen vom Delignifizierungsgrad, d.h. dem Sulfonierungsgrad des Lignins im Verlauf der Kochung abhängen. Insgesamt konnten Faserstoffe mit Ausbeuten zwischen 72 und 85% und ausgezeichneten physikalischen Eigenschaften hergestellt werden. Weiterführende Informationen über die Kochung der Hackschnitzel und die anschließende chemische Analyse der Proben sind der Dissertationsschrift von Dr. Miguel Pereira (2008) zu entnehmen. Die Ergebnisse der chemischen Analysen bestätigen die generelle Eignung von *E. globulus* für das NSSC Verfahren, geben aber nur einen begrenzten, indirekten Aufschluss über die Selektivität der Kochlösung innerhalb des Holzgewebes und einzelner Zellwandschichten. Um weiterführende, feinstrukturelle bzw. topochemische Informationen über den Verlauf des Kochprozesses zu erhalten, wurden die Proben lichtmikroskopisch und UV-spektroskopisch untersucht. Eine Veränderung der Gewebestruktur über den Verlauf des NSSC-Aufschlusses ist lichtmikroskopisch ersichtlich. Die Sekundärwände beginnen zu quellen und der Zusammenhalt der Zellen im Bereich der Mittellamelle/Primärwand erscheint geschwächt. Nach einer Kochzeit von 270 min wirken die meisten Fasern separiert und das Gewebe verliert stark an Zusammenhalt. Die zwei- und dreidimensional dargestellten UV-spektroskopischen Flächenmessungen mit einer Ortsauflösung von 0,25 x 0,25 µm pro Pixel belegen deutliche Veränderungen im Absorptionsverhalten (Wellenlänge $\lambda_{278\text{nm}}$) der Fasern über den zeitlichen Verlauf der Kochung (Abb. 38 und 39).

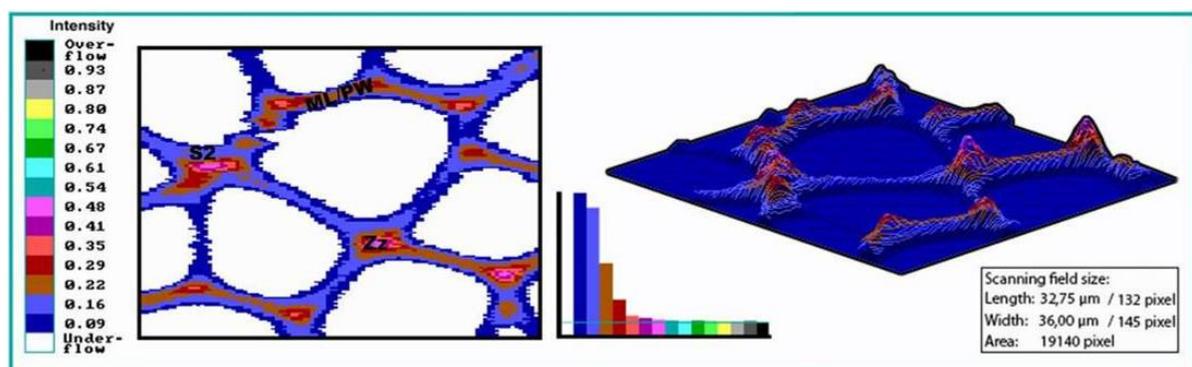


Abb. 38: Repräsentative UV-spektroskopische Darstellung des Fasergrundgewebes (Kontrolle, *Eucalyptus globulus*). Der Farbton der Pixel definiert die unterschiedliche Absorption des Gewebes bei $\lambda_{278\text{ nm}}$. Die höchste Absorption erfolgt im Bereich der Mittellamelle (ML/PW) und der Zellwikel (Zz), die S2 erscheint weitestgehend homogen.

Erste Veränderungen im Absorptionsverhalten sind bereits nach der Aufheizphase (90 min) topochemisch nachweisbar. Die Absorption nimmt insbesondere im Bereich der Zellwikel ab, wohingegen die S2 gequollen, aber in ihrer Absorption kaum verändert erscheint. Nach

110 min (90 min Aufheizphase und 20 min Kochzeit bei 170°C) nimmt die Absorption aller Zellwandschichten ab, wobei die intensivsten Veränderungen im Bereich der Mittellamelle/Primärwand und Zellzwickel auftreten. Diese Ergebnisse werden nach 135 min Kochung (90 min Aufheizphase und 45 min Kochzeit bei 170°C) verstärkt. Die Proben weisen eine fortschreitende, wenn auch weniger intensiv ausgeprägte Abnahme der Absorption aller Zellwandschichten auf, wobei die stärkste Veränderung noch immer im Bereich der Mittellamelle/Primärwand nachzuweisen ist. Nach insgesamt 270 min Kochung (90 min Aufheizphase und 180 min Kochzeit bei 170°C) ist das Absorptionsverhalten des gesamten Gewebes durch die Aufschlusschemikalien vollständig verändert. Die Absorption der Sekundärwand und Mittellamelle/Primärwand unterschreitet den kalibrierten Mindestwert von $\lambda_{278\text{nm}}$ 0,08, lediglich die hoch lignifizierten Zellzwickel können UV-spektroskopisch noch dargestellt werden (Rehbein et al., 2010; Abb. 39).

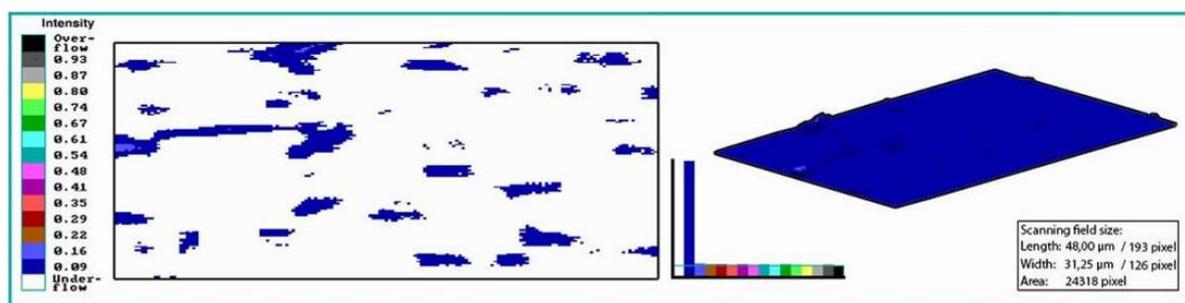


Abb. 39: UV-spektroskopische Darstellung des Absorptionsverhaltes ($\lambda_{278\text{ nm}}$) der Fasern (*Eucalyptus globulus*) nach einer Kochzeit von 270 min. Die Absorption des Gewebes unterschreitet den kalibrierten Mindestwert von $\lambda_{278\text{nm}}$ 0,08, lediglich die stark lignifizierten Zellzwickel können noch dargestellt werden.

Um die Selektivität des NSSC Verfahrens, d.h. die bevorzugte Delignifizierung der Mittellamelle/Primärwand aufzeigen zu können, wurden an ausgesuchten Proben UV Linienprofile bei $\lambda_{278\text{nm}}$ aufgenommen (Abb. 40). Die Linienprofile bestätigen zum einen die Ergebnisse der UV-spektroskopischen Flächenmessung und lassen zum anderen einen mehrstufigen, zeitabhängigen Verlauf der Delignifizierung des Gewebes erkennen. Im Verlauf der Aufheizphase wird eine selektive Abnahme der Absorption im Bereich der Mittellamelle/Primärwand deutlich, die Sekundärwände erscheinen intakt bzw. durch den Prozess der Sulfonierung leicht gequollen (Abb. 40, gelbe Linie). Nach insgesamt 110 min Kochung stagniert der selektive Ligninabbau im Bereich der Mittellamelle/Primärwand, es kommt vielmehr zu einer gleichmäßigen Abnahme der Absorption über alle Zellwandschichten (Abb. 40, grüne Linie). 25 min später, nach insgesamt 135 min Kochung ist eine geringfügige Abnahme der Absorption im Bereich der Mittellamelle/Primärwand und der S1 zu beobachten, der Abbau der S2 stagniert bzw. die Absorption verbleibt auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 40, blaue Linie). Eine letzte intensive Veränderung im Absorptionsverhalten ist nach insgesamt 270 min Kochung zu beobachten. Die Absorption der gesamten Zellwand liegt bis auf wenige Bereiche der S2 unterhalb des kalibrierten Mindestwertes (Rehbein et al., 2010; Abb. 40, braune Linie).

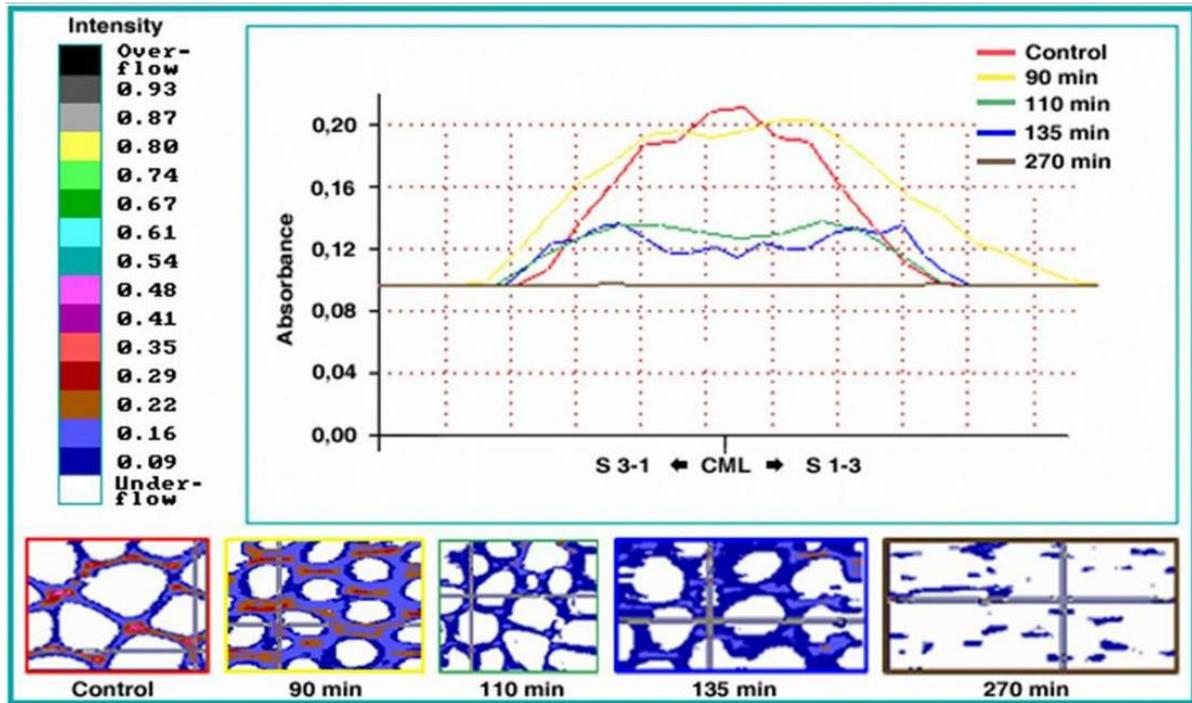


Abb. 40: Oben: Absorptionsverlauf repräsentativer Linienprofile ($\lambda_{278 \text{ nm}}$, *Eucalyptus globulus*) über den Verlauf der NSSC-Kochung. Unten: UV-Flächenspektren aufsteigender Kochstufen. Das Fadensymbol markiert den Verlauf der Linienprofile.

Die Kombination der chemischen Analysen und der UV-spektroskopischen Untersuchung ermöglicht eine zeitabhängige effektive Charakterisierung des Ligninabbaus innerhalb der individuellen Zellwandschichten. Die Ergebnisse bestätigen die Selektivität des NSSC Verfahrens insbesondere zum Beginn der Kochphase und geben wichtige Hinweise zur Optimierung der Kochparameter beim Einsatz von *E. globulus* für die Zellstoffindustrie.

6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der topochemischen und feinstrukturellen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die zelluläre UV-Spektroskopie in besonderer Weise eignet, den Holzabbau durch Pilze und Bakterien auf Zellwandniveau grundlegend zu charakterisieren. Die Ergänzung der UV-spektroskopischen Analysen mit hochauflösenden elektronenmikroskopischen Methoden ermöglichte eine detaillierte Beschreibung der mikrobiellen Besiedlungsabfolge auf Zellwandebene und eignete sich besonders zur Dokumentation struktureller Veränderungen einzelner Zellwandschichten.

Insbesondere Frühstadien einer Ligninmodifikation infolge der Infektion mit dem Braunfäuleerreger *Antrodia vaillantii*, konnten erstmalig UV-spektroskopisch nachgewiesen werden, für die keine vergleichbaren Ergebnisse in der Fachliteratur vorliegen. Es wird angenommen, dass die Ligninmodifikation durch eine Diffusion niedermolekularer, oxidativ wirkender Agenzien des Pilzes in die Sekundärwände der Tracheiden erfolgt. Die topochemischen Untersuchungen bestätigen diese Annahme durch eine signifikante Zunahme der Absorptionswerte. Infolge des mikrobiellen Zellwandabbaus durch *A. vaillantii* entstanden hoch absorbierende Ligninderivate im Bereich der äußeren S2 und der S1 der Tracheiden, die eine eindeutige Selektivität der Ligninmodifikation im Anfangsstadium des Zellwandabbaus bestätigen.

Im Rahmen der spektroskopischen Untersuchungen eines Holzabbaus durch Bakterien konnten initiale Veränderungen im Bereich der Tüpfelkanäle topochemisch nachgewiesen werden, bevor diese Veränderungen Licht- bzw. elektronenmikroskopisch sichtbar waren. Ergänzende UV-spektroskopische Punktmessungen im Wellenlängenbereich von 240-400 nm ermöglichten eine chemische Charakterisierung befallener Bereiche der Sekundärwand. Die Auswertung der UV-Spektren bestätigt die Annahme, dass die bakteriellen Abbauprodukte aus biochemisch modifizierten und unmodifizierten Ligninen bestehen, und dass der Anstieg der Absorption durch eine Depolymerisierung der Lignin-Cellulose-Matrix verursacht wird.

Die frühzeitige und selektive Modifikation des Lignins durch *Antrodia vaillantii* zeigt Parallelen zum chemischen Holzaufschluss auf. Beide Prozesse sind durch ein zielgerichtetes Einwirken niedermolekularer Agenzien innerhalb der individuellen Zellwandschichten charakterisiert. Die Selektivität der relevanten Verbindungen bestimmt dabei die Effektivität des Zellwandabbaus bzw. des chemischen Aufschlusses. Die für den Ligninaufschluss relevanten chemischen Prozesse sind für die industriellen Verfahren weitestgehend bekannt, der genaue Verlauf der frühzeitigen Lignin-Modifikation durch *A. vaillantii* hingegen bedarf zukünftig weiterer Untersuchungen. Im Detail sind die relevanten biochemischen Prozesse der Ligninmodifikation durch Braunfäulepilze noch nicht vollständig verstanden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der zellulären UV-spektroskopischen Untersuchungen die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede der dargestellten biochemischen Prozesse einer Ligninmodifikation auf. Diese Erkenntnisse erweitern das Wissen über die frühzeitigen sukzessiven Abbauprozesse auf Zellwandebene und helfen die genauen Abläufe und feinstrukturellen Veränderungen innerhalb der individuellen Zellwandschichten, insbesondere beim mikrobiellen Holzabbau, zukünftig besser zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

- Anagnost, S. E., Worrall, J. J., Wang, C. J. K. (1994) Diffuse cavity formation in soft rot of pine. *Wood Sci and Technol* 28:199-208
- Anagnost, S. E. (1998) Light microscopic diagnosis of wood decay. *IAWA J* 19:141-167
- Anagnost, S. E., Mark, R. Hanna, R. (2000) Utilization of soft-rot cavity orientation for the determination of microfibril angle. Part I. *Wood Fib Sci* 32:81-87
- v. Aufsess, H. (1972) Einige licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an rotfaulem Fichtenholz. *Forstw Centralblatt* 91:98-105
- Baldrian, P., Valášková, V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microb Rev* 32:501-521
- Bariska, M., Osuský, A., Bosshard, H. (1983) Änderung der mechanischen Eigenschaften von Holz nach Abbau durch Basidiomyceten. *Europ J Wood Wood Prod* 40:241-245
- Bauch, J., Berndt, H. (1973) Variability of the chemical composition of pit membranes in bordered pits of gymnosperms. *Wood Sci Technol* 7:6-19
- Bauch, J., Seehann, G., Fitzner, H. (1976) Microspectrophotometrical investigations on lignin of decayed wood. *Mat Org* 3:141-152
- Berndt, H., Liese, W. (1973) Untersuchungen über das Vorkommen von Bakterien in wasserberieselten Buchenholzstämmen. *Zbl Bakt Abt II* 128:579-594
- Björdal, C. G., Nilsson, T., Daniel, G. (1999) Microbial decay of waterlogged archaeological wood found in Sweden. Applicable to archaeology and conservation. *Intern Biodet Biodegr* 43:63-73
- Björdal, C. G., Daniel, G., Nilsson, T. (2000) Depth of burial, an important factor in controlling bacterial decay of waterlogged archaeological poles. *Intern Biodet Biodegr* 45:15-26
- Björdal, C. G., Nilsson, T., Bardage, S. (2005) Three-dimensional visualisation of bacterial decay in individual tracheids of *Pinus sylvestris*. *Holzforschung* 59:178-182
- Blanchette, R. A. (1984a) Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Appl Environ Microbiol* 48:647-653
- Blanchette, R. A. (1984b) Selective delignification of Eastern Hemlock by *Ganoderma tsuga*. *Phytopathologie* 74:153-160
- Blanchette, R. A. (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Phytopathology* 29:381-403
- Blanchette, R. A. (2000) A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *Intern Biodet Biodegr* 46:189-204
- Bland, D. E., Hillis, W. E. (1969) Microspectrophotometric investigations of lignin and polyphenol distribution in wood sections. *Appita* 23:204-210
- Corbett, N. H. (1965) Micro-morphological studies on the degradation of lignified cell walls by Ascomycetes and Fungi imperfecti. *J Inst Wood Sci* 14:18-29
- Courtois, H. (1963) Mikromorphologische Befallssymptome beim Holzabbau durch Moderfäulepilze. *Holzforschung und Holzverwendung* 15:88-101
- Croan, S. C. (1997) Decolorization of wood sapstain. In: Dashek, W. V. (Hrsg.) *Methods in plant biochemistry and molecular biology*. CRC Press 23-26
- Crossley, A., Levy, J. F. (1977) Proboscis hyphae in soft rot cavity formation. *J. Inst. Wood Sci* 7:30-33

- Da Costa, E. W. B., Kerruish, R. M. (1963) Laboratory evaluation of chromated metallic preservatives against soft rot fungi in beech. *Holzforschung* 17:12-18
- Da Costa, E. W. B. (1975) Natural decay resistance of wood. In: Liese, W. (Hrsg.) *Biological transformation of wood by microorganisms*. Springer
- Daniel, G., Nilsson, T., Singh, A. (1987) Degradation of lignocellulosics by unique tunnel-forming bacteria. *Can J Microb* 33:943-948
- Daniel, G., Volc, J., Nilsson, T. (1992) Soft rot and multiple T-branching by the basidiomycete *Oudemansiella mucida*. *Mycol Res* 96:49-54
- Daniel, G. (1994) Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microb Reviews* 13:199-233
- Daniel, G., Nilsson, T. (1998) Developments in the study of soft rot and bacterial decay. *For Prod Biotech* 37-62
- Dieter, M. (2009) Analysis of trade in illegally harvested timber: Accounting for trade via third party countries. *For pol econ* 8:600-607
- DIN 52183 (1977) Prüfung von Holz. Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes. Beuth
- DIN 68800-1 (Manuskript, 2011) Holzschutz – Teil 1: Allgemeines. Beuth
- DIN CEN/TS 15083-1 (2005) Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten – Bestimmung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz gegen holzzerstörende Pilze, Prüfverfahren – Teil 1: Basidiomyceten. Beuth
- DIN EN 113 (1996) Holzschutzmittel: Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzzerstörende Basidiomyceten. Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit. Beuth
- DIN EN 335-2 (2006) Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten – Definition der Gebrauchsklassen – Teil 2: Anwendung bei Vollholz. Beuth
- DIN EN 350-1 (1994) Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz; Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz. Beuth
- DIN EN 350-2 (1994) Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz - Teil 2: Leitfaden für die natürliche Dauerhaftigkeit und Tränkbarkeit von ausgewählten Holzarten von besonderer Bedeutung in Europa. Beuth
- DIN EN 13556 (2003) Nomenklatur der in Europa verwendeten Handelshölzer. Beuth
- Donaldson, L. (1992) Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata* D. Don. *IAWA Bulletin* 13:381-387
- Eaton, R. (1994) Bacterial decay of ACQ-treated wood in a water cooling tower. *Intern Biodet Biodegr* 33:197-207
- Ellwood, E. L., Ecklund, B. A. (1959) Bacterial attack of pine logs in pond storage. *For Prod J* 9:283-292
- Eslyn, W. E., Highley, T. L. (1976) Decay resistance and susceptibility of sapwood of fifteen tree species. *Phytopathologie* 66:1010-1017
- Faix, O. (2002) Grundlagen der Holzchemie, Skriptum zur Vorlesung. Universität Hamburg
- Falck, R. (1926) Über korrosive und destruktive Holzzersetzung und ihre biologische Bedeutung. *Ber Dt Chem Ges* 44:652-664
- Falck, R., Haag, W. (1927) Der Lignin- und der Zellulose-Abbau des Holzes. Zwei verschiedene Zersetzungsprozesse durch holzbewohnende Fadenpilze. *Ber Dt Chem Ges* 60:225-232

- Fergus, B. J., Procter, A. R., Scott, J. A. N., Goring, D. A. I. (1969) The distribution of lignin in sprucewood as determined by ultraviolet microscopy. *Wood Sci Technol* 3:117-138
- Fergus, B. J., Goring, D. A. I. (1970) The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung* 24:113-117
- Findlay, W., Savory, J. (1954) Moderfäule. Die Zersetzung von Holz durch niedere Pilze. *Europ J Wood Wood Prod* 12:293-296
- Flournoy, D. S., Kirk, T. K., Highley, T. (1991) Wood decay by brown-rot fungi : changes in pore structure and cell wall volume. *Holzforschung* 45:383-388
- Freystein, K., Reisser, W. (2011) Algenbesiedlungen von Fassaden – Einfluss von Pilzen auf Besiedlung, Widerstandsfähigkeit und Bekämpfung von Algenüberzügen. In: Venzmer, H. (Hrsg.) Fassadensanierung, Praxisbeispiele, Produkteigenschaften, Schutzfunktionen. Beuth
- Fukazawa, K., Imagawa, H. (1981) Quantitative analysis of lignin using an UV microscopic image analyser. Variation within one growth increment. *Wood Sci Technol* 15:45-55
- Gelbrich, J., Mai, C., Militz, H. (2008) Chemical changes in wood degraded by bacteria. *Intern Biodet Biodegr* 61:24 - 32
- Gilbertson, R. L. (1980) Wood-rotting fungi of north america. *Mycologia, Mycol Soc Am* 72:1-49
- Gindl, W., Grabner, M. (2000) Characteristics of Spruce (*Picea abies* [L.] Karst) latewood formed under abnormally low temperatures. *Holzforschung* 54:9-11
- Gindl, W. (2001) The effect of varying latewood proportion on the radial distribution of lignin content in a pine stem. *Holzforschung* 55:455-458
- Goodell, B. (2003) Brown-rot fungal degradation of wood: Our evolving view. In: Goodell, B., Nicholas, D. D., Schultz, T. P. (Hrsg.) Wood deterioration and preservation. ACS Symp Series 845
- Göbelsmann, M. (2008) Schimmelpilzbildung im Bereich der Untersicht hölzerner Dachüberstände - Ursachen und Vermeidung. *Bauphysik, WILEY-VCH* 30:75-82
- Greaves, H. (1969) Micromorphology of the bacterial attack of wood. *Wood Sci Technol* 3:150-166
- Grünwald, C., Ruel, K., Joselau, J-P., Fladung, M. (2001) Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15:503-517
- Grünwald, C., Ruel, K., Kim, Y. S., Schmitt, U. (2002a) On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biol* 4:13-21
- Grünwald, C., Ruel, K., Schmitt, U. (2002b) Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees – a study of secondary cell wall development. *Ann For Sci* 59:679-685
- Haas-Gebhard, B., Püschel, K. (2009) Die Frau aus dem Moor. Bayerische Vorgeschichtsblätter. *C.H. Beck* 74:239-268
- Harmsen, L., Nissen, T. (1965) Timber decay caused by bacteria. *Nature* 4981:319
- Haupt, M., Leithoff, H., Meier, D., Puls, J., Richter, H. G., Faix, O. (2003) Heartwood extractives and natural durability of plantation-grown teakwood (*Tectona grandis* L.) - a case study. *Europ J Wood Wood Prod* 61:473-474

- Hale, M. D. C., Eaton, R. A. (1986) Soft rot cavity widening: A kinetic approach. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biol Sci 227:217-226
- Hedley, M. (1993) Comparison of performance of wood preservatives in laboratory and field tests and in service tests of treated commodities. IRG/WP 93-20010, 22
- Hillis, W. E. (1971) Distribution, properties and formation of some wood extractives. Wood Sci Technol 5:272-289
- Hillis, W. E., Yazaki, Y., Bauch, J. (1976) The significance of anomalous extractives in heart-shakes in *Dacrydium* species. Wood Sci Technol 10:79-95
- Huckfeldt, T. (2003) Ökologie und Cytologie des Echten Hausschwammes (*Serpula lacrymans*) und anderer Hausfäulepilze. Dissertation, Universität Hamburg
- Huckfeldt, T., Schmidt, O. (2006) Hausfäule- und Bauholzpilze. Rudolf Müller
- Huckfeldt, T., Melcher, E. (2008) Moderfäule. In: Venzmer, H. (Hrsg.) Europäischer Sanierungskalender 2008. Beuth
- Huckfeldt, T., Rehbein, M. (2011) Biotische Schäden an Holz- und Fachwerkfassaden. In: Venzmer, H. (Hrsg.) Fassadensanierung. Praxisbeispiele, Produkteigenschaften, Schutzfunktionen. Beuth
- Imagawa, H., Fukuzawa, K. (1978) Influence of wood extractives on UV microscopy for lignin determination. Mokuzai Gakkaishi 24:583-586
- j&m (2011) http://www.j-m.de/wcms/upload/PDF/TIDAS_MSP_800_E.pdf
- Karnop, G. (1972) Celluloseabbau und Schadbild an einzelnen Holzkomponenten durch *Clostridium omelianskii* in wassergelagertem Nadelholz. Mat Org 7:189-203
- Karnovsky, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27:137-138
- Kim, Y. S., Singh, A. P., Nilsson, T. (1996) Bacteria as important degraders in waterlogged archaeological woods. Holzforschung 50:389-392
- Kim, Y. S., Singh, A. P. (2000) Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: A review. IAWA J 21:135-155
- Kim, G-H., Kim, J-J., Breuil, C. (2007) Sap-staining fungi from logs and boards of two commercially important pines in Korea. Holzforschung 61:333-336
- Kirk, T. K., Chang, H. (1975) Ligninabbau durch Weißfäulepilze. II: Charakterisierung von stark abgebauten Ligninen aus befallenem Fichtenholz. Holzforschung 29:56-64
- Klaassen, R. K. (2008) Bacterial decay in wooden foundation piles - Patterns and causes: A study of historical pile foundations in the Netherlands. Intern Biodet Biodegr 61:45-60
- Klaassen, R. K. (2009) Factors that influence the speed of bacterial wood degradation. 10 COST IE 0607 Hamburg
- Kleist, G., Seehann, G. (1997) Colonization patterns and topochemical aspects of sap streak in Norway spruce caused by *Stereum sanguinolentum*. Eurp J For Path 27:351-361
- Kleist, G., Schmitt, U. (1999) Evidence of accessory compounds in vessel walls of Sapelli heartwood (*Entandrophragma cylindricum*) obtained by transmission electron microscopy. Eurp J Wood Wood Prod 57:93-95
- Kleist, G., Bauch, J. (2001) Cellular UV microspectrophotometric investigation of Sapelli heartwood (*Entandrophragma cylindricum* Sprague) from natural provenances in Africa. Holzforschung 55:117-122

- Kleist, G., Schmitt, U. (2001) Characterisation of a soft rot-like decay pattern caused by *Coniophora puteana* (Schum.) Karst. in Sapelli Wood (*Entandrophragma cylindricum* Sprague). *Holzforschung* 55:573-578
- Kleist, G., Ray, M., Murphy, R. (2002) Micromorphology of decay in Keruing heartwood by the basidiomycetes *Phellinus cotiguus* and *Dacrymyces stillatus*. IRG/WP 02-10454
- Knuth, D. T., McCoy, E. (1962) Bacterial deterioration of pine logs in pond storage. *For Prod J* 12:437-442
- Koch, G., Bauch, J., Puls, J., Schwab, E., Welling, J. (2000) Holzverfärbungen der Rotbuche (*Fagus sylvatica* [L.]) und Möglichkeiten vorbeugender Maßnahmen. *Holz-Zentralblatt* 126:74-75
- Koch, G., Kleist, G. (2001) Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55:563-567
- Koch, G., Puls, J., Bauch, J. (2003). Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung* 57:339-345
- Koch, G. (2004) Topochemical characterization of lignins and phenolic extractives in wood cell walls. *Lenzinger Berichte* 83:6-12
- Koch, G., Grünwald, C. (2004) Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt, U., Anderer, P., Barnett, J. R., Emons, A. M. C., Jeronimidis, G., Saranpää, P., Stanzl-Tschegg, S., (Hrsg.) *Wood Fiber Cell Walls: Methods to study their formation, structure and properties*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala S. 119-130
- Koch, G. (2006) Übersicht: Holzarten für Fensterkanteln aus Südostasien. *Holz-Zentralblatt* 31:883
- Koch, G., Rehbein, M., Lenz, M. (2007) Natürliche Dauerhaftigkeit Sibirischer Lärche. *Holz-Zentralblatt* 22:593
- Koch, G., Rehbein, M. (2009) Hölzer für den Fensterbau. *Holztechnologie* 50:5-9
- Kühne, H., Leukens, U., Sell, J., Wälchli, O. (1970) Untersuchungen an bewitterten Holzoberflächen - Erste Mitteilung: Raster-elektronenmikroskopische Beobachtungen an Vergrauungspilzen. *Europ J Wood Wood Prod* 28:223-229
- Levy, J. F. (1967) Decay and degrade of wood by soft rot fungus and other organisms. B.W.P.A. Annual Convention
- Liese, J. (1950) Spezieller Teil A: Bakterien. In: Mahlke-Troschel-Liese (Hrsg.) *Holzkonservierung*. Springer
- Liese, W. (1955) On the decomposition of the cell wall by micro-organisms. The record of the 1955 annual convention of the british wood preserving association 1:1-4
- Liese, W. (1959) Die Moderfäule, eine neue Krankheit des Holzes. *Naturw Rund* 11:419-425
- Liese, W., Schmid, R. (1962) Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Abbau des Holzes durch Pilze. *Angew Bot* 6:291-298
- Liese, W. (1963) Neue Befunde über den Abbau des Holzes durch Pilze. *Holz-Zentralblatt* 34:505-507

- Liese, W., Ammer, U. (1964) Über den Befall von Buchenholz durch Moderfäulepilze in Abhängigkeit von der Holzfeuchtigkeit. *Holzforschung* 18:97-102
- Liese, W., Karnop, G. (1968) Über den Befall von Nadelholz durch Bakterien. *Holz Roh Werkst* 26:202-208
- Liese, W. (1970a) Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *An Rev Phytopath* 8:231-258
- Liese, W. (1970b) The action of fungi and bacteria during wood deterioration. *B.W.P.A. Annual Convention* 4:1-14
- Malaysian Grading Rules (1984/2009) Malaysian Grading Rules for Sawn Hardwood Timber. Malaysian Timber Industry Board, Ministry of Primary Industries
- Messner, K., Fackler, K., Lamaipis, P., Gindl, W., Srebotnik, E., Watanabe, W. (2003) Overview of white-rot research: Where we are today. In: Goodell, B., Nicholas, D. D., Schultz, T. P. (Hrsg.) *Wood deterioration and preservation, advances in our changing world*. ACS Symp, Series 845
- Nelson, B. C., Goni, M. A., Hedges, J. I., Blanchette, R. A. (1995) Soft-rot fungal degradation of lignin in 2700 year old archaeological woods. *Holzforschung* 49:1-10
- Nilsson, T. (1973) Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Stud for Suec* 104
- Nilsson, T. (1974) Formation of soft rot cavities in various cellulose fibres by *Humicola alopallonella* Meyers & Moore. *Stud for suec* 112
- Nilsson, T. (1984) Occurrence and importance of various types of fungal and bacterial decay in CCA-treated horticultural pine posts in New Zealand. *Intern Wood Preserv* 15:1-16
- Nilsson, T., Singh, A. P. (1984) Cavitation bacteria. *Intern Wood Preserv* 15:1-15
- Nilsson, T., Daniel, G. (1989) Chemistry and microscopy of wood decay by some higher Ascomycetes. *Holzforschung* 43:11-18
- Nilsson, T., Singh, A., Daniel, G. (1992) Ultrastructure of the attack of *Eusideroxylon zwageri* wood by tunneling bacteria. *Holzforschung* 46,361-367
- Nilsson, T., Edlund, M. (1995) Laboratory versus field tests for evaluating wood preservatives: A scientific view. *IRG/WP 95-20076*, 13
- Noldt, U. (2005) Insekten. In: Müller J. (Hrsg.) *Holzschutz im Hochbau*. Fraunhofer IRB Verlag
- Okuyama, T., Takeda, H., Yamamoto, H., Yoshida, M. (1998) Relation between growth stress and lignin concentration in the cell wall: ultraviolet microscopic spectral analysis. *J Wood Sci* 44:83-89
- v Pechmann, H., Schaile, O. (1950) Über die Änderung der dynamischen Festigkeit und der chemischen Zusammensetzung des Holzes durch den Angriff holzerstörender Pilze. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 69:441-466
- Peek, R., Liese, W. (1979) Untersuchungen über die Pilzanfälligkeit und das Tränkverhalten naßgelagerten Kiefernholzes. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 98:280-288
- Pereira, M. (2008) Herstellung von Hochausbeute- und Vollzellstoffen aus *Eucalyptus globulus* (Labill.) und *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) aus Chile mit alkalischen Sulfitlösungen. Dissertation, Universität Hamburg

- Powell, K. L., Pedley, S., Daniel, G., Corfield, M. (2001) Ultrastructural observations of microbial succession and decay of wood buried at a bronze age archaeological site. Intern Biodet Biodegr 47:165 - 173
- Procter, A. R., Yean, W. Q., Goring, D. A. I. (1967) The topochemistry of delignification in kraft sulphite pulping of spruce wood. Pulp Paper Magaz, Canada 68:445-460
- Rehbein, M. (2007) Untersuchung der natürlichen Dauerhaftigkeit und Gebrauchseigenschaften von Substitutionshölzern für konstruktive Außenanwendungen. Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Rehbein, M., Koch, G. (2007) Eignung von Massaranduba für die Außenverwendung. Holz-Zentralblatt 28:784-785
- Rehbein, M., Koch, G., Klein, P. (2009) Moorleiche „Frau von Peiting“. Holzbiologische Befunde vom Sarg. Restauro 5:320-325
- Rehbein, M., Koch, G. (2010) Wie dauerhaft ist Sibirische Lärche? Wissenschaftliche Untersuchungen am vTI in Hamburg bestätigen praktische Erfahrungen. Holz-Zentralblatt 34:847-848
- Rehbein, M., Pereira, M., Koch, G., Kordsachia, O. (2010) Topochemical investigation into the delignification of *Eucalyptus globulus* chips during semi-chemical sulfite pulping. Wood Sci Techn 44:435-449
- Rehbein, M., Koch, G., Melcher, E. (2011) Verwendungsrelevante Kennwerte der Sibirischen Lärche für Normung und Praxis. In: Johann Heinrich von Thünen-Institut, Jahresbericht 2010
- Rehbein, M., Koch, G. (2011) Topochemical investigation of early stages of lignin modification within individual cell wall layers of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sapwood infected by the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv. Intern Biodet and Biodegr 65:913-920
- Rehbein, M., Koch, G., Schmitt, U., Huckfeldt, T. (submitted 04.2011) Topochemical and transmission electron microscopic studies of bacterial decay in pine (*Pinus sylvestris* L.) harbour foundation piles. Intern Biodet and Biodegr
- Rypáček, V. (1966) Biologie holzzerstörender Pilze. G. Fischer Verlag
- Saka, S., Thomas, R. J., Gratzl, J. S. (1979) Lignin distribution in soda-oxygen and kraft fiber as determined by conventional electron microscopy. Wood Fiber 11:99-108
- Sander, C., Koch, G. (2001) Effects of acetylation and hydrothermal treatment on lignin as revealed by cellular UV spectroscopy in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). Holzforschung 55:193-198
- Sano, Y., Nakada, R. (1998) Time course of the secondary deposition of incrusting materials on bordered pit membranes in *Cryptomeria japonica*. IAWA J 19:285-299
- Savory, J. G. (1954) Breakdown of timber by ascomycetes and fungi imperfecti. An Appl Biol 41:336-347
- Scheffer, T., Morrell, J. (1998) Natural durability of wood: a worldwide checklist of species. Research Contribution, Forest Research Laboratory, Oregon State University, 22
- Schmidt, O. (1985) Occurrence of microorganisms in the wood of Norway spruce trees from polluted sites. Eur J For Pathol 15:2-10

- Schmidt, O., Bauch, J., Rademacher, P., Götsche-Kühn, H. (1986) Mikrobiologische Untersuchungen an frischem und gelagertem Holz von Bäumen aus Waldschadensgebieten und Prüfung der Pilzresistenz des frischen Holzes. *Europ J Wood Wood Prod* 44:319-325
- Schmidt, O., Wahl, G. (1987) Vorkommen von Pilzen und Bakterien im Stammholz von geschädigten Fichten nach zweijähriger Berieselung. *Europ J Wood Wood Prod* 45:441-444
- Schmidt, O., Mehringer, H. (1989) Bakterien im Stammholz von Buchen aus Waldschadensgebieten und ihre Bedeutung für Holzverfärbungen. *Europ J Wood Wood Prod* 47:285-290
- Schmidt, O. (1994) Holz- und Baumpilze. Biologie, Schäden, Schutz, Nutzen. Springer
- Schmidt, O., Liese, W. (1994) Occurrence and significance of bacteria in wood. *Holzforschung* 48:271-277
- Schmidt, O., Schmitt, U., Moreth, U., Potsch, T. (1997) Wood decay by the white-rotting Basidiomycete *Physisporinus vitreus* from a cooling tower. *Holzforschung* 51:193-200
- Schmidt, O. (2006) Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use. Springer
- Schmidt, O. (2007) Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycoprogr* 4:261-279
- Schmitt, U., Grünwald, C., Gričar, J., Koch, G., Čufar, K. (2003) Wall structure of terminal latewood tracheids of healthy and declining silver fir trees in the Dinaric region, Slovenia. *IAWA J* 24:41-51
- Schmitt, U., Melcher, E. (2004) Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. *COST Action E20 Wood Fibre Cell Wall Structure* 105-117
- Schmitt, U., Singh, A., Thieme, H., Friedrich, P. (2005) Electron microscopic characterization of cell wall degradation of the 400.000-year-old wooden Schöningen spears. *Holz Roh Werkst* 63:118-122
- Schwab, E., Richter, H.-G., Schmors, R. (1997) Zur Qualität von lamellierten Fensterkanteln aus Mischholzsortimenten. *Holz-Zentralblatt* 123:2197-2168
- Schwarze, F., Lonsdale, D., Fink, S. (1995) Soft rot and multiple T-branching by the basidiomycete *Inonotus hispidus* in ash and London plane. *Mycoprogr* 99:813-820
- Schwarze, F. W., Engels, J. (1998) Cavity formation and the exposure of peculiar structures in the secondary wall (S2) of tracheids and fibres by wood degrading basidiomycetes. *Holzforschung* 52:117-132
- Schwarze, F. W. (2007) Wood decay under the microscope. *Fungal Biol Rev* 21:133-170
- Seifert, K. (1968) Zur Systematik der Holzfäulen, ihre chemischen und physikalischen Kennzeichen. *Europ J Wood Wood Prod* 26:208-215
- Shigo, A. L. (1965) Organism interactions in decay and discoloration in beech, birch and maple. *US Forest Ser Res Pap* 43
- Singh, A., Butcher, A. (1986) Degradation of CCA-treated *Pinus Radiata* posts by erosion bacteria. *Wood Sci Techn* 10:140-144
- Singh, A. (1989) Certain aspects of bacterial degradation of *Pinus radiata* wood. *IAWA J* 10:405-415

- Singh, A., Nilsson, T., Daniel, G. (1990) Bacterial attack of *Pinus sylvestris* wood under near anaerobic conditions. *J Wood Sci* 11:237-249
- Singh, A., Butcher, A. (1991) Bacterial degradation of wood cell walls: a review of degradation patterns. *J Wood Sci* 12:143-157
- Singh, A., Hedley, M. E., Page, D. R., Han, C. S., Atisongkroh, K. (1992) Microbial degradation of CCA-treated cooling tower timbers. *IAWA J* 13:215-231
- Singh, A. (1997) Initial pit borders in *Pinus Radiata* are resistant to degradation by soft rot fungi and erosion bacteria but not tunnelling bacteria. *Holzforschung* 51:15-18
- Singh, A., Daniel, G., Nilsson, T. (2002) Ultrastructure of the S2 layer in relation to lignin distribution in *Pinus radiata* tracheids. *J Wood Sci* 48:95-98
- Skyba, O., Niemz, P., Schwarze, F. W. (2008) Degradation of thermo-hygro-mechanically (THM)-densified wood by soft-rot fungi. *Holzforschung* 62:277-283
- Spurr, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastr Res* 26:31-43
- Srebotnik, E., Messner, K. (1994) A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 60:1383-1386
- Suzuki, M. R., Hunt, C. G., Houtman, C. J., Dalebroux, Z. D., Hammel, K. E. (2006) Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. *Env microb* 8:2214-2223
- Tackmann, O., Schmidt, O., Liese, W. (2009) Geschichte der Mykologie und Holzpathologie. *Zeitschrift für Mykologie* 75:13-31
- Takabe, K., Miyauchi, S., Tsunoda, R., Fukazawa, K. (1992) Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in Japanese beech (*Fagus crenata*): variation within annual ring. *IAWA Bulletin* 13:105-112
- Trendelenburg, R., Mayer-Wegelin, H. (1955) *Das Holz als Rohstoff*. Carl Hanser Verlag
- VFF-Merkblatt HO.06-1 (2009) Holzarten für den Fensterbau –Teil 1: Eigenschaften, Holzartentabelle, Verband der Fenster- und Fassadenhersteller e. V., Frankfurt a. M.
- Vorreiter, L. (1949) *Holztechnologisches Handbuch*. Band 1: Allgemeines, Holzkunde, Holzschutz und Holzvergütung. Verlag Georg Fromme & Co.
- Weber, M., Koch, G. (2007) Garapa für den Außeneinsatz grundsätzlich geeignet. *Holz-Zentralblatt* 49:1388, 1389
- White-McDougall, W. J., Blanchette, R. A., Farrell, R. L. (1998) Biological control of blue stain fungi on *Populus tremuloides* using selected *Ophiostoma* Isolates. *Holzforschung* 52:234-240
- Whiting, P., Goring, D. A. I. (1981) The topochemistry of delignification shown by pulping middle lamella and secondary wall tissue from black wood. *J Chem Tech* 1:111-122
- Wilcox, W. (1978) Review of literature on the effects of early stages of decay on wood strength. *Wood Fib Sci* 9:252-257
- Willeitner, H. (1971) Anstrichschäden infolge Überaufnahmefähigkeit des Holzes. *Holz-Zentralblatt* 97:2291-2292
- Willeitner, H. (1981) Grundprinzip des baulichen Holzschutzes. In: Willeitner, G., Schwab, E. (Hrsg.) *Holz- Außenverwendung im Hochbau*. Verlagsanstalt A. Koch
- Willeitner, H., Peek, R. (1997) The natural durability story. *IRG/WP* 97-20119

- Wolf, F., Liese, W. (1977) Zur Bedeutung von Schimmelpilzen für die Holzqualität. Holz als Roh- und Werkstoff, 35, 53-57
- Worrall, J. J., Anagnost, S. E., Wang, C. J. K. (1991) Conditions for soft rot of wood. Can. J. Microbiol 37:869-874
- Yoshizawa, N., Sagiya, S., Yokota, S., Idei, T. (1996) Microspectrometrical analysis of ozone delignification from wood cells. Holzforschung 50:31-36
- Zink, P., Fengel, D. (1988) Studies on the colouring matter of blue-stain fungi. Part 1. General characterization and the associated compounds. Holzforschung 42:217-220
- Zink, P., Fengel, D. (1989) Studies on the colouring matter of blue-stain fungi Part 2. Electron microscopic observations of the hyphae walls. Holzforschung 43:371-374

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Querschnitt einer Fensterkante.....	4
Abb. 2: Fensterkante aus einer nicht dauerhaften Holzart	4
Abb. 3: Holzfenster (<i>Shorea</i> spp.) mit massivem Weißfäulebefall (<i>Phellinus</i> spp.).....	6
Abb. 4: Durchfeuchtete Außenwand einer Schießbahn, bewachsen mit <i>Asterostroma cervicolor</i>	6
Abb. 5: Kompostwerk, Unterkonstruktion eines Biofilters.....	6
Abb. 6: Lagerschaden: Bläue in Kombination mit Rotstreifigkeit.....	7
Abb. 7: Mikroskopische Abbildung eines Bläueschadens	7
Abb. 8: Braunfäule: Dielenbrett, abgebaut durch <i>Serpula lacrymans</i>	8
Abb. 9: Braunfäule: <i>Pinus sylvestris</i> abgebaut durch <i>Antrodia vaillantii</i>	8
Abb. 10: Weißfäule: Detailansicht einer Fensterkante (<i>Khaya</i> spp.).....	9
Abb. 11: Weißfäulekavernen im polarisierten Licht	9
Abb. 12: Moderfäule: Holz aus einem Kühlturm.....	10
Abb. 13: Moderfäulekavernen (Typ 1) im polarisierten Licht	10
Abb. 14: Fensterkante (<i>Picea abies</i>) mit lokaler Überaufnahme der Oberflächenbehandlung.....	12
Abb. 15: Detail aus Abb. 14: Die Überaufnahme der Beschichtung erfolgt im Frühholz.....	12
Abb. 16: Gründungspfahl einer Lagerhalle im Hamburger Hafen	13
Abb. 17: Moorleiche „Frau von Peiting“	13
Abb. 18: <i>Tunneling</i> -Bakterien.....	14
Abb. 19: <i>Erosion</i> -Bakterien (TEM)	14
Abb. 20: Stammabschnitt einer Sibirischen Lärche	23
Abb. 21: Sibirische Lärche, Untersuchung 2009/10: Dauerhaftigkeitsklassen	24
Abb. 22: Sibirische Lärche, Untersuchung 2009/10: Prozentualer Extraktstoffgehalt.....	25
Abb. 23: Probenentnahme (<i>Pinus sylvestris</i>) sowie Positionierung der Prüfkörper	27
Abb. 24: Repräsentative UV-spektroskopische Darstellung einer Spätholztracheide.....	29
Abb. 25: UV-spektroskopische Darstellung des Gewebes nach drei Tagen Inkubation.....	29
Abb. 26: UV-spektroskopische Punktmessungen intakter sowie abgebauter Spätholztracheiden.....	30
Abb. 27: Innere Probe im polarisierten Licht.....	32
Abb. 28: Äußere Probe: Fortgeschrittener Zellwandabbau durch Bakterien	32
Abb. 29: TEM-Aufnahme der mittleren Probe: Die Bakterien erodieren bzw. durchdringen die S3	33
Abb. 30: TEM-Aufnahme der äußeren Probe: Die S2 ist durch Bakterien großflächig abgebaut	33
Abb. 31: UV-spektroskopische Darstellung des fortschreitenden bakteriellen Zellwandabbaus.....	35
Abb. 32: UV-spektroskopische Punktmessungen bakteriell abgebauter Spätholztracheiden	36
Abb. 33: Holzspan aus der Seitenwand und Holzdübel vom Sarg der Moorleiche Frau von Peiting	37
Abb. 34: Seitenwand (TEM-Aufnahme, <i>P. abies</i>): Intakter Tüpfel	39
Abb. 35: Seitenwand (TEM-Aufnahme, <i>P. abies</i>): Detailansicht der S3 / S2.....	39
Abb. 36: Dübel (TEM-Aufnahme, <i>F. excelsior</i>): Abbau der Sekundärwände	40

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 37: Dübel (TEM-Aufnahme, <i>F. excelsior</i>): Fortgeschrittenen Abbau	40
Abb. 38: Repräsentative UV-spektroskopische Darstellung des Fasergrundgewebes	41
Abb. 39: UV-spektroskopische Darstellung der Fasern (<i>Eucalyptus globulus</i>)	42
Abb. 40: Absorptionsverlauf repräsentativer Linienprofile ($\lambda_{278\text{ nm}}$, <i>Eucalyptus globulus</i>)	43
Tab. 1: Zusammenfassung des verwendeten Untersuchungsmaterials	16
Tab. 2: Zusammenfassung der angewendeten Methoden.....	17
Tab. 3: Bezeichnung, Herkunft und Materialeigenschaften geprüfter Substitutionshölzer.....	22
Tab. 4: Masse der Proben im Relation zur Inkubationsdauer mit dem Prüfpilz <i>Antrodia vaillantii</i> ..	27

9 Publikationen

9.1 Liste der zusammenfassend dargestellten Publikationen (s. Kap. Ergebnisse)

Publikation* ¹	Titel
I	Hölzer für den Fensterbau – Kennwerte und Eigenschaften neu eingeführter Hölzer ^{*2}
VI	Eignung von Massaranduba für die Außenverwendung. Uneingeschränkt einsetzbar für den Einsatz im konstruktiven Außenverbau in den Gebrauchsklassen 1 bis 4 ^{*3, *4}
V	Natürliche Dauerhaftigkeit Sibirischer Lärche. Untersuchung mehrerer Herkunftsgebiete - Inhaltstoffe ursächlich für unterschiedliche Dauerhaftigkeit ^{*3}
X	Wie dauerhaft ist Sibirische Lärche? Wissenschaftliche Untersuchungen am vTI in Hamburg bestätigen praktische Erfahrungen ^{*3, *4}
III	Topochemical investigation on early stages of lignin modification within individual cell wall layers of Scots pine (<i>Pinus sylvestris</i> L.) sapwood infected by the brown-rot fungus <i>Antrodia vaillantii</i> (DC.: Fr.) Ryv ^{*2}
IV	Topochemical and transmission electron microscopic studies of bacterial decay in pine (<i>Pinus sylvestris</i> L.) harbour foundation piles ^{*2}
VIII	Moorleiche „Frau von Peiting“. Holzbiologische Befunde vom Sarg ^{*3}
II	Topochemical investigation into the delignification of <i>Eucalyptus globulus</i> chips during semi-chemical sulfite pulping ^{*2}

*¹ Reihenfolge entsprechend der Nennung im Kapitel Ergebnisse, für weitere Hinweise siehe Kapitel V Liste der Publikationen;

*² Zeitschrift mit Reviewsystem; *³ Nationale Zeitschrift; *⁴ Prüfung erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit Rehbein (2007)

9.2 Erläuterungen zu den eigenen Anteilen an den vorgelegten Arbeiten

Publikation*¹		
I	Koch und Rehbein 2009, Holztechnologie ^{*2}	Beteiligung an der Konzipierung der Arbeit. Vollständige Versuchsplanung und –durchführung sowie Datenauswertung. Beteiligung an der Diskussion der Ergebnisse und der publikationsfähigen Darstellung der Arbeit.
VI	Rehbein und Koch 2007, Holz-Zentralblatt ^{*3, *4}	Vollständige Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsplanung und –durchführung sowie Datenauswertung und publikationsfähige Darstellung. Der Co-Autor hat sich an der Diskussion beteiligt.
V	Koch, Rehbein, Lenz 2007, Holz-Zentralblatt ^{*3}	Beteiligung an der Konzipierung der Arbeit, der Versuchsplanung und –durchführung sowie der Datenauswertung. Weiterhin Beteiligung an der Diskussion der Ergebnisse und der publikationsfähigen Darstellung der Arbeit.
X	Rehbein und Koch 2010, Holz-Zentralblatt ^{*3}	Vollständige Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsplanung und –durchführung sowie Datenauswertung und publikationsfähige Darstellung. Der Co-Autor hat sich an der Diskussion beteiligt.
III	Rehbein und Koch 2011, Intern Biodet Biodegr ^{*2}	Vollständige Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsplanung und –durchführung sowie Datenauswertung und publikationsfähige Darstellung. Der Co-Autor hat sich an der Diskussion beteiligt.
IV	Rehbein et al. 2011, Intern Biodet Biodegr ^{*2}	Vollständige Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsplanung und –durchführung sowie Datenauswertung und publikationsfähige Darstellung. Die Co-Autoren haben sich an der Diskussion beteiligt.
VIII	Rehbein et al. 2009, Restaurio ^{*3}	Vollständige Konzipierung der Arbeit und Literaturrecherche. Versuchsplanung und –durchführung in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren. Vollständige Datenauswertung und publikationsfähige Darstellung. Die Co-Autoren haben sich an der Diskussion beteiligt.
II	Rehbein et al. 2010, Wood Science and Technology ^{*2}	Konzipierung der Arbeit und Literaturrecherche. Versuchsplanung und –durchführung (UMSP). Datenauswertung und publikationsfähige Darstellung. Von M. Pereira wurde Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt und chemisch analysiert. Die weiteren Co-Autoren haben sich an der Diskussion beteiligt.

*¹ Reihenfolge entsprechend der Nennung im Kapitel Ergebnisse, für weitere Hinweise siehe Kapitel V Liste der Publikationen; *² Zeitschrift mit Reviewsystem; *³ Nationale Zeitschrift; *⁴ Prüfung erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit Rehbein (2007)

Hölzer für den Fensterbau

Kennwerte und Eigenschaften neu eingeführter Hölzer

Gerald Koch, Mathias Rehbein



Die aktuelle Marktsituation in Bezug auf die Verwendung von Tropenhölzern im Fensterbau ist dadurch gekennzeichnet, dass etablierte Hölzer wie z. B. Dark Red Meranti (aus Südostasien) oder Sipo (aus Westafrika) aufgrund der starken Übernutzung mengenmäßig nicht mehr ausreichend verfügbar sind, und die Verknappung dieser Holzartengruppe zu einem erheblichen Preisanstieg geführt hat. Ausgehend von dieser Entwicklung werden aktuell noch relativ unbekannte Holzarten, sog. Substitutionshölzer, angeboten, deren Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten für den konstruktiven Rahmenbau im Einzelfall geprüft werden müssen. In der vorliegenden Arbeit werden die Kennwerte und Eigenschaften der neu eingeführten Hölzer Bintangor (*Calophyllum* spp.), Durian (*Durio* spp.), Kasai (*Pometia* spp.) und Merpauh (*Swintonia* spp.) vorgestellt, die nach den Kriterien der Gütegemeinschaft (VFF) am Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI) getestet wurden.

Marktentwicklung von Importhölzern für den Fensterbau

Das Handelssortiment Rotes Meranti (*Shorea*, Sektion *Rubrosorea*) ist auf dem deutschen Fenstermarkt seit 1970 das beherrschende Element unter den Importhölzern. Aufgrund der jahrelangen intensiven Nutzung dieser Holzartengruppe bereitet die Rohholzbeschaffung insbesondere für den Fensterbau zunehmend Schwierigkeiten. Weiterhin ist vermehrt zu beobachten, dass die angebotenen schichtverklebten Kanteln der Bezeichnung Dark Red Meranti (DRM) in vielen Fällen nicht die vorgegebenen Rohdichtewerte (Rohdichte $\geq 0,55 \text{ g/cm}^3$, entsprechend den Malaysian Grading Rules 1984) und die damit verbundene Dauerhaftigkeitsklasse 2 bis 3 erfüllen. Die eingeführten Kanteln mit der Standardbezeichnung DRM sind zudem teilweise falsch oder unzureichend deklariert und enthalten Mischsortimente mehrerer Holzarten (sog. „Mixed Tropical Species“, Abb. 1). Diese Mischsortimente mit Hölzern unterschiedlicher physikalischer und mechanischer Eigenschaften führen zu großen Problemen bei der Verklebung, Bearbeitung und Oberflächenbehandlung der Fensterkanteln. Detaillierte Untersuchungen von Richter [1] und Schwab [2] ergaben z. T. erhebliche Qualitäts- und Eigenschaftsschwankungen, insbesondere hinsichtlich der Dimensionsstabilität (Stehvermögen) und den Verklebungen. Neben dem Problem der Falschdeklarationen werden zunehmend neue noch relativ unbekannte Holzarten, sog. Substitutionshölzer, wie z. B. Durian, Melunak, Merawan, Merpauh oder Punah aus Südostasien angeboten, deren Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten für den Fensterbau im Einzelfall geprüft werden müssen [3].



Abb. 1: Schichtverleimte Kantelel n sog. „Mixed tropical species“, die in vielen Fällen als Dark Red Meranti (DRM) Sortiment deklariert werden

Fig. 1: Scantlings of "Mixed tropical species" declared as Dark Red Meranti (DRM)

Prüfkriterien für die Eignung von Hölzern für den Fensterbau

Die wichtigsten Prüfkriterien für die Beurteilung der Eignung von Hölzern für den Fensterbau sind die Rohdichte, natürliche Dauerhaftigkeit (DIN EN 350-1/2) und die Dimensionsstabilität der zumeist dreilagig verklebten Kanteln (VFF-Merkblatt HO.06-1). Für den praktischen Einsatz im konstruktiven Rahmenbau hat sich ein Rohdichtebereich

zwischen $\rho_N = 0,55$ und $0,70 \text{ g/cm}^3$ etabliert. In diesem Bereich können die gegensätzlichen Forderungen nach großer Festigkeit (hohe Rohdichte) und (relativ) geringen Quell- und Schwindmaßen weitgehend erfüllt werden. Der angegebene Rohdichtebereich gilt im Wesentlichen für die Laubhölzer, wogegen Nadelhölzer aufgrund ihrer einheitlichen Struktur bei geradem Faserverlauf mit einer mittleren Rohdichte von $\rho_N = 0,45 \text{ g/cm}^3$ ähnliche Festigkeiten erreichen wie viele Laubhölzer bei $\rho_N = 0,55 \text{ g/cm}^3$.

Tabelle 1: Holzarten, die nach den Kriterien des Verbandes der Fenster und Fassadenhersteller (VFF) für die Verwendung im konstruktiven Rahmenbau geprüft, und als geeignet eingestuft wurden (Quelle: VFF Merkblatt HO.06-1)

Table 1: Established wood species according to the standards of the „Verband der Fenster und Fassadenhersteller“ (VFF; References: VFF Merkblatt HO.06-1)

Handelsbezeichnung	Botanische Bezeichnung	Rohdichte Nomenklatur bei $u = 12-15\% \text{ [g/cm}^3\text{]}$	Dimensionsstabilität	Dauerhaftigkeit nach DIN EN 350-2
NADELHÖLZER				
Fichte	<i>Picea abies</i>	0,40 - 0,45 - 0,50	gut	4
Hemlock	<i>Tsuga heterophylla</i>	0,44 - 0,47 - 0,51	gut	4
Kiefer	<i>Pinus sylvestris</i>	0,44 - 0,52 - 0,60	mittel bis gut	3-4
Lärche	<i>Larix</i> spp.	0,47 - 0,57 - 0,62	mittel bis gut	3-4
Lodgepole Pine	<i>Pinus contorta</i>	0,42 - 0,46 - 0,50	mittel bis gut	3-4
Oregon Pine	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0,46 - 0,52 - 0,57	gut	3
Sitka Spruce	<i>Picea sitchensis</i>	0,43 - 0,48 - 0,52	gut	4
Tanne	<i>Abies alba</i>	0,40 - 0,45 - 0,50	gut	4
Western Red Cedar	<i>Thuja plicata</i>	0,33 - 0,37 - 0,41	gut	2-3
Western White Spruce	<i>Picea glauca</i>	0,42 - 0,48 - 0,54	gut	4
LAUBHÖLZER				
Afzelia	<i>Afzelia bipindensis</i>	0,73 - 0,80 - 0,85	sehr gut	1
Bintangor	<i>Calophyllum</i> spp.	0,65 - 0,75 - 0,84	gut	3
Eukalyptus	<i>Eucalyptus grandis</i>	0,37 - 0,46 - 0,55	mittel	3-4
Eukalyptus (Galicien)	<i>Eucalyptus globulus</i>	0,80 - 0,84 - 0,90	mittel	1-2
Dark Red Meranti	<i>Shorea</i> spp.	0,50 - 0,71 - 0,89	gut	2
Framiré	<i>Terminalia ivorensis</i>	0,45 - 0,53 - 0,60	gut	2-3
Heavy White Seraya	<i>Parashorea</i> spp.	0,60 - 0,72 - 0,85	gut bis mittel	2-3
Iroko	<i>Milicia excelsa</i>	0,60 - 0,66 - 0,73	gut	1-2
Kasai	<i>Pometia pinnata</i>	0,50 - 0,73 - 0,90	gut bis mittel	3
Khaya	<i>Khaya</i> spp.	0,48 - 0,54 - 0,60	gut	3
Light Red Meranti	<i>Shorea</i> spp.	0,40 - 0,45 - 0,50	gut	4
Light White Seraya	<i>Parashorea</i> spp.	0,48 - 0,53 - 0,62	gut	3-4
Louro vermelho	<i>Ocotea rubra</i>	0,60 - 0,63 - 0,70	mittel	2-3
Echtes Mahagoni*	<i>Swietenia macrophylla</i>	0,48 - 0,55 - 0,60	sehr gut	2
Makoré	<i>Tieghemella heckelii</i>	0,62 - 0,72 - 0,80	gut	1
Mengkulang	<i>Heritiera</i> spp.	0,55 - 0,60 - 0,72	gut	4
Merbau	<i>Intsia</i> spp.	0,75 - 0,80 - 0,85	sehr gut	1-2
Niangon	<i>Heritiera utilis</i>	0,58 - 0,61 - 0,72	gut bis mittel	3
Robinie	<i>Robinia pseudoacacia</i>	0,72 - 0,79 - 0,85	gut	1-2
Sapelli	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	0,60 - 0,65 - 0,70	befriedigend	3-4
Sipo	<i>Entandrophragma utile</i>	0,57 - 0,63 - 0,70	gut	2
Tasmanian Oak	<i>Eucalyptus</i> spp.	0,61 - 0,68 - 0,75	gut bis mittel	3-4
Teak	<i>Tectona grandis</i>	0,60 - 0,68 - 0,75	sehr gut	1
Weißbeiche	<i>Quercus</i> spp.	0,67 - 0,72 - 0,77	mittel	2

*geschützt unter CITES Annex II des Washingtoner Artenschutzabkommens

Die natürliche Dauerhaftigkeit variiert zwischen den Hölzern stark und hängt insbesondere von Art und Menge der Inhaltsstoffe ab, die (fast) ausschließlich im Kernholz eingelagert werden [4]. Nach DIN EN 350-2 „Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz“ [5] werden die Hölzer entsprechend der Resistenz des ungeschützten Kernholzes gegenüber einem Pilzabbau in die Dauerhaftigkeitsklassen 1 (= sehr dauerhaft) bis 5 (= nicht dauerhaft) eingestuft.

Diese Klassifikation bezieht sich auf die Haltbarkeit des Holzes im Erdkontakt, d. h. unter extremer Belastung. Die Verwendung von Holz im Fensterbau gehört einem niedrigeren Gefährdungspotenzial an, das nach EN 335-1 durch die Gebrauchsklassen für einen biologischen Befall beschrieben wird. Die Verwendung von Holz im Fensterbau ist der Gebrauchsklasse 3 (ohne Erdkontakt, nicht abgedeckt) zuzurechnen. Holzarten, die in diesem Bereich eingesetzt werden, sollten mindestens die Dauerhaftigkeitsklasse 3 (bis 4) erfüllen.

Zusätzliche Anforderungen an Hölzer für den Fensterbau sind gutes Trocknungsverhalten, leichte Bearbeitbarkeit sowie die Verträglichkeit des Holzes mit Beschlägen, Klebstoffen, Dichtstoffen und Anstrichmitteln [6, 7]. Neben diesen technischen Anforderungen an ein Fensterholz werden in zunehmendem Maße auch ökonomische und ökologische Aspekte, wie Anschaffungskosten, kontinuierliche Versorgung und nachhaltige Bewirtschaftung nachgefragt und gefordert [8].



Abb. 2: Makroskopische Holzstruktur (Längs- und Querschnitt, Vergrößerung 12 x) der Hölzer Bintangor (links) und Kasai (rechts)

Fig. 2: Macroscopic wood structure (longitudinal and transverse section, magnification 12 x) of the approved species Bintangor (left) and Kasai (right)

„Bewährte“ Holzarten für den Fensterbau

Auf der Grundlage der beschriebenen Anforderungsprofile und Eigenschaften hat der Verband der Fenster und Fassadenhersteller e. V. (VFF) eine Holzartentabelle (HO.06-1) erarbeitet, die die für den Fensterbau „bewährten“ Hölzer enthält. Die aktuelle Fassung der Holzartentabelle umfasst insgesamt 10 Nadelhölzer und 24 Laubhölzer, die sich im Einsatz für maßhaltige Bauteile (Fenster, Außentüren) als geeignet „bewährt“ erwiesen haben (Tab. 1).

Unter handelsrelevanten Aspekten muss bemerkt werden, dass es sich bei einer Vielzahl der aufgelisteten Hölzer wie z. B. Afzelia, Khaya, Sapelli, Sipo und Teak um hochwertige Ausstattungshölzer handelt, die ihre höchste Wertschöpfung im dekorativen Innenausbau oder Bootsbau besitzen und aufgrund der begrenzten Kapazitäten und hohen Preise nicht mehr serienmäßig im Fensterbau verwendet werden. Echtes Mahagoni aus Naturwaldbeständen unterliegt zudem den Handelsbeschränkungen des Artenschutzes (CITES Annex II), der nur einen sehr begrenzten Handel zulässt [9].

Kennwerte und Eigenschaften neu eingeführter Hölzer für den Fensterbau

Infolge der beschriebenen Marktveränderungen wurden in den letzten Jahren die Eigenschaften der neu eingeführten Substitutionshölzer Bintangor, Durian, Kasai und Merpauh

Tabelle 2: Physikalische und mechanische Kennwerte der geeigneten Holzarten Bintangor und Kasai

Table 2: Physical and mechanical properties of the approved species Bintangor and Kasai

Bintangor	Kasai
Botanische Bezeichnung: <i>Calophyllum</i> spp. Familie: GUTTIFERAE Kurzzeichen nach EN 13556: CLXX	Botanische Bezeichnung: <i>Pometia pinnata</i> Familie: SAPINDACEAE Kurzzeichen nach EN 13556: PMPN
Verbreitung: Indien, Pakistan, Sri Lanka, Burma, Thailand, Laos, Vietnam, Kambodscha und Indomalaysia	Verbreitung: Thailand, Laos, Vietnam, Kambodscha oder Indomalaysia
Kernholz braun oder rot, ohne Farbstreifen; Splintholz farblich deutlich vom Kernholz abgesetzt; Wechseldrehwuchs lokal vorhanden	Kernholz braun oder rot, gelegentlich mit Farbstreifen; Splintholz nicht immer farblich vom Kernholz abgesetzt; Wechseldrehwuchs lokal vorhanden
<ul style="list-style-type: none"> ■ Rohdichte: 0,45 - 0,68 - 0,85 g/cm³ ■ Angleichgeschwindigkeit der Holzfeuchte gering bis mittel ■ Stehvermögen mittel ■ E-Modul: 8.000 - 15.300 N/mm² ■ Biegefestigkeit: 74 - 94 - 106 N/mm² ■ Dauerhaftigkeitsklasse: 3 (variabel) ■ Verklebbarkeit gut bis mittel 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Rohdichte: 0,63 - 0,72 - 0,92 g/cm³ ■ Angleichgeschwindigkeit der Holzfeuchte sehr gering bis gering ■ Stehvermögen mittel bis gering ■ E-Modul: 12.800 - 17.500 N/mm² ■ Biegefestigkeit: 77 - 101 - 112 N/mm² ■ Dauerhaftigkeitsklasse: 3 ■ Verklebbarkeit mittel
Das Holz trocknet mit normaler bis geringer Geschwindigkeit; es neigt stark zu Verformung (Schüsseln, Verdrehen), weniger zu Rissbildung und Kollaps; innere Spannungen sind oft vorhanden	Das Holz trocknet langsam und erfordert eine vorsichtige Behandlung um Trocknungsdefekte zu vermeiden; vor allem durch hohe Schwindung verursachte Verformung sowie End- und Oberflächenrisse



Abb. 3: Makroskopische Holzstruktur (Längs- und Querschnitt, Vergrößerung 12 x) der Hölzer Durian (links) und Merpauh (rechts)

Fig. 3: Macroscopic wood structure (longitudinal and transverse section, magnification 12 x) of the species durian (left) and merpauh (right)

aus Südostasien am Institut für Holztechnologie und Holzbiologie des vTI geprüft. Auf der Grundlage der ermittelten Kennwerte und praktischen Erfahrungen wurden die beiden Hölzer Bintangor und Kasai (Tab. 2, Abb. 2) als geeignet für den Fensterbau eingestuft und neu in das VFF Merkblatt HO.06-1 aufgenommen.

Die neu eingeführten Hölzer Durian und Merpauh (Tab. 3, Abb. 3) erfüllen dagegen nicht die Bewertungskriterien der Gütegemeinschaften und wurden insbesondere aufgrund der geringen natürlichen Dauerhaftigkeit des Kernholzes (Klasse 4 bis 5) nicht zugelassen.

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind Eigenschaften weiterer Hölzer aus Südostasien charakterisiert, die in Einzelfällen oder als falsch deklarierte Ware auf dem Fenstermarkt eingeführt wurden [3]. Bei diesen z. T. sehr seltenen Hölzern ist nicht davon auszugehen, dass sie sich etablieren können, zumal sie in den meisten Fällen wenig bis nicht dauerhaft sind (entsprechend den Klassen 4 und 5 nach DIN EN 350-2, dort nicht aufgenommen).

Neben den Untersuchungen zur Eignungsprüfung von Fensterkanteln aus tropischen Baumarten wurden auch die Eigenschaften von lamellierten Kanteln verschiedener Kiefernarten (*Pinus merkusii* und *Pinus radiata*) aus Plantagenbewirtschaftung untersucht [10], die als Alternative für die Verwendung von Tropenhölzern etabliert werden sollten. Die Prüfungen haben gezeigt, dass die eingeführten Sortimente aus *P. merkusii* und *P. radiata* zumeist aus Splintholz

Tabelle 3: Physikalische und mechanische Kennwerte der Holzarten Durian und Merpauh

Table 3: Physical and mechanical properties of the species Durian und Merpauh

Durian	Merpauh
Botanische Bezeichnung: <i>Durio</i> spp. Familie: BOMBACACEAE	Botanische Bezeichnung: <i>Swintonia</i> spp. Familie: ANACARDIACEAE
Verbreitung: Vietnam, Kambodscha und Indomalaysia	Verbreitung: Burma bis Indomalaysia
Kernholz rosabraun bis graubraun mit rötlichem Schimmer nachdunkelnd; Splintholz schmutzig hellgrau oder weißlich bis hellrosa (breit bis 5 cm)	Kernholz hell bis grau braun, gelegentlich mit Farbstreifen; Splintholz entspricht farblich dem Kernholz (geringfügig heller); Wechseldrehwuchs vorhanden
<ul style="list-style-type: none"> ■ Rohdichte: 0,40 - 0,69 - 0,75 g/cm³ ■ Angleichgeschwindigkeit der Holzfeuchte gering bis mittel ■ Stehvermögen gut bis mittel ■ E-Modul: 9.500 - 13.000 N/mm² ■ Biegefestigkeit: 60 - 69 - 78 N/mm² ■ Dauerhaftigkeitsklasse 4 bis 5 ■ Verklebbarkeit gut 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Rohdichte: 0,60 - 0,71 - 0,82 g/cm³ ■ Angleichgeschwindigkeit der Holzfeuchte gering bis mittel ■ Stehvermögen gut bis mittel ■ E-Modul: 15.000 - 18.100 N/mm² ■ Biegefestigkeit: 82 - 141 - 169 N/mm² ■ Dauerhaftigkeitsklasse: 5 ■ Verklebbarkeit gut bis mittel
Die Trocknung des Holzes muss schnell nach dem Einschnitt erfolgen, um eine Verblauung zu vermeiden; Vorkommen von traumatischen Harzkanälen	Die Trocknung des Holzes muss schnell nach dem Einschnitt erfolgen, um Befall durch verfärbende Pilze zu vermeiden; das Holzgewebe enthält SiO ₂

bestehen, das durch eine hohe Feuchteaufnahme und geringe natürliche Dauerhaftigkeit charakterisiert wird. Die Festigkeit der Klebfugen von industriell hergestellten Fensterkanteln war gut bis befriedigend. Mit steigendem Harzgehalt (bis zu 30 % bezogen auf atro Holz) ergaben sich aber ungenügende Klebfugenfestigkeiten der lamellierten Kanteln [10].

Weiterführende Untersuchungen zielen derzeit auf den Einsatz von modifizierten Hölzern (Hitzebehandlung (thermal modified timber TMT), Acetylierung, Holzvernetzung) als Vollholzprofile oder in Form von Außenlagen für die Herstellung von Fensterkanteln [11, 12]. Die hauptsächlich durch die Modifizierung erreichbaren Eigenschaftsverbesserungen betreffen die natürliche Dauerhaftigkeit sowie das Quell- und Schwindverhalten des Holzes. Deshalb wird der Einsatz modifizierter Hölzer auch für den Fensterbau interessant, da v. a. die Dauerhaftigkeit von mäßig bis wenig dauerhaften Hölzern (z. B. Kiefer oder Fichte) verbessert werden kann. Jedoch können auch andere Eigenschaften der modifizierten Hölzer, z. B. mechanische Festigkeiten, ausschlaggebend vom jeweiligen Modifizierungsverfahren beeinflusst werden, sodass ein Vergleich mit der ursprünglich für die Behandlung gewählten Holzart in vielen Fällen nicht mehr gegeben ist. Aus diesem Grund wird aktuell eine VFF Merkblatt HO.06-4. ausgearbeitet, das die Kriterien für die Beurteilung der Eignung modifizierter Hölzer für den Fensterbau festlegt.

Literatur

- 1 Richter, H.G.; Schwab, E.; Schmors, R.: *Quality assessment of laminated window scantlings manufactured from mixed tropical hardwoods. Journal of Tropical Forest Products* 5 (1999) 2, S.159-170
- 2 Schwab, E.; Richter, H.G.; Schmors, R.: *Zur Qualität von lamellierten Fensterkanteln aus Mischholzsortimenten. Holz-Zentralblatt* 123 (1997) 143, S. 2167-2168
- 3 Koch, G.: *Übersicht: Holzarten für Fensterkanteln aus Südostasien. Holz-Zentralblatt* 132 (2006) 31, S. 883
- 4 Koch, G.: *Holz Anatomie - Anatomischer Aufbau und chemische Zusammensetzung des Holzes. In: Holzschutz im Hochbau. Hrsg. J. Müller, Fraunhofer IRB Verlag Stuttgart, 2005, S. 15-23*
- 5 DIN EN 350-2:1994-10 *Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz - Teil 2: Leitfaden für die natürliche Dauerhaftigkeit und Tränkbarkeit von ausgewählten Holzarten von besonderer Bedeutung in Europa*
- 6 Richter, H.G.; Schwab, E.: *Holzarten für den Fensterbau. Glas + Rahmen* 11 (1982) 7, S. 586-598
- 7 Laurich, H.; Schmid, J.: *Holzfenster - Anforderungen an lamellierte Kanteln. Holz-Zentralblatt* 115 (1989) 111, S.1660-1660
- 8 Trübswetter, T.: *Holzarten für den Fensterbau. BM Innenausbau, Möbel, Bauelemente* (1998) 1, S. 99-100
- 9 Koch, G.; Richter, H.G.; Schmitt, U.: *Computer-aided identification and description of CITES protected trade timbers. Bois et Forêts des Tropiques* 297 (2008) 3, S. 69-73
- 10 Bröker, F.W.; Kleinmann, S.; Richter H.G.: *Eigenschaften lamellierter Fensterkanteln verschiedener Kiefernarten. Arbeitsbericht der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg, 1994, S. 7*
- 11 Illner, M.; Militz, H.; Schmid, J.; Schwarz, B.; Stetter, K.: *Modifizierte Hölzer für den Einsatz im Fensterbau. Holz-Zentralblatt* 129 (2003) 47, S. 698
- 12 Militz, H.; Krause, A. (2004): *Tuning für Buche und Co. Fenster Magazin. Supplement von Holz-Zentralblatt und HK* (2004) 3, S. 46-49

Autoren

PD Dr. habil. Gerald Koch, Jahrgang 1968, Studium der Holzwirtschaft und Promotion (Dr. rer. nat.) im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg. Habilitation und Venia legendi für das Fachgebiet Holzbiologie an der Universität Hamburg; seit 2004 wissenschaftliche Leitung der Holzsammlung und des holz-anatomischen Labors am Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (vTI), Gutachter für Holzartenbestimmung und das Washingtoner

Tabelle 4: Kennwerte und Eigenschaften weiterer Holzarten aus Südostasien, die sich nicht für den Fensterbau eignen

Table 4: Properties of further lesser known species from South-East-Asia which are not suitable for window scantlings

Handelsbezeichnung	Rohdichte bei u = 12-15% [g/cm ³]	Dauerhaftigkeit*	Verarbeitungsrelevante Hinweise
GERONGGANG	0,35 -0,61	4	Bearbeitbarkeit problemlos; Dimensionsstabilität gut bis mittel; Einlagerung von Silica im Holzgewebe (werkzeugaabstumpfend); anfällig für Befall durch Pilze und Insekten (ungeschütztes Kernholz)
PENAHARAN	0,30 -0,65	4 bis 5	Bearbeitbarkeit problemlos; anfällig für Befall durch Pilze und Insekten (ungeschütztes Kernholz)
PUNAH	0,63 -0,80	3	Bearbeitbarkeit wird bei grobfaserigem Gewebe erschwert; Dimensionsstabilität mittel (schwindet erheblich); verblaut schnell
TERENTANG	0,35 -0,50	4	Bearbeitbarkeit problemlos; Dimensionsstabilität gut; anfällig für Befall durch Pilze und Insekten (ungeschütztes Kernholz)

* Die Angaben zur natürlichen Dauerhaftigkeit entsprechen Literaturwerten (Atlas der tropischen Hölzer, Band II, ATIBT und PROSEA – Plant Resources of South-East Asia, Band 1 bis 3)

Artenschutzabkommen CITES, Mitglied in Normausschüssen und des Fachgremiums Holzarten für den Fensterbau (VFF).

E-mail: gerald.koch@vti.bund.de

Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein, Jahrgang 1974, Berufsausbildung Tischler, Studium der Holzwirtschaft an der Universität Hamburg. Laufende Promotion an der Universität Hamburg mit dem Schwerpunkt: Topochemische Charakterisierung delignifizierter Hölzer, seit 2007 wissenschaftlicher Angestellter am Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB). Erstellung von Gutachten für das Fachgebiet Holzqualität und Holzschäden.

ABSTRACT

**Timbers for window constructions
Specific values and properties of recently imported timbers**

The current market development on import of tropical timbers for window scantlings is characterised by a decreasing availability in volume and quality of the established species, e.g. Dark Red Meranti (from South-East-Asia) or Sipo (from West-Africa). Based on this development, new so-called "lesser known wood species", e.g., bintangor (*Calophyllum* spp.), durian (*Durio* spp.), kasai (*Pometia* spp.), and merpauh (*Swintonia* spp.) are currently imported. For establishing these new species on the German scantling market, the wood properties have to be studied individually according to the standards of the VFF Gütegemeinschaft. In the present study, the physical and mechanical standards and wood properties of these lesser-known species are presented which were tested at the Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI).

Eignung von Massaranduba für die Außenverwendung

Uneingeschränkt einsetzbar für den Einsatz im konstruktiven Außenverbau in den Gebrauchsklassen 1 bis 4

von Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein und PD Dr. Gerald Koch

Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein ist Projekt-Mitarbeiter am Institut für Holzbiologie und Holzschutz der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH), Hamburg.

PD Dr. Gerald Koch ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Holzbiologie und Holzschutz der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH), Hamburg.

Die südamerikanische Holzart Massaranduba (*Manilkara bidentata*) wird bereits seit etwa zwei Jahren als so genanntes Substitutionsholz für Bangkirai (*Shorea* spp., subg. *Shorea*) vermarktet, insbesondere für die Verwendung als Terrassendielen. Bisher fehlten jedoch normgerechte Kennwerte und Aussagen zu Gebrauchs- und Verarbeitungseigenschaften. Nach Untersuchungen an der Universität Hamburg kann dem geprüften Sortiment der Holzart Massaranduba eine uneingeschränkte Eignung für den Einsatz im konstruktiven Außenverbau in den Gebrauchsklassen 1 bis 4 ausgesprochen werden.

Auf Grund der anhaltenden Nachfrage nach Hölzern für den Garten- und Landschaftsbau (Gala-Bau), insbesondere für die Verwendung als Terrassendielen, werden in zunehmendem Maße neue bzw. noch relativ unbekannt Hölzer auf dem Markt eingeführt (vgl. HZ Nr. 30 vom 28. Juli 2006, S. 873 und HZ Nr. 9 vom 3. März 2006, S. 254). Für den fachgerechten Einsatz dieser Hölzer ist die Bereitstellung von normgerechten Kennwerten und die Beurteilung ihrer Gebrauchs- und Verarbeitungseigenschaften unerlässlich. Im Rahmen der Diplomarbeit von Mathias Rehbein am Zentrum Holzwirtschaft der Universität Hamburg, in Verbindung mit dem Institut für Holzbiologie und Holzschutz der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft wurden die Eigenschaften und die Eignung der Holzart Massaranduba (*Manilkara bidentata*) für die Verwendung als Terrassendielen grundlegend untersucht. Das natürliche Verbreitungsgebiet der Baumart liegt im tropischen Südamerika, vor allem in Brasilien und Guayana.

Material und Methode

Die Auswahl der im Rahmen der Diplomarbeit ermittelten Holzeigenschaften erfolgte zum einen unter spezifischen anforderungsrelevanten Gesichtspunkten, zum anderen aus rein wissenschaftlichen Ansätzen bzw. Fragestellungen, da die in der Literatur verfügbaren Daten zum Teil aus nicht nachvollziehbaren Quellen stammen oder unter abweichenden nicht normkonformen Standards ermittelt wurden. Neben der Bereitstellung physikalisch-technologischer Kennwerte lag ein weiterer Schwerpunkt der Diplomarbeit in der Charakterisierung möglicher Farbreaktionen der Holzoberfläche, ermittelt durch einen selbstdefinierten Bewitterungs- sowie UV-Belichtungstest. Für die Durchführung der Prüfungen wurden von der Firma WOODLINK Ekkehard Anders GmbH & Co. KG, insgesamt 30 Abschnitte von handelsüblichen Unterkonstruktionshölzern für den

Terrassenbau mit einem Querschnitt von ca. 66/44 mm zur Verfügung gestellt. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) ist eine Übersicht der durchgeführten biologischen, physikalisch-technologischen und gebrauchorientierten Prüfungen dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der durchgeführten Prüfungen

Prüfungsart	Bezeichnung	Vorschrift nach DIN EN
Biologische Prüfung	Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz	350-1/2 [1994] 113 [1996]
Physikalische Prüfung	Biegeversuch	52 186 [1978]
	Bestimmung der Druckfestigkeit parallel/quer (radial/tangential) zur Faser	52 185 [1976] 52 192 [1979]
	Bestimmung des Eindruckwiderstandes (Brinell) in radialer, tangentialer und longitudinaler Richtung	EN 1534 [2000]
	Bestimmung der Quellung und Schwindung	52 184 [1979]
Gebrauchsprüfung	Bewitterung	Weiss Klimatechnik, Typ: Global UV/UV200 RB/10DU
	UV-Bestrahlung	Osram, Typ: Ultra-Vitalux

Makroskopische Beschreibung und Probenauswahl

Das Kernholz von *Massaranduba* ist im frischen Zustand fleischrot, später dunkelbraun nachdunkelnd und hat ein deutlich abgesetztes meist schmales, rötlich-graues Splintholz. Zuwachszonengrenzen sind auf den Querschnitten undeutlich bzw. nicht erkennbar. Die mittelgroßen Gefäße (tangentialer Durchmesser: 80-150 µm) sind zerstreutporig angeordnet, verthyllt und in radialen Reihen/Bändern verlaufend. Axialparenchym ist vorhanden, gebändert angeordnet und bildet mit den überwiegend 1 mm hohen Holzstrahlen ein netzartiges Muster. Harzkanäle sind bei *Massaranduba* nicht vorhanden (Gottwald 1958, Richter und Oelker 2006).

Natürliche Dauerhaftigkeit von *Massaranduba*

Die Dauerhaftigkeitsprüfung nach DIN EN 350-1 [1994] und DIN EN 113 [1996] ergab für das untersuchte Kernholz von *Massaranduba* einen mittleren x-Wert von 0,07 durch den an diesem Holz aktiveren Prüfpilz *Coriolus versicolor* (Weissfäulepilz), was zu einer Einstufung in die Dauerhaftigkeitsklasse 1 = „sehr dauerhaft“ führt. Die in der Literatur für die Holzart *Massaranduba* beschriebenen Werte der Dauerhaftigkeitsklassen 1 bis 2 = „sehr dauerhaft“ bis „dauerhaft“ konnten somit nicht nur bestätigt sondern uneingeschränkt zur Dauerhaftigkeitsklasse 1 hin berichtet werden. Die Mindestanforderungen an die Dauerhaftigkeitsklassen für hölzerne Terrassen (Gebrauchsklasse 3 bis 4) liegen nach DIN EN 460 [1994] bei den Klassen 2 bis 3, wobei diese Angaben für den Terrassenbau nur als Richtwert bzw. Empfehlung, für den Hochbau (tragende Teile) jedoch als verpflichtend gelten.

Physikalisch-technologische Eigenschaften von Massaranduba

Neben der Widerstandsfähigkeit einer Holzart gegen holzerstörende Pilze sind die physikalisch-technologischen Eigenschaften ein entscheidendes Kriterium für die Eignung der Hölzer im konstruktiven Aussenbau. Als verwendungsrelevante Kenngrößen für die Eignung von Terrassenhölzern wurden für Massaranduba die Rohdichte, Biegefestigkeit, Biege-Elastizitätsmodul quer zur Faser (tangential), Druckfestigkeit, Druck-Elastizitätsmodul und die Brinellhärte in radialer, tangentialer und longitudinaler Richtung bestimmt (siehe Tabelle 2). Die ermittelte Rohdichte im Normalklima (20°C/65% rel. Luftfeuchte) beträgt für Massaranduba 1,07 g/cm³ (Mittelwert) und liegt im Bereich der Mittelwerte, die in der Literatur angegeben werden. Die einzelnen Kennwerte der Festigkeiten und Elastizitäten sind in Tabelle 2 dargestellt und liegen im direkten Vergleich über denen von Bangkirai (mit Ausnahme des Biege-Elastizitätsmoduls).

Tabelle 2: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte holzartenabhängiger Eigenschaften von handelsüblichen Hölzern für den Garten- und Landschaftsbau

Eigenschaft	Massaranduba	Bangkirai
Rohdichte (u = 12%) [g/cm ³]	1,07	0,93* ¹
Dauerhaftigkeitsklasse	1	2* ¹
Biegefestigkeit [N/mm ²]	179	142* ²
Biege Elastizitätsmodul [N/mm ²]	17.885	18.700* ¹
Druckfestigkeit II [N/mm ²]	83	75-80* ³
Druckelastizitätsmodul II [N/mm ²]	20.082	k. A.
Druckelastizitätsmodul ⊥ (radiale Richtung) [N/mm ²]	2.615	k. A.
Druckelastizitätsmodul ⊥ (tangentiale Richtung) [N/mm ²]	1.784	k. A.
Brinellhärte II [N/mm ²]	76	k. A.
Brinellhärte ⊥ (gemittelt aus radial/tangential) [N/mm ²]	61	37* ³
Differentielle Quellung radial [%/°]	0,33	0,16-0,19* ⁴
Differentielle Quellung tangential [%/°]	0,44	0,37-0,43* ⁴
Quellungsanisotropie	1,34	1,9-2,7* ⁴
Trocknungsschwindmaß radial [%]	2,8	3,7* ⁴
Trocknungsschwindmaß tangential [%]	4,7	6,5* ⁴
Maximales lineares Quellmaß tangential [%]	10,8	9,3-10,2* ⁵
Maximales lineares Quellmaß radial [%]	7,6	4,2-6,8* ⁵
Maximales lineares Quellmaß longitudinal [%]	0,15	k. A.

*¹ = Koch 2006; *² = Dahms 1980; *³ = Sell 1989; *⁴ = Richter, H.G., Oelker, M.; *⁵ = Richter, H.G., Gottwald (1996)

Als orientierende Kenngröße für die Ermittlung des Abnutzungswiderstandes wurde die Oberflächenhärte nach Brinell bestimmt. Bedingt durch die Korrelation von Abnutzungswiderstand und Oberflächenhärte hat sich die Härteangabe auch in der Praxis für die Beurteilung der Gebrauchseigenschaften von Terrassenhölzern etabliert. Die Ergebnisse der Oberflächenhärte-Prüfung (Brinell, Prüfkraft 1.000 N) ergaben bei

Massaranduba einen Mittelwert von 76 N/mm^2 in longitudinaler Richtung (parallel zur Faser), 60 N/mm^2 in tangentialer Richtung (Eindruck erfolgte in radiale Fläche) und 63 N/mm^2 in radialer Richtung (Eindruck erfolgte in tangentiale Fläche). Aus diesen Daten resultiert ein praxisrelevanter Mittelwert für die Prüfung senkrecht zur Faser von 61 N/mm^2 .

Dimensionsstabilität und Rissbildung bei Massaranduba

Ein Terrassenbelag aus Holz, der ganzjährig der freien Bewitterung ausgesetzt ist, unterliegt bedingt durch die wechselnden klimatischen Bedingungen seiner Umgebung (häufiger Wechsel von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, UV-Bestrahlung etc.) starken Belastungen, die u.a. Dimensionsänderungen bei Holzfeuchtewechsel, Festigkeitsverluste durch einen Befall von holzerstörenden/-abbauenden Organismen und Farbveränderungen durch Lichteinwirkung (UV) zur Folge haben können.

Die für den praktischen Gebrauch wichtige Beurteilung der Dimensionsänderungen bei Feuchtewechsel wurde anhand der ermittelten Daten aus den Quell- und Schwindversuchen abgeleitet. Um alle möglichen Ausgleichsfeuchte-Situationen und damit verbundenen Dimensionsänderungen, die sich im Jahresverlauf bei einer der Bewitterung ausgesetzten Holzkonstruktion einstellen können unter Laborbedingungen zu simulieren, wurde nach DIN EN 52 184 [1979] eine mehrstufige Klimalagerung von darrtrocken bis wassergelagert über die Zwischenstufen $20^\circ\text{C}/35\%$ rel. LF., $20^\circ\text{C}/65\%$ rel. LF. und $20^\circ\text{C}/85\%$ rel. LF durchgeführt.

Die Situation einer darrgetrockneten Holzkonstruktion kommt im realen Gebrauch nicht vor, wurde im Zuge der Prüfung dennoch benötigt, um den Zustand der minimalen Quellung zu erreichen. Bei Zwischenstufe 1 ($20^\circ\text{C}/35\%$ rel. LF.) stellte sich eine mittlere Ausgleichsfeuchte von 8,0% ein. In der Praxis entspricht diese Ausgleichsfeuchte einer heißen, trockenen Sommerperiode. Zwischenstufe 2 ($20^\circ\text{C}/65\%$ rel. LF.) mit einer resultierenden Ausgleichsfeuchte von 13,6% entspricht der Durchschnittsfeuchte des Holzes in einem warmen Sommer. Zwischenstufe 3 ($20^\circ\text{C}/85\%$ rel. LF.) mit 18,8% gemittelter Ausgleichsfeuchte simuliert feuchte Perioden, wie sie im Herbst bis zum Frühling vorkommen. Durch die Wasserlagerung wurde die maximale Quellung der Proben zur Berechnung des Trocknungsverhaltens ermittelt. Dieser Zustand kann sich bei einer Terrasse nur durch falsche Konstruktion (z.B. stehendes Wasser durch zu geringe Neigung), Feuchtenester durch mangelnde Pflege (z.B. Laubansammlung, direkter Bodenkontakt, etc.) oder über eine langfristig andauernde Extremwetter-Periode mit permanentem Regen einstellen.

Die Ergebnisse der Quell- und Schwindversuche liegen in Wertebereichen, die mit der hohen Rohdichte dieser Holzart gut korrelieren. So wurde ein mittleres maximales lineares Quellmaß (beschreibt die prozentuale Quellung vom darrtrockenen auf den nassen Zustand des Holzes) von 7,6% für die radiale, 10,8% für die tangentiale und 0,15% für die longitudinale Richtung ermittelt. Die Quellungsanisotropie, die eine Abschätzung der Querschnittsverformung (Quotient aus den differentiellen Quellungen in tangentialer und radialer Richtung) bei Holzfeuchteänderung ermöglicht, ergab bei Massaranduba einen Wert von 1,34 (weitere Werte siehe Tabelle 2).

Die Ergebnisse der Quell- und Schwindversuche zeigen, dass die Feuchteanpassung der Holzart Massaranduba zwischen den Klimastufen sehr langsam erfolgt, was auf die hohe

Dichte und Einlagerungen von hydrophoben Holzinhaltstoffen zurückgeführt werden muss. Diese Eigenschaft bringt aus verwendungstechnischer Sicht Vor- und Nachteile mit sich. Als Vorteil kann eine langsame Feuchteanpassung nach Vortrocknung des Ausgangsmaterials (Halbwaren) auf ca. 15-18% Holzfeuchte angesehen werden. Kurzfristige Klimaschwankungen (kurzer warmer Sommerregen) führen somit nur zu einer langsamen Holzfeuchteänderung und geringeren Dimensionsveränderungen. Für die erforderliche Vortrocknung des eingeschnittenen Holzes (d.h. vor Zuschnitt und Profilierung der Halbwaren) ist die langsame Feuchteänderung als nachteilig anzusehen, da eine langsame Holzfeuchteabgabe von waldfrisch auf 20% (im Idealfall 15-18%) Holzfeuchte eine fachgerechte und kostenintensive Trocknung voraussetzt. Eine dem Einsatzzweck angepasste Vortrocknung muss als Grundvoraussetzung für die Verwendung von Massaranduba im Terrassenbau angesehen werden, da als Hauptreklamationsgrund eine starke holzstrahlparallele Rissbildung bemängelt wird (siehe Abbildung 1). Die beschriebene Rissbildung muss in den meisten Fällen auf eine unzureichende Vortrocknung des verbauten Holzes zurückgeführt werden. Infolge starker Erwärmung der Oberfläche durch die Sonneneinstrahlung kommt es zu einer intensiven Abtrocknung der äußeren Mantelfläche und durch die so entstehenden starken inneren Spannungen zur Rissbildung.



Abbildung 1: Querschnittsmuster der Holzart Massaranduba mit radialer Rissbildung.

Farbverhalten von Massaranduba

Ein wichtiges Kriterium für die Kundenakzeptanz von Hölzern für Terrassenkonstruktionen ist ihr Farbverhalten (Farbstabilität) unter Einfluss der natürlichen Bewitterung, insbesondere der Sonneneinstrahlung. Für den Ansatz, eine natürliche Verwitterung der Holzoberfläche unter Laborbedingungen (d.h. künstliche Bewitterung in verkürzter Zeit und mit reproduzierbaren Ergebnissen) zur Charakterisierung des Farbverhaltens

von Massaranduba (unbehandelte Holzoberfläche) nachzustellen, wurden zwei unterschiedliche Testverfahren durchgeführt.

- Verfahren 1: Künstliche Bewitterung mit einem den vier Jahreszeiten angepassten Ablauf von Belichtung, Temperatur und Regen.
- Verfahren 2: Permanente UV-Belichtung über einen imitierten Zeitraum von zwei Jahren.

Die objektive Beurteilung des Farbverhaltens und der Farbänderungen der untersuchten Proben (Bewitterungs-, Belichtungs- und Referenzproben) erfolgte nach dem CIE L*a*b*-System (Comission International de l'Éclairage) mit einem Farbwertmessgerät Minolta DP-301 (die Farbwertermittlung erfolgte bei den Belichtungsproben alle 24 h, bei den Bewitterungsproben nach jeder simulierten Jahreszeit).

Um einen direkten Vergleich der Methoden nicht nur graphisch sondern auch visuell zu dokumentieren, wurden die Proben zu Beginn der Versuchsreihe sowie nach deren Beendigung photographisch abgelichtet (siehe Abbildung 2). Anhand dieser Abbildungen

wird die durch beide Verfahren erzielte signifikante Abnahme der Helligkeits-, Rot-, und Grünwerte anschaulich dargestellt. Die Farbe der Holzoberfläche veränderte sich unabhängig vom Verfahren innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeit von anfänglich rot-braun nach dunkelbraun-grau.



Abbildung 2: Farbverhalten der unbehandelten Holzoberflächen nach künstlicher Bewitterung und Belichtung (links) Proben nach Bewitterung, (Mitte) ohne Behandlung (Ursprungsfarbtone), (rechts) nach künstlicher UV-Belichtung.

Der Verlauf bzw. die Veränderung der Farbwerte nach der künstlichen Bewitterung und Belichtung sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt. Bei der Bewitterung stabilisiert sich die Änderung (Abnahme) des L^* Farbwertes (Weiß/Schwarz) nach dem ersten Intervall (Frühling), die a^* - (Rot/Grün), b^* - (Gelb/Blau) Wert-Änderung stagniert in ihrem Verlauf erst nach dem dritten Intervall (Herbst). Die Farbort (E) Änderung, die als Kombination der L^* -, a^* -, b^* -Werte einen insgesamt harmonisierteren Kurvenverlauf darstellt, ändert sich nach dem zweiten Intervall (Sommer) nur noch unerheblich. Die bei der künstlichen UV-Belichtung ermittelte Farbwert- und Farbortänderung stabilisierte sich in ihrem Verlauf bereits nach den ersten 24 Stunden künstlicher Belichtung, was einer realen Sonneneinstrahlung von 280 Sonnenscheinstunden im Sommer auf der Insel Sylt entspricht (ca. 1-2 Monate im Hochsommer).

Die Abweichungen im Farbwertverlauf der beiden Prüfungen lassen sich auf die systematischen Unterschiede der Verfahren zurückführen. Insgesamt kann unabhängig voneinander gezeigt werden, dass sich die anfänglichen Veränderungen der Farbwerte vom Ursprungsfarbtone rot-braun nach dunkelbraun-grau, innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeit einstellen und sich anschließend UV-stabil auf einem vergleichbaren Niveau halten (siehe Abbildungen 3 und 4). Das Vergrauen der unbehandelten Holzoberfläche durch eine intensive UV-Lichteinwirkung muss auf den photochemischen Abbau des Lignins zurückgeführt werden (Németh und Faix 1994). Als auffällig zeigt sich eine starke Rissbildung auf den Stirn- und Längsflächen in radialer Richtung bei der UV-Belichtung. Diese Risse sind zum einen auf die starke Erwärmung und dadurch bedingte extreme Austrocknung der Oberfläche durch die Wärmestrahlung der UV-Lampen (entspricht der

natürlichen Erwärmung einer Terrassenoberfläche durch Sonneneinstrahlung), zum anderen auf die holzartbedingte Neigung zur Rissbildung zurückzuführen (siehe Abbildung 1).

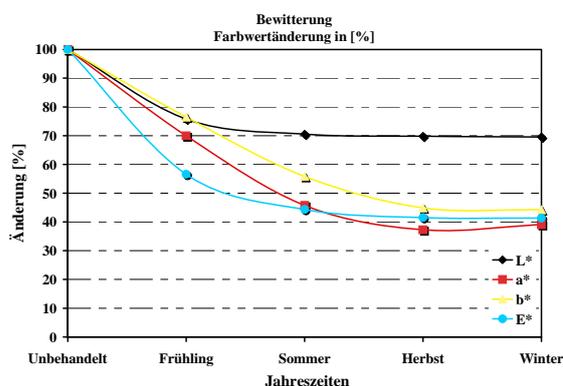


Abbildung 3: Verlauf der L*a*b* Werte zur Charakterisierung des Farbverhaltens nach künstlicher Bewitterung mit Angabe des Farbortes E*.

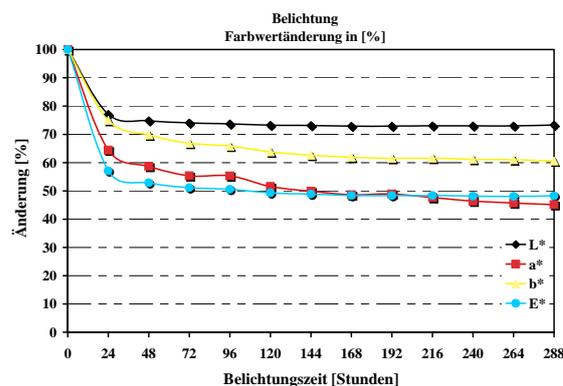


Abbildung 4: Verlauf der L*a*b* Werte zur Charakterisierung des Farbverhaltens nach künstlicher UV Belichtung mit Angabe des Farbortes E*.

Verarbeitungseigenschaften von Massaranduba

Im Folgenden werden weitere holzartbedingte Eigenschaften für Massaranduba, die bei der Erstellung und Handhabung der Prüfkörper aufgefallen sind, vorgestellt. Aufgrund der hohen Rohdichte ist das Holz schon in geringeren Dimensionen schwer zu handhaben, die Bearbeitung der Oberfläche ist problemlos, durch den Wechseldrehwuchs ergeben sich jedoch partiell leichte Oberflächenaustrisse (im speziellen beim Dickenhobel). Beim Ablängen der Probenabschnitte weist das Holz ein geringfügig sprödes, kurzfasriges Verhalten auf, was sich in Ausrissen an der Schnittfläche zeigt. Holzinterne Spannungen konnten beim Zuschnitt nicht beobachtet werden, was auch nicht zu erwarten war, da es sich bei dem Ausgangsmaterial nicht um Stammware, sondern um bereits aufgetrennte Konstruktionshölzer handelte. Eine Bearbeitung mit Handwerkzeugen stellt sich aufgrund der großen Härte als erschwert dar (Schrauben müssen vorgebohrt werden). Im Zuge der Bearbeitung wurde eine Reizung der Schleimhäute durch den Schleifstaub bemerkt. Das Verleimen der Holzproben erfolgte ohne weitere Schwierigkeiten und wird somit als problemlos betrachtet.

Schlussfolgerung

Die aus Südamerika stammende Holzart Massaranduba wurde hinsichtlich ihrer Gebrauchs- und Verwendungseigenschaften für den Garten- und Landschaftsbau (Terrassendielen) untersucht. Da für dieses Importholz, das seit ca. 2 Jahren als Austausch für das etablierte Bangkirai auf dem Deutschen Holzmarkt angeboten wird noch keine standardisierten Kennwerte vorliegen, erfolgte eine Eignungsprüfung nach den wesentlichen Kriterien Dauerhaftigkeit, physikalisch-technologische Eigenschaften und Bewitterungseinflüsse.

Nach Auswertung der biologischen und physikalischen Prüfungen sowie der Bewitterung/UV-Belichtung kann dem geprüften Sortiment der Holzart Massaranduba – *sofern grundlegende Bedingungen der Trocknung erfüllt sind* – eine uneingeschränkte Eignung für den Einsatz im konstruktiven Aussenverbau in den Gebrauchsklassen 1-4 nach DIN EN 460 [1994] ausgesprochen werden.

Literaturverzeichnis:

- Dahms, K.-G. (1980): Atlas der tropischen Hölzer, Band II. ATIBT, 248 S.
- Gottwald, H. (1958): Handelshölzer, Ihre Benennung, Bestimmung und Beschreibung. Ferdinand Holzmann Verlag Hamburg, 256 S.
- Koch, G. (2006): Hölzer für den Garten- und Landschaftsbau. Holz-Zentralblatt, Nr. 30, S. 873.
- Németh, K.; Faix, O. (1994): Beobachtung der Photodegradation des Holzes durch quantitative DRIFT-Spektroskopie. Holz als Roh- und Werkstoff 52, S. 261-266.
- Richter, H.G.; Gottwald, H. (1996): Balau, Bangkirai, Selangan Batu No.1 – Information leaflet (p. 576) in: A. Schulte und D. Schoene (eds): Dipterocarp Forest Ecosystems. World Scientific, Singapore.
- Richter, H.G.; Oelker, M. (2004 onwards): MacroHOLZdata, Computergestützte Bestimmung und Beschreibung von Nutzhölzern. Version 2006.
- Sell, J. (1989): Eigenschaften und Kenngrößen von Holzarten. Baufachverlag, Zürich, 87 S.

Verwendete Normen

- DIN EN 113 (September 1996): Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten. Berlin, Beuth Verlag, 25 S.
- DIN EN 350-1 (Oktober 1994): Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz. Berlin, Beuth Verlag, 10 S.
- DIN EN 350-2 (Oktober 1994): Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Teil 2: Leitfaden für die natürliche Dauerhaftigkeit und Tränkbarkeit von ausgewählten Holzarten mit besonderer Bedeutung in Europa. Berlin, Beuth Verlag, 10 S.
- DIN EN 460 (Oktober 1994): Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Leitfaden für die Anforderungen an die Dauerhaftigkeit von Vollholz für die Anwendung in den Gefährdungsklassen. Berlin, Beuth Verlag, 5 S.
- DIN EN 1534 (April 2000): Bestimmung des Eindruckwiderstandes (Brinell). Berlin, Beuth Verlag, 4 S.
- DIN 52 180-1 (November 1977): Prüfung von Holz, Probenahme Grundlagen, Teil 1. Berlin, Beuth Verlag, 2 S.
- DIN 52 182 (September 1976): Prüfung von Holz, Bestimmung der Rohdichte. Berlin, Beuth Verlag, 3 S.
- DIN 52 183 (November 1977): Prüfung von Holz, Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes. Berlin, Beuth Verlag, 2 S.
- DIN 52 184 (Mai 1979): Prüfung von Holz, Bestimmung der Quellung und Schwindung. Berlin, Beuth Verlag, 4 S.
- DIN 52 185 (September 1976): Prüfung von Holz, Bestimmung der Druckfestigkeit parallel zur Faser. Berlin, Beuth Verlag, 2 S.
- DIN 52 186 (Juni 1978): Prüfung von Holz, Biegeversuch. Berlin, Beuth Verlag, 4 S.
- DIN 52 192 (Mai 1979): Prüfung von Holz, Druckversuch quer zur Faserrichtung. Berlin, Beuth Verlag, 4 S.

Natürliche Dauerhaftigkeit Sibirischer Lärche

Untersuchung mehrerer Herkunftsgebiete - Inhaltsstoffe ursächlich für unterschiedliche Dauerhaftigkeit

Von PD Dr. Gerald Koch¹, Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein² und Marie-Therese Lenz³

¹ Herr PD Dr. Gerald Koch ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Holzbiologie und Holzschutz der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH), Hamburg.

² Herr Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein hat im Rahmen seiner Diplomarbeit Dauerhaftigkeitsprüfungen an verschiedenen Holzarten durchgeführt.

³ Frau Marie-Therese Lenz ist technische Mitarbeiterin in der Abteilung Holzbiologie des Zentrums Holzwirtschaft der Universität Hamburg.

Die natürliche Dauerhaftigkeit für Hölzer der Gattung *Larix* wird nach der aktuellen Fassung der DIN EN 350-2 für alle Arten (*Larix decidua* = Europäische Lärche, *L. kaempferi* = Japanische Lärche, *L. occidentalis* = Amerikanische Lärche) gleichrangig in die Dauerhaftigkeitsklasse 3 bis 4 eingestuft. Die anatomischen Strukturmerkmale und chemische Zusammensetzung des Holzgewebes der Sibirischen Lärche (*Larix gmelinii*, *L. sibirica*) lassen jedoch eine höhere Klassifizierung der natürlichen Dauerhaftigkeit erwarten. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden normgerechte Dauerhaftigkeitsprüfungen für die Sibirische Lärche an ausgewählten Proben der drei Herkunftsgebiete Irkutsk, Lesosibirsk und Ust Ilimsk durchgeführt.

Das Holzgewebe der Sibirischen Lärche (*Larix gmelinii* = Dahurische Lärche und *L. sibirica* = Sibirische Lärche) wird im Vergleich zur Europäischen Lärche (*Larix decidua*) durch einen engen Jahrringaufbau mit entsprechend hohem Spätholzanteil charakterisiert (vgl. Abbildung 1), wie er für die Europäische Lärche nur bei Qualitäten von Hochlagenstandorten (bedingt durch die kürzeren Vegetationszeiten) vorkommt. Der hohe Spätholzanteil ist verantwortlich für die vergleichsweise höhere (Roh-) Dichte des Holzgewebes der Sibirischen Lärche, wovon sich wiederum die physikalisch-mechanischen Eigenschaften (wie z.B. Festigkeiten und Härte) des Holzes ableiten lassen. Weiterhin können im Holzgewebe der Sibirischen Lärche höhere Konzentrationen an Harzen (Monoterpene und Harzsäuren) und phenolischen Inhaltsstoffen (Flavonoide) nachgewiesen werden (vgl. Koch 2006, Koch & Kulke 2006), was vermuten lässt, dass das Holzgewebe auch eine höhere natürliche Dauerhaftigkeit im Vergleich zur Europäischen und Amerikanischen Lärche besitzt. Um diese praxisrelevante Fragestellung – mit Hinblick auf die große Nachfrage und holzwirtschaftliche Bedeutung der Sibirischen Lärche – zu eruieren, wurde die natürliche Dauerhaftigkeit von *Larix sibirica* der drei verschiedenen Herkunftsgebiete Irkutsk, Lesosibirsk und Ust Ilimsk (Sibirien) untersucht. Das Untersuchungsmaterial in Form von 30 Brettabschnitten unterschiedlicher Stämme der aufgeführten Herkunftsgebiete wurde von der Firma Jacob Jürgensen Uni Wood GmbH (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Eine detaillierte standörtliche Zuordnung des

Untersuchungsmaterials innerhalb der einzelnen Wuchsgebiete war nicht möglich, da es sich um weiträumige Einzugsgebiete handelt und die Stämme auf zentralen Aufbereitungsplätzen ausgehalten wurden (vgl. Kulke 2006 und Koch & Kulke 2006).

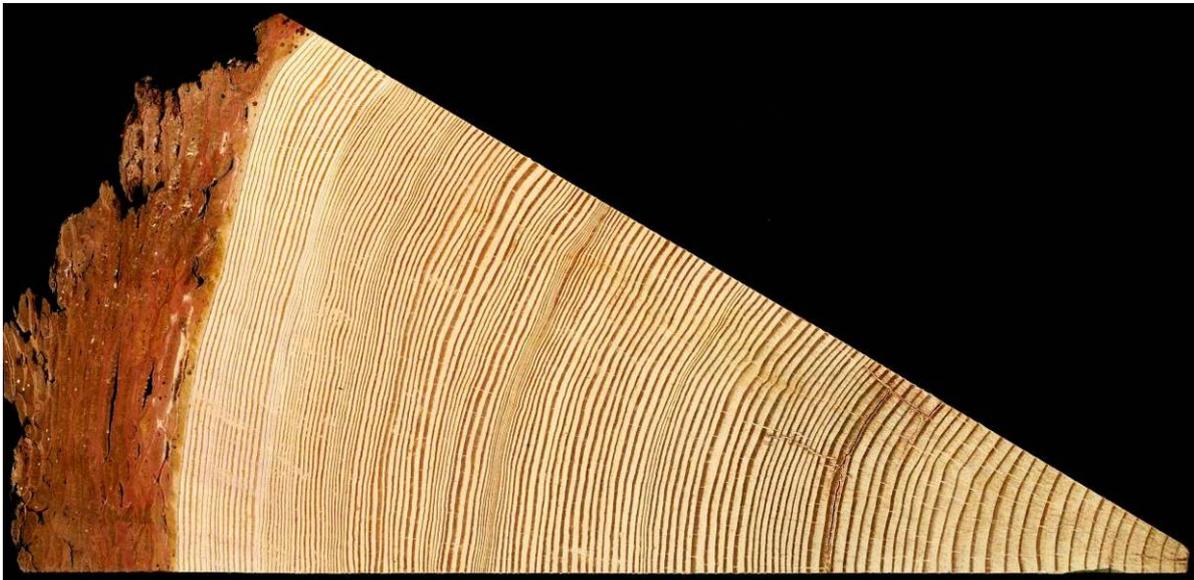


Abb. 1: Stammabschnitt einer Sibirischen Lärche mit dem typischen engringigen Jahrringverlauf und ausgeprägter Rinde (Borke)

Versuchsdurchführung

Die Auswahl und Vorbereitung der Prüfkörper für die Dauerhaftigkeitsprüfung erfolgte in Anlehnung an CEN/TS 15083-1:2005 Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Bestimmung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz gegen holzerstörende Pilze, Prüfverfahren - Teil 1: Basidiomyceten und DIN EN 350-1:1994 Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz, wonach aus den 30 Brettabschnitten insgesamt 240 normgerechte Einzelproben mit den Abmessungen von 50 x 25 x 15 mm³ hergestellt wurden. Die einzelnen Prüfkörper wiesen den für Sibirische Lärche spezifischen engringigen Aufbau mit Jahrringbreiten von ca. 0,5 mm bis maximal 4 mm auf (vgl. Abbildung 1).

Als obligatorische Prüfpilze für die Ermittlung der natürlichen Dauerhaftigkeit wurden nach EN 113:1996 Holzschutzmittel, Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten, Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit der Braunfäulepilz *Coniophora puteana* = Brauner Kellerschwamm und der Weissfäulepilz *Coriolus versicolor* = Schmetterlingsporling verwendet, die auch in der Praxis als bedeutende holzerstörende Pilze eingestuft werden. Im Rahmen der labortechnischen Prüfungen wurden die Prüfkörper zunächst bei 20 (±2)°C und 65 (±5)% rel. Luftfeuchte (Normklima) bis zur Gewichtskonstanz klimatisiert, anschließend durch eine Cobalt-60-Bestrahlung mit einer Solldosis von 25 kGy sterilisiert, unter sterilen Bedingungen dem Holzabbau der Prüfpilze ausgesetzt und der Masseverlust nach 16-wöchiger Abbauzeit bei 22 (±2)°C und 70 (±5)% rel. Luftfeuchte bestimmt. Als Virulenzkontrollen für die Abbauaktivität der beiden Prüfpilze dienten insgesamt 20 Prüfkörper aus dem Splintholz von Kiefer (*Pinus sylvestris* für *C. puteana*) und Buche (*Fagus sylvatica* für *C. versicolor*). Für die Bestimmung der Dauerhaftigkeitsklasse wird der

Prüfpilz herangezogen, der an den Prüfkörpern den höchsten Masseverlust verursacht hat. Der ermittelte Masseverlust der Prüfkörper wird dabei durch den Masseverlust der Virulenzkontrollen dividiert und der so erhaltene x-Wert den Dauerhaftigkeitsklassen zugeordnet (Mittelwertberechnung).

An Einzelproben wurde zusätzlich die Rohdichte für das Normklima bei 20 (± 2)°C und 65 (± 5)% rel. Luftfeuchte und die Darrdichte des absolut trockenen Holzgewebes nach DIN 52 182 Prüfung von Holz, Bestimmung der Rohdichte bestimmt.

Ergebnisse der Dauerhaftigkeitsprüfung

Die Ergebnisse der Masseverlustbestimmung zur Ermittlung der natürlichen Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche sind in der Tabelle 1 dargestellt. Der höchste Masseverlust wurde erwartungsgemäß durch den Braunfäulepilz *C. puteana* erzielt, der im Wesentlichen die Cellulose und Hemicellulosen im Holzgewebe abbaut. Die Auswertung der prozentualen Masseverluste durch *C. puteana* zeigt für das gesamte Kollektiv der drei Herkunftsgebiete eine erhebliche Streuung der Einzelwerte von sehr geringen (2,5%) bis hohen Masseverlusten (bis zu 53,7%). Die daraus ableitbare Einstufung der natürlichen Dauerhaftigkeit (Berechnung des x-Wertes) ergibt eine Einteilung der einzelnen Prüfkörper in die Klasse 1 = „sehr dauerhaft“ bis Klasse 4 = „wenig dauerhaft“. Vergleichbare Ergebnisse konnten für den Holzabbau (Masseverlustbestimmung) durch den Weißfäulepilz *C. versicolor* ermittelt werden. Der berechnete Masseverlust variiert von 1,4% bis 24,3% was unter Berücksichtigung des Holzabbaus der Virulenzkontrollen zu einer Einstufung in die Dauerhaftigkeitsklassen 1 bis 5 führt.

Innerhalb der einzelnen Kollektive – getrennt nach den Herkunftsgebieten – können ebenfalls Variationen der natürlichen Dauerhaftigkeit von Klasse 1 bis 4 für den Holzabbau durch den Braunfäulepilz *C. puteana* nachgewiesen werden. Es ist jedoch auffällig, dass die Proben aus dem Einzugsgebiet Irkutsk den höchsten Anteil an Hölzern der Dauerhaftigkeitsklasse 1 besitzen. Der Anteil der Proben der Dauerhaftigkeitsklasse 1 beträgt für das Herkunftsgebiet Irkutsk 42%. Die Ermittlung der Dauerhaftigkeitsklasse für das Gesamtkollektiv Irkutsk führt zu einer Einstufung in die Dauerhaftigkeitsklasse 2 = „dauerhaft“ (Mittelwertbetrachtung), wogegen die Hölzer der Herkunftsgebiete Lesosibirsk und Ust Ilimsk in die Klasse 3 = „mäßig dauerhaft“ nach DIN EN 350-2 eingestuft werden müssen.

Tabelle 1: Ergebnisse der Rohdichte- und Masseverlustbestimmung der einzelnen Prüfkörper des Kernholzes der Sibirischen Lärche aus den drei Herkunftsgebiete Lesosibirsk, Ust Ilimsk und Irkutsk

Untersuchungsmaterial			Masseverlustbestimmung		
Herkunft	Prüfkörper	Rohdichte bei Normklima ρ [g/cm ³]	Braunfäule <i>C. puteana</i> Mv [%]	Weissfäule <i>C. versicolor</i> Mv [%]	
Lesosibirsk	A-24	0,73	3,6	7,7	
	A-15	0,72	14,4	14,4	
	A-22	0,80	18,4	10,6	
	A-21	0,75	24,5	12,4	
	A-23	0,63	31,3	15,9	
	A-17	0,72	36,4	13,8	
	A-16	0,67	43,6	17,6	
	A-20	0,60	50,4	24,3	
			Mittelwert 0,70		
	Ust Ilimsk	B-02	0,71	3,6	6,1
B-09		0,76	11,0	7,5	
B-06		0,72	15,1	11,3	
B-12		0,72	18,6	8,0	
B-11		0,64	18,8	8,5	
B-03		0,69	27,4	12,6	
B-04		0,62	27,8	16,0	
B-08		0,70	46,9	19,5	
B-07		0,66	48,1	19,9	
B-01		0,60	53,7	19,0	
		Mittelwert 0,68			
Irkutsk	C-34	0,76	2,5	1,4	
	C-28	0,76	2,8	1,6	
	C-32	0,77	4,6	2,5	
	C-25	0,78	5,8	6,0	
	C-36	0,82	7,5	2,5	
	C-35	0,76	9,5	6,5	
	C-26	0,71	10,1	4,5	
	C-30	0,74	16,5	10,8	
	C-27	0,63	28,2	17,7	
	C-29	0,65	31,6	14,1	
	C31	0,77	34,9	14,8	
	C-33	0,61	47,9	20,3	
		Mittelwert 0,73			
Virulenzkontrollen					
Kiefer-Splint			66,1		
Buche				26,6	

Um den Zusammenhang zwischen der großen Variabilität der ermittelten Masseverluste und den Strukturmerkmalen der Prüfkörper zu untersuchen, wurden die Rohdichte und Jahrringbreiten (Spätholzanteil) der einzelnen Proben bestimmt. Die Auswertung der Rohdichte (bei 12-15% Holzfeuchte) ergibt für das Gesamtkollektiv der Prüfkörper aus den drei Herkunftsgebieten einen Mittelwert von $0,71 \text{ g/cm}^3$ (Standardabweichung $0,06 \text{ g/cm}^3$) (Abbildung 2). Dieser Wert liegt im oberen Variationsbereich der in der Literatur für Sibirische Lärche angegebenen Rohdichte von $0,55$ bis $0,77 \text{ g/cm}^3$ bei 15% Holzfeuchte.

Im Vergleich der drei Herkunftsgebiete weist das Kollektiv der Prüfkörper aus Irkutsk die höchste mittlere Rohdichte = $0,73 \text{ g/cm}^3$ auf (Lesosibirsk = $0,70 \text{ g/cm}^3$, Ust Ilimsk = $0,68 \text{ g/cm}^3$), für die auch die geringsten Masseverluste ermittelt wurden. Die statistische Auswertung (Regressionsanalyse) des Zusammenhangs zwischen der Rohdichte und dem Masseverlust infolge des Holzabbaus durch den Braunfäulepilz *C. puteana* ergibt für das Gesamtkollektiv aller Proben ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,49$ (Abbildung 3) was bedeutet, dass nur eine „geringe“ Korrelation zwischen der Rohdichte und dem Masseverlust der Proben besteht und die guten bis sehr guten Dauerhaftigkeitsklassen der einzelnen Prüfkörper nicht ausschließlich über eine hohe Rohdichte erklärt werden können. Für das Kollektiv der Prüfkörper aus dem Herkunftsgebiet Irkutsk (mit den höchsten Rohdichten und geringsten Masseverlusten) kann ein geringfügig erhöhtes Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,54$ berechnet werden, was ebenfalls keine statistisch abgesicherte Interpretation des Zusammenhangs zwischen der Rohdichte und dem Masseverlust zulässt.

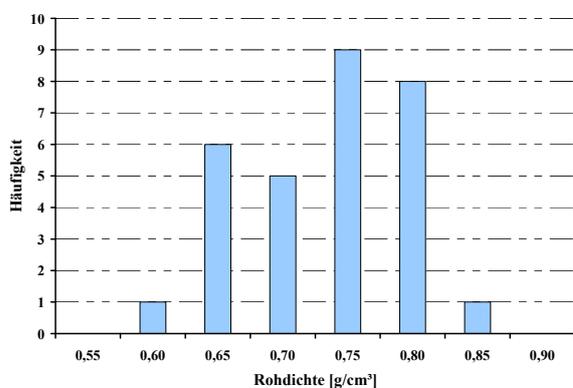


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der Rohdichte für die untersuchten Prüfkörper der Sibirischen Lärche aus den drei Herkunftsgebiete Irkutsk, Lesosibirsk und Ust Ilimsk

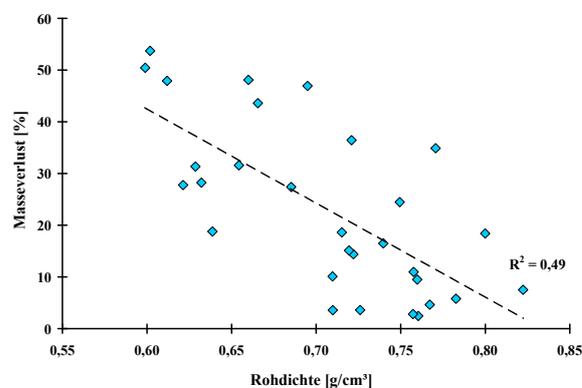


Abbildung 3 : Regressionsanalyse für die Parameter Rohdichte und Masseverlust (Holzabbau durch den Braunfäulepilz *C. puteana*)

Die Auswertung der Jahrringbreiten zeigt ebenso wie die physikalische Kenngröße der Rohdichte keinen statistisch abgesicherten Zusammenhang zwischen der Jahrringbreite der Prüfkörper und dem Masseverlust durch die beiden Prüfpilze. In den einzelnen Kollektiven (sortiert nach den Herkunftsgebieten) der Prüfkörper sind jeweils Proben mit geringen Masseverlusten (entsprechend den Dauerhaftigkeitsklassen 1 und 2) enthalten, die sowohl durch einen sehr engringigen (Jahrringbreiten deutlich unter 1 mm) als auch durch einen relativ breiten Jahringaufbau (Jahrringbreiten bis 4 mm) charakterisiert werden (siehe Abbildung 4). Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch für die Prüfkörper mit hohen

Masseverlusten (Dauerhaftigkeitsklassen 3-4) erzielt, die ebenfalls aus Mustern mit engeringigen und relativ breiten Jahrringen bestehen.

Da kein abgesicherter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern Rohdichte/Jahrringbreite und dem Masseverlust festgestellt werden konnte, wurden zusätzlich quantitative chemische Analysen zur Bestimmung der Extraktstoffgehalte durchgeführt. Bereits die visuelle Ansprache der einzelnen Prüfkörper der drei Herkunftsgebiete hat gezeigt, dass die Einzelproben mit der intensivsten rötlichen Farbausprägung des Kernholzes auch die geringsten Masseverluste aufweisen (Abbildung 4). Daraus lässt sich hypothetisch ableiten, dass in den Proben mit intensiverer Kernholzfarbe auch höhere Konzentrationen an phenolischen/flavonoiden Inhaltsstoffen eingelagert wurden, die maßgeblich für die Dauerhaftigkeit des Kernholzes verantwortlich sind. Um diesen Zusammenhang zu eruieren, wurde der Extraktstoffgehalt an ausgewählten Proben mit geringem und hohem Masseverlust gravimetrisch nach sukzessiver Extraktion mit Petrolether und Aceton/Wasser (9:1) bestimmt. Für die chemischen Analysen wurden jeweils die äquivalenten Rückstellproben der Feuchtekontrollen verwendet.



Abbildung 4: Visuelle Ansprache (Sortierung) der untersuchten Prüfkörper (Holzabbau durch den Braunfäulepilz *C. puteana*) nach den ermittelten Dauerhaftigkeitsklassen (DHK) und Aceton/Wasser-Extraktstoffgehalt für die Proben der Dauerhaftigkeitsklassen 1 und 4 (v. l. n. r.): DHK 4, 3, 2-3, 2, 1-3, 1-2 und 1. Der DHK 4 entspricht ein Aceton-/Wasser-Extraktionsgehalt von 1,33%, der DHK 1 ein Gehalt von 2,13% ([%] bezogen auf atro Holz)

Die Auswertung der quantitativen (gravimetrischen) Extraktstoffbestimmung belegt eindeutig, dass in den Proben mit der höchsten natürlichen Dauerhaftigkeit (Klasse 1) auch die höchsten Konzentrationen an phenolischen/flavonoiden Inhaltsstoffen gemessen werden können (Abbildung 4). Für die Proben der Dauerhaftigkeitsklasse 1 beträgt der Anteil der Inhaltsstoffe der Aceton/Wasser-Extrakte im Mittel 2,13% (bezogen auf atro Holz), wogegen für die Proben der Dauerhaftigkeitsklasse 4 im Mittel nur 1,33% Extraktstoffanteil bestimmt werden konnte (vgl. Kulke (2006) und Venalainen et al. (2006), die vergleichbare Extraktstoffgehalte im Kernholz der Sibirischen Lärche nachgewiesen haben). Die quantitative Auswertung der Petrolether-Extrakte (Nachweis von Harz- und Fettsäuren) zeigt dagegen keine signifikanten Unterschiede im Gehalt zwischen den Proben der Dauerhaftigkeitsklasse 1 (Mittelwert 0,46% bezogen auf atro Holz) und der Dauerhaftigkeitsklasse 4 (Mittelwert 0,43%

bezogen auf atro Holz), was belegt, dass die natürliche Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche maßgeblich auf die Synthese und Einlagerung von

phenolischen/flavonoiden Verbindungen zurückgeführt werden muss. Das Kollektiv der Proben der Dauerhaftigkeitsklasse 1 mit den höheren Gehalten an Aceton/Wasser-Extrakten weist ebenso wie das Kollektiv der Dauerhaftigkeitsklasse 4 (niedrigerer Extraktstoffgehalt) einzelne Proben mit sehr engeringigen und relativ breiten Jahrringen auf, was zusätzlich belegt, dass kein abgesicherter statistischer Zusammenhang zwischen der Jahrringbreite/Dichte und der natürlichen Dauerhaftigkeit des Holzgewebes besteht, die vielmehr auf die Konzentration der phenolischen Inhaltstoffe zurückgeführt werden muss.

Zusammenfassung:

Die natürliche Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche der untersuchten Herkunftsgebiete Irkutsk, Lesosibirsk und Ust Ilimsk wird durch eine Variation der Einzelproben in die Dauerhaftigkeitsklassen 1 = „sehr dauerhaft“ bis Klasse 4 = „wenig dauerhaft“ charakterisiert. Nach DIN EN 350-2 können die Proben aus dem Herkunftsgebiet Irkutsk in die Dauerhaftigkeitsklasse 2 = „dauerhaft“, die der Herkunftsgebiete Lesosibirsk und Ust Ilimsk in die Klasse 3 = „mäßig dauerhaft“ eingestuft werden. Diese Werte (Klassifizierung) liegen über den Dauerhaftigkeitsklassen die nach DIN EN 350-2 für die Europäische und Japanische Lärche (*L. decidua* und *L. kaempferi*) angegeben werden (jeweils Dauerhaftigkeitsklasse 3 bis 4).

Die Ursache für die höhere Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche muss im wesentlichen auf die Synthese und Einlagerung von phenolischen/flavonoiden Inhaltsstoffen zurückgeführt werden, wogegen zwischen der Rohdichte/Jahrringbreite und den ermittelten Masseverlusten durch den Pilzabbau keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden konnten. Das Kernholz der untersuchten Sibirischen Lärche ist aufgrund der ermittelten Dauerhaftigkeitsklassen 2 und 3 für die Verwendung im Aussenbereich (ohne direkten Erdkontakt) ohne chemischen Holzschutz geeignet.

Ergänzende Literatur:

- Koch, G.; Kulke, N.: Holzverfärbungen bei Sibirischer Lärche. Holz-Zentralblatt 132 (2006), 488.
- Koch, G.: Standortbedingte Einflüsse auf die Entstehung von Verkernungsanomalien bei Lärche (*Larix* spp.) und deren Bedeutung für die Holzverwendung. In: Proceedings Forstwissenschaftliche Tagung 2006 – Ökosystem Wald, Rohstoff Holz, Prinzip Nachhaltigkeit, Tharandt, Hrsg: H. Röhle, (2006) 86, ISBN 3-86005-541-0.
- Kulke, N.: Biologische und chemische Untersuchungen über Holzverfärbungen an Sibirischer Lärche (*Larix sibirica* L.) und deren Bedeutung für die Holzverwendung, Zentrum Holzwirtschaft Abteilung Holzbiologie der Universität Hamburg. (2006), 151 S.
- Venalainen, M.; Harju, A.M.; Terziev, N.; Laakso, T.; Saranpää, P.: Decay resistance, extractive content, and water sorption capacity of Sibirian larch (*Larix sibirica* Lebed.) heartwood timber. Holzforschung 60 (2006), 99-103.

Wie dauerhaft ist die Sibirische Lärche?

Wissenschaftliche Untersuchungen am vTI in Hamburg bestätigen praktische Erfahrungen

Von Mathias Rehbein¹ und PD Dr. Gerald Koch²

¹ Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein ist Wissenschaftlicher Angestellter am Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB), Fachbereich Holzqualität und Holzabbau durch Pilze; Laufende Promotion an der Universität Hamburg.

² Privatdozent Dr. Gerald Koch ist Wissenschaftlicher Oberrat am Institut für Holzbiologie und Holzschutz (HTB) des vTI. Fachbereich Holzeigenschaften und Holzstruktur.

Im Handel werden aktuell die Sortimenten Europäische Lärche (*Larix decidua*, LADC) und Sibirische Lärche (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, LAGM) angeboten. Aufgrund der Wuchsbedingungen in Sibirien, die zu einem besonders feinen und gleichmäßigen Jahrringaufbau mit hohem Spätholzanteil bei der Sibirischen Lärche führen, sind insbesondere bei der natürlichen Dauerhaftigkeit bessere Werte im Vergleich zur Europäischen Lärche zu erwarten. In der DIN EN 350-2 ist die Sibirische Lärche bisher nicht gesondert aufgeführt. Die gelisteten Arten *L. decidua*, *L. kaempferi*, *L. x eurolepis* und *L. occidentalis* werden als mäßig bis wenig dauerhaft (DHK 3-4) eingestuft.

Um die natürliche Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche beurteilen zu können, wurden im Jahr 2007 an der damaligen Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft umfangreiche Laborprüfungen entsprechend CEN/TS 15083-1:2005 (Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten - Bestimmung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz gegen Holz zerstörende Pilze, Prüfverfahren – Teil 1: Basidiomyceten) und DIN EN 350-1:1994 (Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz) durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial bestand aus 30 Brettabschnitten (240 Prüfkörper) unterschiedlicher Stämme aus drei Herkunftsgebieten in Sibirien (Irkutsk, Lesosibirsk, Ust Ilimsk) und wurde 16 Wochen gegen einen Holzabbau durch die Prüfpilze *Coniophora puteana* und *Trametes (Coriolus) versicolor* getestet. Die natürliche Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche der untersuchten Herkunftsgebiete Irkutsk, Lesosibirsk und Ust Ilimsk wurde durch eine Variation der Einzelproben entsprechend den Dauerhaftigkeitsklassen 1 (= „sehr dauerhaft“) bis 4 (= „wenig dauerhaft“) charakterisiert. Entsprechend der Auswertung nach DIN EN 350-1 konnten die Prüfkörper aus dem Herkunftsgebiet Irkutsk in die **Dauerhaftigkeitsklasse 2** (= „dauerhaft“), die der Herkunftsgebiete Lesosibirsk und Ust Ilimsk in die **Dauerhaftigkeitsklasse 3** (= „mäßig dauerhaft“) eingestuft werden. Die Ergebnisse der Dauerhaftigkeitsprüfung für die drei untersuchten Kollektive Sibirische Lärche ergaben somit eine bessere Einstufung als die in der Norm DIN EN 350-2 angegebene Klassifizierung der Europäischen, Japanischen und Nordamerikanischen Lärche (Dauerhaftigkeitsklasse 3 bis 4) (siehe Holz-Zentralblatt Nr. 22, 2007). Durch ergänzende Extraktstoffbestimmungen sowie Jahrringmessungen konnte die Ursache für die erhöhte Dauerhaftigkeit der Sibirischen Lärche im Wesentlichen auf

eine erhöhte Synthese und Einlagerung von phenolischen/flavonoiden Inhaltsstoffen und weniger auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen Rohdichte/Jahrringanzahl zurückgeführt werden. Da die quantitative Analyse der Holzinhaltsstoffe für den Holzhandel, insbesondere beim Einkauf bzw. im Zuge der Qualitätssortierung, nicht als praktikabel anzusehen ist, wurde im Jahr 2009 ein stark erweiterter Versuch mit einem handelsüblichen Sortiment Sibirischer Lärche durchgeführt. Ziel der weiterführenden Untersuchungen war es, neben einer Bestätigung der Dauerhaftigkeitsergebnisse, der Praxis Sortierkriterien an die Hand zu geben (z. B. entsprechende Rohdichteklassen), nach denen eine Qualitätssortierung der Sibirischen Lärche erfolgen kann.

Aktuelle Untersuchungen

Das Untersuchungsmaterial für die weiterführenden bzw. ergänzenden Versuche wurde vom Gesamtverband Deutscher Holzhandel (GD-Holz) bereitgestellt. Um die Laborprüfungen möglichst praxisnah zu gestalten, erfolgte keine Vorsortierung entsprechend der Herkunftsgebiete (wie es 2007 der Fall war), da Informationen über lokale Herkünfte für den Endverbraucher in der Regel nicht verfügbar sind. Die aktuellen Untersuchungen wurden im Vergleich zu den Prüfungen aus dem Jahr 2007 erheblich erweitert, indem eine größere Anzahl an Prüfkörpern (400 gegenüber 240 im ersten Versuch) sowie ein weiterer Prüfpilz (*Oligoporus (Poria) placenta*, Braunfäule) verwendet wurden. Zusätzlich wurden umfangreiche quantitative Extraktstoffbestimmungen (Accelerated Solvent Extraction vom Typ ASE 200, DIONEX) sowie Jahrringmessungen inklusive Rohdichtebestimmung durchgeführt, um der Praxis eine Qualitätssortierung innerhalb des Handelssortimentes Sibirische Lärche zu ermöglichen.

Dauerhaftigkeitsprüfung

Die Bestimmung der Dauerhaftigkeit wurde in Anlehnung an DIN EN 350-1:1994 (Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz), DIN CEN/TS 15083-1:2005 (Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten) und EN 113:1996 (Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten) im Laborversuch durchgeführt.

Es wurden zur Bestimmung der natürlichen Dauerhaftigkeit drei unterschiedliche Prüfpilze verwendet.

Zum einen der nach EN 113 obligatorische Prüfpilz *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fries), Karsten (Stamm BAM Ebw. 15), als zweiter Prüfpilz *Oligoporus (Poria) placenta* (Fries), Cooke sensu J. Eriksson, (Stamm FPRL 280) und als zusätzlicher Prüfpilz *Coriolus versicolor* (Linneus), Quelet (Stamm CTB 863 A). Bei den Prüfpilzen handelt es sich um Basidiomyceten, welche als Standard Prüfpilze Verwendung finden.

Coniophora puteana, im Volksmund als Brauner Kellerschwamm bekannt, befällt bevorzugt Nadelholz, ist aber auch imstande einen Masseverlust bei Laubhölzern hervorzurufen. Er ist einer der bedeutendsten holzabbauenden Gebäudepilze in Mitteleuropa und gilt als der häufigste Hausfäuleerreger in Neubauten (bedingt durch die anfänglich erhöhte Holzfeuchtigkeit im Neubau). Des Weiteren kommt er in feuchten Altbauten vor und befällt Boote, Masten und Fenster, benötigt dort aber eine Holzfeuchte von mindestens 21,5% (Optimum $u = 36-210\%$) (HUCKFELDT und SCHMIDT 2006).

Der zweite Prüfpilz, *Oligoporus (Poria) placenta* oder Rosafarbener Saftporling zählt zu den gebräuchlichen Testpilzen bei Nadelholz-Prüfungen und bewirkt eine intensive helle Braunfäule.

Beim Braunen Kellerschwamm und dem Rosafarbenem Saftporling handelt es sich um Braunfäuleerreger, die Cellulose, Hemicellulosen und Pektine enzymatisch abbauen. Lignin bleibt im Holz vorhanden (Braunfärbung). Beim Trocknen des abgebauten Holzes kommt es bedingt durch den Celluloseabbau zu starker Rissbildung (Würfelbruch), bis hin zum pulvrigen Zerfall der gesamten Probe.

Auf mikroskopischer Ebene ist der Holzabbau im polarisierten Licht durch die Abnahme der Doppelbrechung kristalliner Bereiche der Cellulose infolge des Celluloseabbaus zu erkennen (nicht im Anfangsstadium eines Befalls).

Es erscheint wichtig darauf hinzuweisen, dass es im Verlauf eines Braunfäulebefalls zu einem schnellen Verlust der mechanischen Eigenschaften kommt; ein eindeutiger Hinweis auf den Holzabbau, wie z.B. spürbarer Masseverlust oder Verfärbungen des Befallsstückes, aber erst im späteren Befallsstadium auftritt.

Trametes versicolor (auch *Coriolus versicolor*) als Schmetterlings-Tramete bekannt, ist ein hauptsächlich an abgestorbenem Laubholz (Saprophyt, gerne Buche) auftretender Weißfäuleerreger, der lagerndes Rundholz, aber auch im Freien verbautes Holz wie z.B. Pfähle, Bahnschwellen und Gartenhölzer befällt (SCHMIDT 1994).

Bei einem Weißfäulebefall wird zwischen der selektiven Delignifizierung und einer Simultanfäule unterschieden. Bei der selektiven Delignifizierung findet, wie der Name andeutet, insbesondere im Anfangsstadium ein bevorzugter Abbau des Lignins statt. Mikroskopisch kann ein Abbau im Bereich der Mittellamelle/Primärwand und somit ein Auflösen des Zellverbundes beobachtet werden.

Die Abbauvorgänge bei einer Simultanfäule sind weniger spezialisiert, es kommt zu einem simultanen (gleichzeitigen) Abbau von Lignin, Cellulose und Hemicellulosen. Auf mikroskopischer Ebene ist bei einem Weißfäulebefall im Querschnitt ein simultaner Abbau der Zellwände, beginnend mit den tangential und nachfolgend den radial verlaufenden Zellwänden sowie der Mittellamelle, zu erkennen. Im Längsschnitt sind die typischen durch enzymatischen Abbau erzeugten Zellwanddurchbrechungen und Aushöhlungen der Zellwand i.d.R. mikroskopisch nachweisbar.

Der entscheidende Unterschied zum Holzabbau durch einen Braunfäuleerreger liegt im Abbau des Lignins, wodurch sich das Holzgewebe im Laufe des Pilzbefalls eher weißlich verfärbt (Cellulose) und einen weichen, faserigen Zustand einnimmt. Die mechanischen Eigenschaften des Holzes bleiben im Vergleich zur Braunfäule länger erhalten.

Jahrringanalyse

Um den Einfluss der Jahrringbreite auf die natürliche Dauerhaftigkeit des handelsüblichen Sortimentes Sibirische Lärche zu untersuchen, wurde die Anzahl der Jahrringe sowie deren Früh- und Spätholzanteil lichtmikroskopisch bestimmt (Abbildung 4). Die repräsentativen Proben (Parallelproben zur Feuchtekontrolle) mit einer definierten Querschnittsfläche von 15 x 25 mm² wiesen im Durchschnitt 26 Jahrringe (Minimum = 15, Maximum = 52) auf.

Quantitative Extraktstoffbestimmung

Für die quantitative Bestimmung der Extraktstoffgehalte wurden repräsentative Prüfkörper (Parallelproben zur Feuchtekontrolle) aus den zuvor ermittelten Dauerhaftigkeitsklassen ausgewählt. Die unbehandelten Referenzproben wurden zunächst gemahlen (definierte Partikelgröße von 3 mm) und anschließend mit Hilfe einer ASE-Einrichtung (Accelerated Solvent Extraction) sukzessive mit Lösungsmitteln (Petrolether, Aceton/Wasser (9:1)) extrahiert. Im Anschluss an die Extraktion wurden jeweils zwei Parallelen einer Probe (je 10 ml) zur gravimetrischen Bestimmung der gelösten Holzinhaltsstoffe in einer Aluschale auf einer Heizplatte bei 30-40°C zum Abdampfen des jeweilige Lösungsmittels erwärmt. Im nächsten Schritt wurde der Rückstand in einem Exsikkator abgekühlt, mit einer Analysewaage gravimetrisch bestimmt und mit dem Darrgewicht der Einwaage ins Verhältnis gesetzt. Die prozentuale Ausbeute an extrahierten Inhaltsstoffen wurde mit den zuvor ermittelten Ergebnissen der Dauerhaftigkeitsprüfung für die einzelnen Prüfkörper verglichen und ist in Abbildung 2 dargestellt.

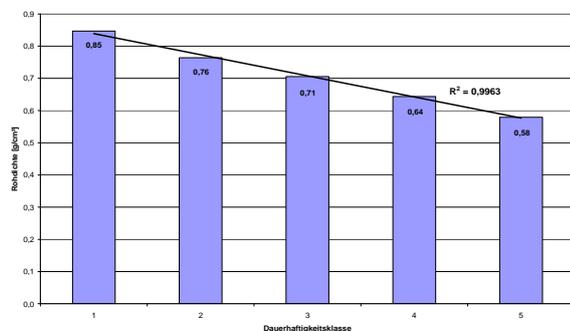


Abbildung 1: Rohdichtemittelwerte (Klima 20°C/65% rel. LF) entsprechend den ermittelten Dauerhaftigkeitsklassen dargestellt

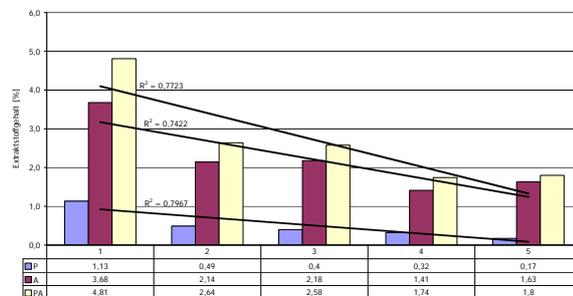


Abbildung 2: Prozentualer Extraktstoffgehalt nach Dauerhaftigkeitsklassen dargestellt. Darstellung auf X-Achse: 1 – 5 = Dauerhaftigkeitsklasse; P = Petrolether; A = Aceton/Wasser (9:1); PA = Summe P + A

Ergebnisse

Die erweiterten Untersuchungen zur Dauerhaftigkeit des Kernholzes der Sibirischen Lärche bestätigen die vorliegenden Ergebnisse aus dem Jahr 2007 (siehe Holz-Zentralblatt Nr. 22, 2007). Im Rahmen der aktuellen Prüfung konnte für ein handelsübliches Sortiment Sibirische Lärche, welches ohne Vorsortierung nach regionalen Herkünften untersucht wurde, eine Einstufung entsprechend DIN EN 350-1 in die **Dauerhaftigkeitsklasse 3** erfolgen. Insgesamt variieren die Ergebnisse der Dauerhaftigkeitsprüfung in Abhängigkeit von der Rohdichte (Ausgleichsfeuchte im Klima bei 20°C / 65% rel. Luftfeuchtigkeit) der einzelnen Prüfkörper. Hölzer mit einer Rohdichte < 0,70 g/cm³ liegen im Bereich der Dauerhaftigkeitsklassen 2 bis 4 - (5). Oberhalb einer Rohdichte von > 0,70 g/cm³ verliert sich die Streuung der Einzelwerte zunehmend, die Proben liegen alle im Bereich der Dauerhaftigkeitsklasse 3 und besser (Dauerhaftigkeitsklasse 1 bis 3, siehe Abbildung 3).

Die Auswertung der Korrelation zwischen der physikalische Kenngröße Rohdichte und dem ermittelten Masseverlust der einzelnen Prüfkörper zeigt mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$ eine sehr hohe Signifikanz (Abbildungen 1). Im Jahr 2007 konnte dieser

Zusammenhang aufgrund des geringeren Probenumfangs nicht so deutlich dargestellt werden, da bei abnehmender Individuenzahl die Extremwerte einen verstärkten Einfluss auf das Gesamtergebnis haben.

In den Prüfungen aus dem Jahr 2007 ergab die Auswertung der Jahrringbreiten ebenfalls keinen statistisch abgesicherten Zusammenhang zwischen den Jahrringbreiten der Proben und den ermittelten Masseverlusten durch die verwendeten Prüfpilze. In der aktuellen Untersuchung (2009) wurde die Jahrringanalyse, zusätzlich zur Auszählung der Jahrringe, um die Vermessung der Früh- und Spätholzanteile ergänzt. Der prozentuale Anteil an Früh- und Spätholz wird neben einer genetischen Ausprägung im Wesentlichen von den individuellen Wuchsbedingungen (v.a. Klimaeinflüsse) eines Baumes bestimmt. Bei den Nadelhölzern nimmt mit abnehmender Jahrringbreite (bis ca. 1 mm Breite) der Spätholzanteil zu. Da viele physikalische Eigenschaften mit der Dichte des Holzes korrelieren, hat der prozentuale Anteil des Spätholzes einen direkten Einfluss auf die Holzeigenschaften bzw. -qualitäten (REHBEIN 2009). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen kann deutlich gezeigt werden, dass die Prüfkörper mit einer höheren Dauerhaftigkeit (geringerem Masseverlust) auch einen signifikant höheren Spätholzanteil aufweisen (Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,90$ für die Korrelation von Spätholzanteil und Dauerhaftigkeitsklasse, siehe Abbildung 4).

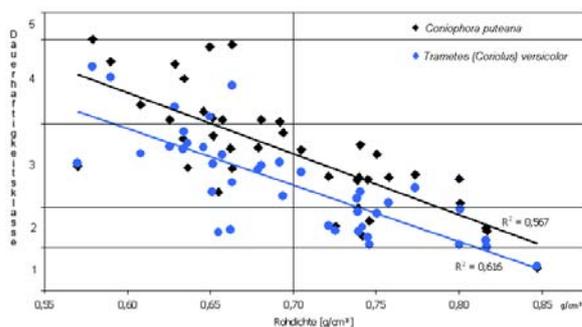


Abbildung 3: Dauerhaftigkeitsklassen nach Rohdichte abgebildet, ab einer Rohdichte von $0,70 \text{ g/cm}^3$ lagen alle Proben im Bereich \leq DHK 3

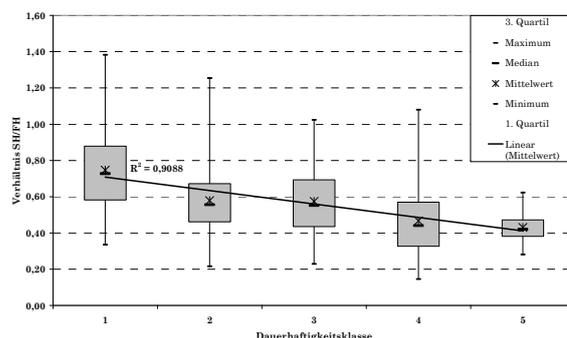


Abbildung 4: Jahrringanalyse; Verhältnis Spätholz/Frühholz entsprechend der Dauerhaftigkeitsklassen dargestellt. Eine hohe Verhältniszahl entspricht einem höheren Spätholzanteil

Die Auswertung der quantitativen Extraktstoffbestimmungen zeigt ebenfalls einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Dauerhaftigkeit und der gemessenen Konzentration an phenolischen/flavonoiden Inhaltsstoffen auf. Bereits die visuelle Ansprache der in Abbildung 5 dargestellten und nach den Ergebnissen der Dauerhaftigkeitsprüfung sortierten Proben zeigt, dass die Proben mit hohem Spätholzanteil, engen Jahrringen und intensiver Färbung des Kernholzes tendenziell dauerhafter sind, als helle Proben mit weiten Jahrringzuwachsen. Eine intensive Farbgebung des Holzes muss unter anderem auf die Einlagerung von phenolischen/flavonoiden Inhaltsstoffen zurückgeführt werden, die maßgeblich für die Dauerhaftigkeit des Kernholzes verantwortlich sind (Koch et al. 2007). Um diesen Zusammenhang durch analytische Labormethoden zu bestätigen, erfolgte eine sukzessive Extraktion mit Petrolether und

Aceton/Wasser (9:1). Der Extraktgehalt repräsentativer Proben wurde gravimetrisch bestimmt und mit den Ergebnissen der Dauerhaftigkeitsprüfung verglichen. Die Auswertung der Extraktstoffbestimmungen zeigt eindeutig eine Korrelation zu den Ergebnissen der Dauerhaftigkeitsprüfung auf. Die höchste natürliche Dauerhaftigkeit (DHK 1) korreliert mit dem höchsten bestimmten Extraktstoffgehalt. Insbesondere der Vergleich der Dauerhaftigkeitsklassen 2 – 3 und 4 – 5 weist signifikante Unterschiede bezogen auf die Extraktstoffgehalte der einzelnen Kollektive auf (Abbildung 2).



Abbildung 5: Prüfkörper (Sterilkontrollen) nach den ermittelten Dauerhaftigkeitsklassen (DHK) sortiert.

Zusammenfassung

Die aktuelle Dauerhaftigkeitsuntersuchung eines handelsüblichen Sortimentes Sibirische Lärche in Anlehnung an DIN EN 350-1:1994, DIN CEN/TS 15083-1:2005 und EN 113:1996 bestätigt die vorliegenden Ergebnisse aus dem Jahr 2007 und belegt, dass das Kernholz der Sibirischen Lärche im Vergleich zur Europäischen Lärche durch eine bessere Dauerhaftigkeit charakterisiert wird (siehe Holz-Zentralblatt Nr. 22, 2007). Durch ergänzende quantitative Extraktstoff- und Rohdichtebestimmungen sowie Jahrringmessungen erfolgte eine grundlegende Beurteilung des untersuchten Sortimentes hinsichtlich der maßgebenden, die Dauerhaftigkeit beeinflussenden Faktoren. Aufgrund der

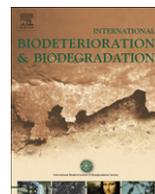
erzielten Ergebnisse, insbesondere der signifikanten Korrelation zwischen Rohdichte und Dauerhaftigkeit empfiehlt sich eine Rohdichte-Vorsortierung der Sibirischen Lärche für eine praxisnahe Zuordnung bzw. Beurteilung ihrer natürlichen Dauerhaftigkeit. Die Untersuchungen haben im Detail ergeben, dass Proben mit einer Rohdichte von $\geq 0,70 \text{ g/cm}^3$ Dauerhaftigkeitsklasse ≤ 3 (\leq „mäßig dauerhaft“) aufweisen und somit deutlich besser eingestuft werden können als die in der DIN EN 350-2:1994 für das Handelssortiment Lärche angegebene Dauerhaftigkeitsklasse 3 – 4 (= „mäßig“ – „wenig dauerhaft“). Bei den angewendeten Prüfverfahren handelt es sich um Laborprüfungen gegen holzabbauende Basidiomyceten (Pilze), eine Prüfung der Sibirischen Lärche hinsichtlich ihrer Dauerhaftigkeit gegen Moderfäulepilze (CEN/TS 15083-2:2005) bzw. eine Freilandprüfung im Erdkontakt entsprechend (EN 252:1989) steht noch aus.

Literatur

- CEN/TS 15083-1:2005: Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten- Bestimmung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz gegen holzerstörende Pilze, Prüfverfahren- Teil 1: Basidiomyceten.
- CEN/TS 15083-2:2005: Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten- Bestimmung der natürlichen Dauerhaftigkeit von Vollholz gegen holzerstörende Pilze, Prüfverfahren- Teil 2: Moderfäulepilze.
- 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.
- DIN EN 350-2:1994: Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten. Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Teil 2: Leitfaden für die natürliche Dauerhaftigkeit und Tränkbarkeit von ausgewählten Holzarten von besonderer Bedeutung in Europa.
- EN 113:1996: Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten, Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit.
- EN 252:1989: Freiland-Prüfverfahren zur Bestimmung der relativen Schutzwirkung eines Holzschutzmittels im Erdkontakt.
- Huckfeldt, T. und Schmidt, O.: Hausfäule- und Bauholzpilze. Diagnose und Sanierung. R. Müller, Köln (2006) 377 S.
- Koch, G.; Rehbein, M.; Lenz, M-T.: Natürliche Dauerhaftigkeit Sibirischer Lärche. Holz-Zentralblatt 22 (2007) S. 593 – 594.
- Rehbein, M.: Grundlagen des Quell- und Schwindverhaltens hölzerner Bauteile. In: Huckfeldt, T.; Wenk, H.-J. (Hrsg.) Holzfenster. R. Müller, Köln, 163-208, 2009.
- Schmidt, O.: Holz- und Baumpilze. Springer, Berlin (1994) 246 S.

Danksagung

Die Autoren danken dem Gesamtverband Deutscher Holzhandel (GD-Holz) für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.



Review

Topochemical investigation of early stages of lignin modification within individual cell wall layers of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sapwood infected by the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv.

Mathias Rehbein*, Gerald Koch

Institute for Wood Technology and Wood Biology, Federal Research Institute of Rural Areas, Forestry and Fisheries (vTI), Leuschnerstr. 91d, 21031 Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2011

Received in revised form

5 April 2011

Accepted 5 April 2011

Available online 14 September 2011

Keywords:

*Antrodia vaillantii**Pinus sylvestris*

Wood degradation

Lignin modification

Topochemistry

Universal microspectrophotometry

ABSTRACT

The initiation and progress of wood degradation of *Pinus sylvestris* sapwood exposed to the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* was studied on a cellular level by scanning UV microspectrophotometry (UMSP 80, Zeiss, MSP 800 Spectralytics). This improved analytical technique enables direct imaging of lignin modification within individual cell wall layers. The topochemical analyses were supplemented by light and transmission electron microscopy (TEM) studies in order to characterize morphological changes during the first days of degradation. Small wood blocks (1.5 × 1.5 × 5 mm) of Scots pine (*P. sylvestris*) were exposed to fungal decay by *A. vaillantii* for 3, 7, 11, 16, and 22 days. No significant weight loss was determined in the initial decay periods within three up to 7 days. After three days of decay the topochemical investigation revealed that the lignin modification starts at the outermost part of the secondary wall layer, especially in the region of the latewood tracheids. During advanced degradation after exposure of 22 days, lignin modification occurs non-homogeneously throughout the tissue. Even among the significantly damaged cells, some apparently unmodified cells still exist. Knowledge about lignin modification at initial stages of wood degradation is of fundamental importance to provide more information on the progress of brown-rot decay.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	913
2. Materials and methods	914
2.1. Sample exposure to the fungi	914
2.2. Sample embedding and microscopic analysis	914
2.3. Light microscopy and cellular scanning UV microspectrophotometry	915
2.4. Transmission electron microscopy	915
3. Results and discussion	915
3.1. Light and polarized light microscopy	915
3.2. Cellular scanning UV microspectrophotometry	916
3.3. UV line absorbance spectra	918
3.4. Transmission electron microscopy	919
4. Conclusions	919
Acknowledgements	919
References	919

1. Introduction

Brown-rot decay occurs on soft- and hardwood timbers used for construction, indoors as well as outdoors, with important economic consequences. The decay pattern of brown-rot degraded wood has

* Corresponding author. Tel.: +49 40 73962 438; fax: +49 40 73962 499.
E-mail address: mathias.rehbein@vti.bund.de (M. Rehbein).

been extensively described by using light microscopy (e.g., Anagnost, 1998). To study the degradation within individual cell wall layers investigation on a sub-cellular level is required. Methods such as transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) reveal structural details about the degradation mechanisms of fungal-infected tissues (e.g., Liese, 1970; Blanchette, 1991; Wilcox, 1993; Daniel, 1994; Green and Highley, 1997; Schmitt and Melcher, 2004; Schwarze, 2007). Ultraviolet microspectrophotometry has proven a useful tool to provide general information on the topochemical distribution of lignin and phenolic extractives in woody tissue (Fergus et al., 1969; Scott et al., 1969; Koch and Kleist, 2001; Koch et al., 2003b; Mendonça et al., 2004; Singh et al., 2006; Kim et al., 2008). This technique enables direct imaging of lignin distribution within individual cell wall layers with a high resolution of $0.25 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$. Both techniques offer a methodological approach to study the wood degradation at initial stages of fungal decay. Brown-rot fungi degrade cellulose and hemicelluloses, leaving the lignin essentially undigested but modified. They do not produce lignin-degrading enzymes (Goodell, 2003; Schmidt, 2006). However, non-enzymatic low molecular weight agents produced by the brown-rot fungi are responsible for initial stages of cell wall attack (Goodell, 2003). A lignin modification is indicated by demethylation and the accumulation of oxidized polymeric lignin-degradation products (Highley and Dashek, 1998). At the initial stage of decay, brown-rot affects several strength properties, even before a significant weight loss is detected (Pechmann von and Schaile, 1950; Wilcox, 1993). The loss of strength is related to a rapid decrease in the degree of cellulose polymerisation. The cellulose that remains is characterised by an average degree of polymerisation of 150–200 (Highley and Dashek, 1998). Despite an increased research effort, the exact mechanism of brown-rot decay remains unclear (Green and Highley, 1997).

The objectives of the present paper are focussed on topochemical analyses of lignin modification at initial stages of wood degradation by the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii*. Topochemical studies of the fungi-related degradation process on the sub-cellular level are rare (Bauch et al., 1976; Kleist and Seehann, 1997; Schmidt et al., 1997). The results of the available UV-microscopic studies are based on the evaluation of UV photographs in monochromatic light and point analysis measurements at wavelengths of 240–700 nm. Irbe et al. (2006) studied the degradation process of brown-rotted Scots pine (*Pinus sylvestris*) sapwood by using scanning UV microspectrophotometry. The present study complements the application of both transmission electron microscopy (TEM) and scanning UV spectroscopy (UMSP) to study the cell wall degradation of pine sapwood by *A. vaillantii*. The investigations are focused on the initial stages of decay, more precisely the first 3–22 days. The tight temporal resolution of the investigated processes and the combination of special microscopic techniques provides a detailed insight into the process of initial cell wall degradation. In particular, the modification of lignin within individual cell wall layers was topochemically studied at initial stages of brown-rot decay.

2. Materials and methods

2.1. Sample exposure to the fungi

Small blocks of *P. sylvestris* sapwood were exposed to the brown-rot fungus *A. vaillantii*. The sapwood samples were taken from Nordic Scots pine according to the standard EN 113:1996. After several unsuccessful preliminary tests with bigger samples, the sample size was reduced and adapted to 1.5–1.5 mm at the cross section and 5 mm in length to study the initial stages of wood

degradation. It is known that the decay intensity and the colonisation strategy of brown-rot fungi depend on (among other factors, such as temperature and humidity of the substrate) the sample size (Kleist, 2000). When using bigger samples it was not possible to localise the parts of initial cell wall degradation within the sample tissue. This situation was improved by using the smaller size. Each sample included a growth ring boundary. All samples of one test series were directly located behind each other with the long side parallel to the grain (Fig. 1 [1]).

Before incubation, the samples were heated at 100 °C (steam) for 20 min on two days with one intermediate day at room temperature (e.g., Tyndallization, Schlegel, 1985). To accomplish fungal wood degradation under laboratory conditions, petri dishes were prepared with a standard malt agar according to EN 113:1996 (4% malt, Merck; and 2% CERO AGAR, Roesper) as a nutrient source. After curing, the petri dishes were inoculated with fresh mycelium plugs of *A. vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv. (HUM, palisade Lübeck, Germany, institute collection). After 3 days, when the mycelium had started to overgrow the agar, the test specimens were placed in front of the mycelium without spacer between the sample and agar (Fig. 1 [3]). After incubation in a growth chamber at 22 °C and 70% RH, the samples were removed after 3, 7, 11, 16, and 22 days (with eight replications) without cleaning the surface from mycelium and stored at –18 °C. To determine the average mass loss, four replications were evaluated by calculating the dry mass (as a percentage) before and after culture, according to DIN EN 350-1:1994 (Table 1). The whole experiment was repeated twice, showing comparable results.

2.2. Sample embedding and microscopic analysis

Samples (size $1.5 \times 1.5 \times 5 \text{ mm}$) were fixed in a glutaraldehyde/paraformaldehyde solution (Karnovsky, 1965) and dehydrated in a graded series of acetone. When the dehydration was completed, the samples were embedded in epoxy resin according to Spurr (1969) to stabilise the degraded cell wall structure and facilitate the cutting procedure.

After curing, the embedded samples for the UV spectroscopic analysis were cut into 1- μm semi-thin cross sections with an ultramicrotome Ultracut E (Reichert-Jung) equipped with a diamond knife. Thereafter, the sections were transferred to quartz microscope slides, thermally fixed, mounted in non-UV-absorbing glycerine, and covered with a quartz cover slip.

In addition, 1- μm semi-thin sections for light and polarized light microscopy were stained with toluidine blue as a general staining agent, to enhance the cell wall structure of the investigated woody tissue. According to Gerlach (1977), staining with toluidine blue is

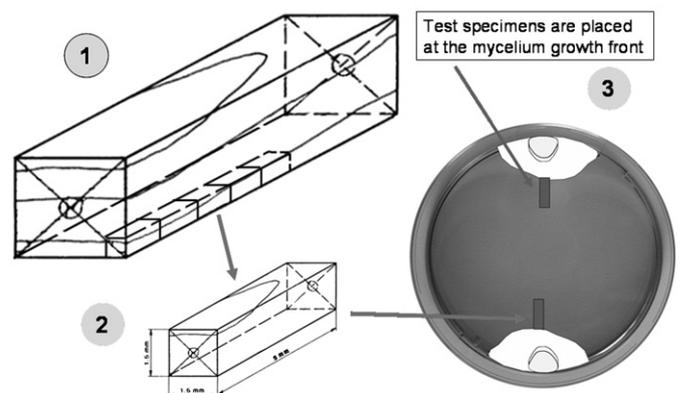


Fig. 1. Sample preparation and positioning.

Table 1
Mass loss of *P. sylvestris* sapwood according to exposure to *A. vaillantii*.

Exposure [days]	Mass loss [%]		
	Min	Average	Max
3	-5.8	-0.8	2.9
7	-3.0	1.2	4.4
11	-1.7	1.9	6.8
16	2.4	12.0	24.0
22	12.7	17.1	23.7

an established method to visualise lignified cell walls for light microscopic studies. However, a detailed quantitative determination of the lignin modification at early stages of brown-rot decay is not possible using staining techniques. Therefore, electron microscopic studies as well as special UV spectroscopic analyses were used.

Ultrathin sections of about 0.1 μm were also prepared with an ultramicrotome for transmission electron microscopy (TEM), to characterize the fungal decay and the structural changes of cell walls on a high-resolution level.

All sections for light, UV, and transmission electron microscopy were taken from the first 0.5 mm of the fungi-infected surface of the samples (see Fig. 1 [3]).

2.3. Light microscopy and cellular scanning UV microspectrophotometry

Microscopic analyses of the decay patterns were performed with 1- μm semi-thin sections. Both conventional light microscopy and polarized light were applied. All sections were immersed in glycerine and examined with a Zeiss Ultraphot II microscope and Olympus BX 51 microscope, adapted with the CELL F (Olympus) evaluation program.

The topochemical analyses was carried out using a Zeiss UMSP 80 microspectrophotometer equipped with a scanning stage, enabling the determination of image profiles at constant wavelengths using the scan program APAMOS (automatic photometric analysis of microscopic objects by scanning, Zeiss) as described by Koch and Kleist (2001). The technique is based on the ultraviolet illumination of semi-thin transverse sections of woody tissue. Lignin displays a characteristic ultraviolet absorbance spectrum with absorbance maxima around 280 nm due to the presence of associated phenylpropane groups with several chromophoric structural elements (Jaffé and Orchin, 1962; Sarkanen and Hergert, 1971; Hesse et al., 1991). No other component of the mature wood cell displays ultraviolet absorbance properties in the same spectral region, and the intensity of absorbance may therefore be related to the concentration of lignin across the cell wall. The scan program digitises square fields of the tissue with a local geometrical resolution of $0.25 \times 0.25 \mu\text{m}$ and a photometric resolution of 4096 grey scale levels, which are converted into 56 basic colours to visualise the local absorbance intensities. The scan can be depicted as a two- or three-dimensional image profile, including a statistical evaluation (histogram) of the semi-quantitative lignin distribution. For semi-quantitative studies, 16 measurements of individual tracheid wall layers of each incubation stage were carried out: six image profiles of latewood tracheids (S2 and compound middle lamella), six image profiles of the early wood tracheids, and four of the cell walls of ray tracheids.

The lignin modification process within the S2 layers of latewood tracheids was additionally investigated by photometric point-by-point measurements (spot size $1 \mu\text{m}^2$) between $\lambda_{250 \text{ nm}}$ and $\lambda_{400 \text{ nm}}$ wavelengths using the program LAMWIN (Zeiss). This program

evaluates the UV absorbance spectra of the lignified cell walls according to Lambert–Beer's law. Furthermore, discrimination between different types of lignin is possible due to different ratios of their guaiacyl- and syringylpropane units. Softwood lignin is mainly composed of guaiacylpropane units with an absorbance maximum at 280 nm (Fergus and Goring, 1970a,b; Takabe et al., 1992).

2.4. Transmission electron microscopy

Ultrathin (80–100 nm) transverse sections of the embedded specimens (all five series of incubation) were cut with diamond knives, placed on uncoated 300-mesh copper grids, and stained with potassium permanganate according to Donaldson (1992). Examination was carried out with a Philips CM 12 TEM at accelerating voltages of 40 or 60 kV to enhance contrast.

3. Results and discussion

3.1. Light and polarized light microscopy

The brown-rot-related degradation of individual cell wall layers during initial stages of exposure (3 up to 22 days) was structurally studied by light and polarized light microscopy and topochemically analysed by scanning UV microspectrophotometry.

The start and progress of fungal decay were evaluated by the determination of mass loss. At the early stage of brown-rot decay (day 3) no mass loss could be observed. The mass increase is related to the growing hyphae and is indicative of fungal activity. The first distinct mass loss occurred after 7 days of exposure (average 1.2%). After 22 days the mass loss reached its highest values, with an average of 17.1% (Table 1). The evaluated data in Table 1 represent the average results mass losses (four replications) at initial stages of brown-rot decay by *A. vaillantii*.

One indicator for identifying brown-rot decay on a microscopic level is the loss of birefringence of cellulose displayed in polarized light. This method should only be used as a positive indicator of decay (Anagnost, 1998) and is related to the prior decrease in degree of cellulose polymerisation. Cell wall regions where cellulose has been degraded appear dark, while undegraded parts are highlighted in polarized light (comp. Fig. 2). The lignin and hemicelluloses also appear dark owing to their non-birefringent nature (Schwarze, 2007). The absence of any changes in cellulose crystallinity under polarized light does not eliminate the possibility of brown-rot decay because the loss of birefringence occurs only at advanced stages of degradation.

Microscopic studies of samples prepared from initial stages of wood degradation revealed no significant changes of birefringence after 3 days of exposure (average mass loss of -0.8%). Seven days later, at exposure day 11, the first changes occurred in the region of early wood tracheids at the wood surfaces (average mass loss of 1.9%). After 22 days an intensive lack of birefringence was apparent across the transverse section (average mass loss of 17.1%, Fig. 2a–c).

Comparable light microscopic studies revealed no structural cell wall attack during the first 11 days of exposure (Fig. 3a and b). However, in ascending order of incubation time the early wood tracheids showed a modification of the cell shapes in the form of a noncircular pattern (Fig. 3b and c). By contrast, the latewood tracheids did not reveal structural changes until exposure day 22. The typical macroscopic features such as shrinkage and cubical pattern of cracks by drying and brown discoloration were not observed due to the short exposure time and the small sample size. It was remarkable that even at culture end the occurrence of hyphae inside the woody tissue was mainly in the inner part of the cross section; only few hyphae occurred at the outer regions (Fig. 3a–c).

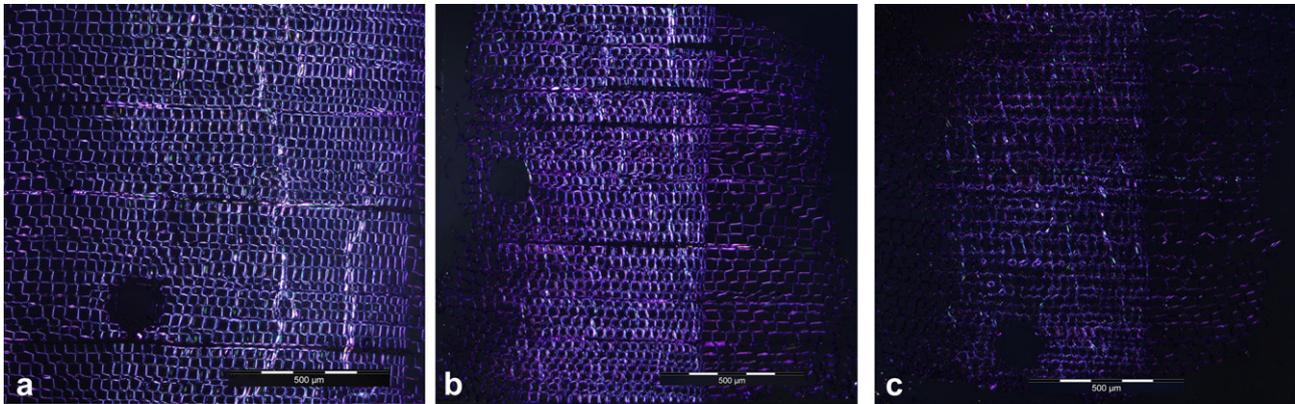


Fig. 2. Transverse sections of *Pinus sylvestris* investigated with polarized light in ascending stages of exposure to *Antrrodia vaillantii*; 2a: The undecayed control appears highlighted. 2b: After 11 days of exposure a first lack of birefringence is apparent under polarized light. 2c: After 22 days the highlighted parts decrease dramatically; the dark regions reveal the intensity of fungal decay.

3.2. Cellular scanning UV microspectrophotometry

In Fig. 4a–d, two- and three-dimensional UV microspectrophotometric scanning profiles of initial stages of brown-rot decay are shown. The colour pixels indicate different intensities of UV absorbance at $\lambda_{280\text{ nm}}$. The high resolution ($0.25\ \mu\text{m} \times 0.25\ \mu\text{m}$ per pixel) enables the differentiation of UV absorbance within different cell wall layers (Koch et al., 2003a).

The undecayed control sample shows a typical profile of lignin distribution within individual cell wall layers (Fig. 4a). The purple up to green colour pixel of the illustrated compound middle lamella (CML) represent a distinct lignification with highest absorbance values in the region of the cell corners. The UV-absorbance values vary slightly, depending on the radial or tangential orientation of the cell walls (Takabe, 2002). The absorbance values of the adjacent secondary walls showed significant lower intensities on either side

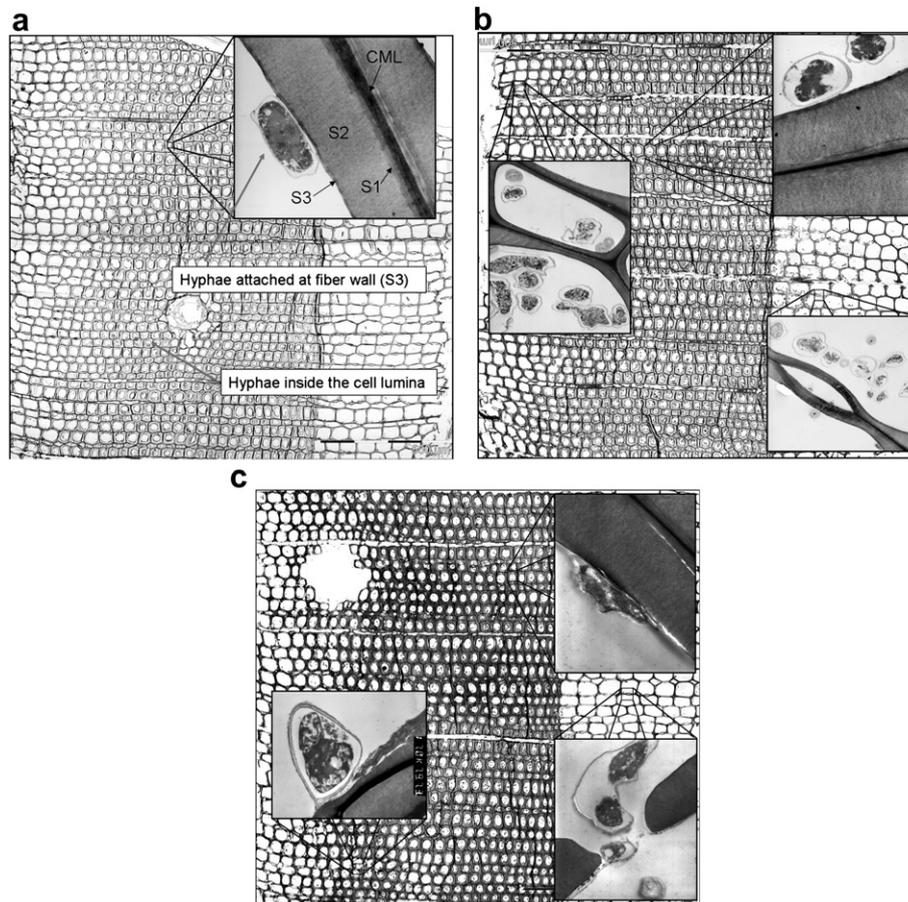


Fig. 3. Light and transmission electron microscope transverse sections of *Pinus sylvestris* stained with toluidine blue in ascending stages of exposure to *Antrrodia vaillantii*. 3a: After 3 days, the first hyphae occur inside the cell lumina; only a few hyphae are directly attached to the cell wall. 3b: After 11 days, the inner part of the cross section is covered with hyphae, most of them located next to the pit channels. 3c: Even after 22 days, light microscopic analysis reveals only minor changes of the woody tissue; in detail (TEM) beginning wood degradation, in particular at the pit membrane, was observed.

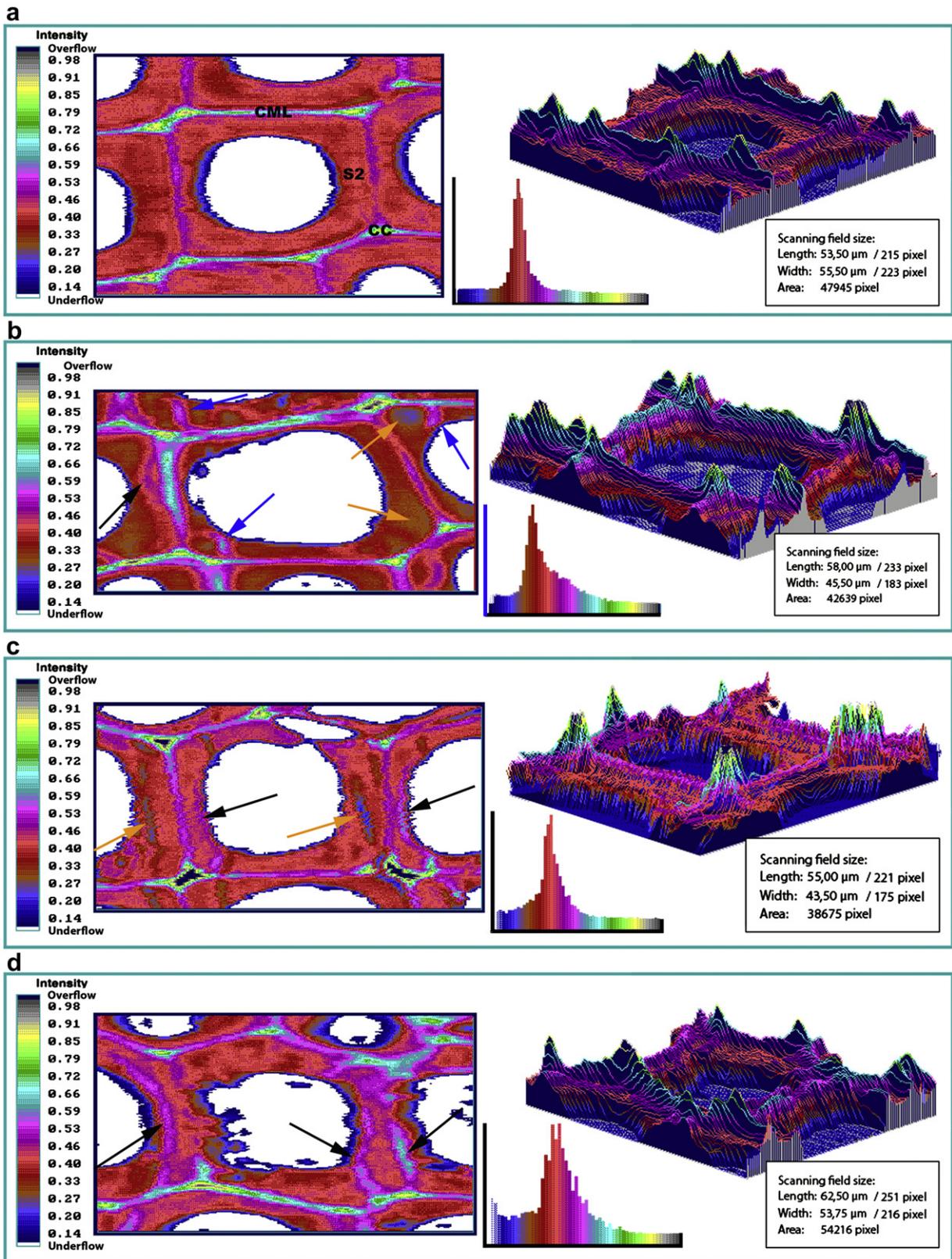


Fig. 4. Representative UV-microscopic scanning profiles (area and 3-D) of *Pinus sylvestris* latewood tracheids with a statistical evaluation (histogram). The coloured pixels mark the absorbance intensity at $\lambda_{280 \text{ nm}}$. 4a: Undecayed *P. sylvestris* control with highest absorbance values in the area of compound middle lamella (CML) and cell corners (CC). 4b: *P. sylvestris* tracheid after 3 days exposure to *Antrodia vaillantii*: The S2 revealed locally inhomogeneous pattern of lower intensities [1] as well as spots of higher absorbance values [1], and the onset of lignin modification apparent in the region of the primary and secondary wall [1]. 4c: *P. sylvestris* tracheid after 11 days exposure: High absorbing lines shift to the inner part of the S2 [1] as well as local spots of lower absorbance values [1]. 4d: *P. sylvestris* tracheid after 22 days exposure: The UV-profile reveals a distinct lignin modification within the entire cell wall. The radially oriented compound middle lamella CML were characterised by a decrease of the UV intensities, against that, lines of higher UV intensities occurred in the inner parts of the S2 [1].

of the compound middle lamella. For detailed illustration, the selected scanning area is also presented as a three-dimensional image profile where the compound middle lamella region stands out as a highly absorbing band with highest UV absorbance at the cell corners. The three-dimensional presentation allows an improved evaluation of the topochemical distribution of lignin within the individual cell wall layers, including more than 47,000 measuring points. The two-dimensional UV image profile revealed that the average lignin concentration in the secondary wall is less than in the compound middle lamella. The absorbance values of the cell corners are about three times that in the secondary wall of tracheids. This observation agrees with other topochemical studies of lignin distribution and concentration by scanning UV microspectrophotometry (Scott et al., 1969; Koch and Grünwald, 2004; Singh et al., 2006).

After 3 days of exposure, local changes of the UV absorbance behaviour within the S2 layers of the latewood tracheids were topochemically detectable. The S2 revealed locally inhomogeneous pattern of lower intensities as well as local spots of higher absorbance values (Fig. 4b). These spectral changes may be explained by an initial depolymerisation of the ligno-cellulosic cell wall matrix. The local increase of the UV absorbance revealed the onset of lignin modification caused by the brown-rot fungus, apparent in the region of primary and secondary wall (high absorbing lines in the outer part of S2, Fig. 4b). The agents responsible for the depolymerisation are able to diffuse through the S3 into the S2 layer (Daniel, 1994), where topochemical changes are first apparent. The inner parts of the S2 layers showed only slight changes of the UV absorbance intensities, indicating a high selectivity at this stage of the lignin modification process.

Seven days later (incubation day 11, mass loss 1.9%), the entire cell wall area seemed to be clearly affected by the lignin modification process. The high absorbing lines were shifted to the inner part of the S2. Minor changes occurred in the regions of the compound middle lamellae in radial and tangential directions.

After end of exposure (day 22, mass loss 17.1%), the scanning UV profiles revealed a distinct lignin modification within the entire cell wall (Fig. 4d). In particular, the UV absorbance of the radially oriented compound middle lamella, CML, was characterised by

a decrease of the UV intensities, whereas higher UV intensities occurred in the inner parts of the S2 which showed a parallel orientation as compared to the radial CML. The reason of the topochemical changes may be also influenced by morphological structures of the cell wall, in detail the preferred orientation of pit canal in direction to the radial wall, which posed as opening gap for the fungal expansion. Furthermore, the innermost parts of the S2 showed distinct lines and spots of lower UV-absorbance values (displayed by the blue colour) representing the progress of lignin modification during brown-rot decay. The results of topochemical cell wall modifications within the individual stages of brown-rot decay are verified by a series of scanning analyses using the UMSP technique. Overall, 16 individual scanning fields of each incubation stage were carried out. One spectroscopic image includes 40,000–50,000 individual absorbance values. The whole investigation was repeated twice, showing comparable results.

In general, these topochemical analyses demonstrate the usefulness of the scanning UV microspectrophotometry technique for the detection of very early stages of brown-rot deterioration in wood.

3.3. UV line absorbance spectra

Lignin modification within increasing stages of cellular wood degradation was further studied by evaluating UV absorbance line spectra within a wavelength range between λ_{250} nm and λ_{400} nm. In Fig. 5, typical UV absorbance line spectra of an untreated S2 of latewood tracheids (control) and the S2 of degraded cell walls (after 3, 11, and 22 days of exposure) are illustrated. The control (Fig. 5, black line) shows the UV absorbance characteristic of a typical lignified softwood tracheid S2 with highest UV absorbance at λ_{280} nm (abs_{280} nm 0.20) and a distinct decrease at higher wavelengths (Koch and Kleist, 2001). A pronounced absorbance and maximum at 280 nm indicate the presence of the strongly absorbing guaiacyl-lignin (Musha and Goring, 1975; Fujii et al., 1987).

After 3 days of exposure, the UV absorbance spectra of the infected S2 reveals the beginning of lignin modification, which is characterised by an increase of the absorbance maximum at λ_{280} nm (abs_{280} nm 0.24). This result corresponds with the occurrence of

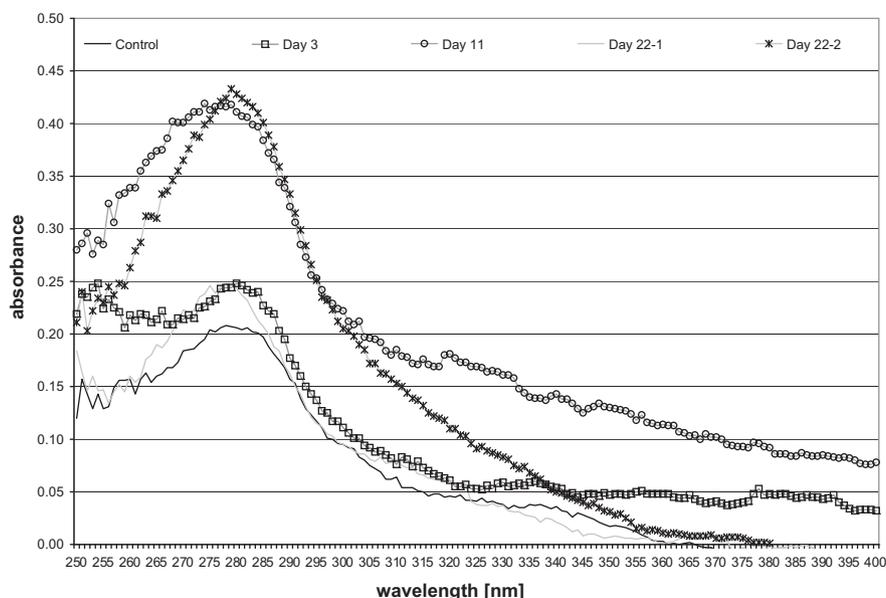


Fig. 5. Lignin absorbance spectra of *P. sylvestris* sapwood. The spectra were taken at secondary wall latewood tracheids of control and degraded samples. The different colour displays the ascending stages of lignin modification by *A. vaillantii*.

high UV-absorbing lines locally detected in the outer part of the S2 (comp. Fig. 4b). The increase of absorbance during the very early decay period can be explained by a partial depolymerisation of the native ligno-cellulosic matrix combined with modifications in the side chains of lignin, caused by oxidative agents (Bauch et al., 1976).

After 11 days, a considerable change of UV line absorbance was recorded. The representative spectra of the S2 is characterised by an obvious increase of maximum intensity from $\text{abs}_{280\text{ nm}} 0.20$ to 0.41. No shift of the absorbance maximum to higher wavelength was observed. This spectral characteristic confirms the destructive activity of the studied fungi on *P. sylvestris* sapwood.

The final decay step was analysed after 22 days of exposure to *A. vaillantii*. The result reveals highly modified cells directly located to less degraded or undegraded parts of the tracheid cell wall. The UV absorbance line 22-1 (Fig. 5, grey line) represents nearly a complete unmodified lignin characteristic ($\text{abs}_{280\text{ nm}} 0.24$); by contrast, line 22-2 documented a distinct increase of the absorbance maximum from 0.20% to 0.43% of an adjacent part of the S2 (Fig. 5). The point analysis investigation shows that, even after 22 days of culture, cell wall degradation was not homogeneous throughout the tissue. The evaluation of the UV-absorbance spectra is important in characterising the spectral appearance of the modified lignin and distinctively confirms the results of the scanning analyses.

3.4. Transmission electron microscopy

To study the micromorphological aspects of fungal decay, transmission electron microscopy (TEM) reveals additional information on a sub-cellular level. This approach is useful in detecting the general pathway of brown-rot fungal hyphae into wood (Daniel, 1994). In this investigation potassium permanganate staining was used to facilitate the differentiation between individual wall layers and to provide detailed information on the lignin modification process. After 3 days of exposure, several hyphae appeared across the whole section (Fig. 3a). Most hyphae were located in the lumina of tracheids and rays. Only a few were located in close contact to the wood cell walls. The first visible attack was morphologically detectable at cross-field pit membranes after 11 days of exposure. A change in electron density as an evidence of lignin modification by the brown-rot fungus was not found. The comparison of both analytical techniques used (UMSP and TEM) shows that UV spectroscopic analysis is more sensitive in detecting topochemical changes of lignin modification at initial stages of brown-rot decay by *A. vaillantii*.

4. Conclusions

Sub-cellular analyses of the early stages of cell wall degradation by the brown-rot fungus *A. vaillantii* was carried out using light microscopy, TEM, and UV microspectrophotometry. The TEM results provide general information and insight into morphological changes of the cell wall structure at initial stages of brown-rot decay. The UMSP area scans and additional point analysis measurements provide insights into the topochemistry in situ. In particular, the technique provides fundamental information on the lignin modification process during cell wall decomposition by *A. vaillantii*. The topochemical analyses clearly reveal that lignin modification occurs before any mass loss is detectable. The beginning of lignin modification is evidenced at the outermost part of the secondary wall layer. UMSP proved that even at advanced decay stages the degradation was not homogeneous throughout the tissue, as, among the significantly damaged cells, there were still apparently sound cells.

The combination of TEM investigation and UV microspectrophotometry constitutes a useful approach to determining topochemical variations of lignin distribution and modification within individual cell wall layers. In order to obtain a better understanding of initial wood decay on a sub-cellular level, further topochemical and cytological studies of individual brown-rot fungi are needed.

Acknowledgements

The authors thank T. Potsch and K. Brandt, Hamburg, for assistance in embedding, sectioning, and microscopic analysis, and Prof. Dr. O. Schmidt, Hamburg, for critical reading of the manuscript.

References

- Anagnost, S.E., 1998. Light microscopic diagnosis of wood decay. IAWA Journal International Association of Wood Anatomists 19, 141–167.
- Bauch, J., Seehann, G., Fitzner, H., 1976. Microspectrophotometrical investigations on lignin of decayed wood. Material und Organismen Beiheft 3, 141–152.
- Blanchette, R.A., 1991. Delignification by wood-decay fungi. Annual Review of Phytopathology 29, 381–403.
- Daniel, G., 1994. Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. FEMS Microbiology Reviews 13, 199–233.
- DIN EN 350-1, 1994. Natürliche Dauerhaftigkeit von Vollholz. Teil 1: Grundsätze für die Prüfung und Klassifikation der natürlichen Dauerhaftigkeit von Holz. Beuth, 10 S.
- Donaldson, L., 1992. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata* D. Don. IAWA Bulletin New Series 13, 381–387.
- EN 113, 1996. Wood preservatives – test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes – determination of the toxic values. Beuth, 36 S.
- Fergus, B.J., Procter, A.R., Scott, J.A.N., Goring, D.A.I., 1969. The distribution of lignin in spruce wood as determined by ultraviolet microscopy. Wood Science and Technology 3, 117–138.
- Fergus, B.J., Goring, D.A.I., 1970a. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. Holzforschung 24, 113–117.
- Fergus, B.J., Goring, D.A.I., 1970b. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. Holzforschung 24, 118–124.
- Fujii, T., Shimizu, K., Yamaguchi, A., 1987. Enzymatic saccharification on ultrathin sections and ultraviolet spectra of Japanese hardwoods and softwoods. Mokuzai Gakkaishi 33, 400–407.
- Gerlach, D., 1977. Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 311 S.
- Goodell, B., 2003. Brown rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: Goodell, B., Nicholas, D., Schultz, T. (Eds.), Wood deterioration and preservation: Advances in our changing world. American Chemical Society Series, Washington, D.C. pp. 97–118.
- Green, F., Highley, T.L., 1997. Mechanism of brown-rot decay: paradigm or paradox. International Biodeterioration and Biodegradation 39, 113–124.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 1991. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Highley, T.L., Dashek, W.V., 1998. Biotechnology in the study of brown- and white-rot decay. In: Bruce, A., Palfreyman, J.W. (Eds.), Forest products biotechnology. Taylor & Francis, London, Great Britain, pp. 15–36.
- Irbe, I., Noldt, G., Koch, G., Andersone, I., Anderson, B., 2006. Application of scanning UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin within individual cell walls of brown-rotted Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sapwood. Holzforschung 60, 601–607.
- Jaffé, H.H., Orchin, M., 1962. Theory and application of ultraviolet spectroscopy. John Wiley and Sons, New York.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27, 137–138.
- Kim, J.S., Lee, K.H., Cho, C.H., Koch, G., Kim, Y.S., 2008. Micromorphological characteristics and lignin distribution in bamboo (*Phyllostachys pubescens*) degraded by the white rot fungus *Lentinus edodes*. Holzforschung 62, 481–487.
- Kleist, G., 2000. Über die natürliche Dauerhaftigkeit ausgewählter Wirtschaftsholzarten unter besonderer Berücksichtigung von Sapelli (*Entandrophragma cylindricum* Sprague). Dissertation, Universität Hamburg, 155 S.
- Kleist, G., Seehann, G., 1997. Colonization patterns and topochemical aspects of sap streak caused by *Stereum sanguinolentum* in Norway spruce. European Journal of Forest Pathology 27, 351–361.
- Koch, G., Grünwald, C., 2004. Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt, U., Anderer, P., Barnett, J.R., Emons, A.M.C., Jeronimidis, G., Saranpää, P., Stanzl-Tschegg, S. (Eds.), Wood fiber cell walls: Methods to study their formation, structure and properties. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp. 119–130.
- Koch, G., Kleist, G., 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. Holzforschung 55, 563–567.

- Koch, G., Puls, J., Bauch, J., 2003a. Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung* 57, 339–345.
- Koch, G., Rose, B., Patt, R., Kordsachia, O., 2003b. Topochemical investigation on delignification of *Picea abies* [L.] Karst. During alkaline sulfite (ASA) and bisulfite pulping by scanning UV microspectrophotometry. *Holzforschung* 57, 611–618.
- Liese, W., 1970. Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Annual Review of Phytopathology* 8, 231–258.
- Mendonça, R., Ferraz, A., Kordsachia, O., Koch, G., 2004. Cellular UV-micro spectrophotometric investigations on pine wood (*Pinus taeda* and *Pinus elliot-tii*) delignification during biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát Gilbn. & Ryv.) and alkaline sulfite/anthraquinone treatment. *Wood Science and Technology* 38, 567–575.
- Musha, Y., Goring, D.A.I., 1975. Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science and Technology* 9, 45–58.
- Pechmann von, H., Schaile, O., 1950. Über die Änderung der dynamischen Festigkeit und der chemischen Zusammensetzung des Holzes durch den Angriff holzzerstörender Pilze. *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, Vol. 69. Springer Berlin, Heidelberg, pp. 441–466.
- Sarkanen, K.V., Hergert, H.L., 1971. Classification and distribution. In: Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H. (Eds.), *Lignins, occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley Interscience, New York, pp. 43–49.
- Schlegel, H.G., 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 571 S.
- Schmidt, O., 2006. Wood and tree fungi. *Biology, damage, protection and use*. Springer, Berlin.
- Schmidt, O., Schmitt, U., Moreth, U., Potsch, T., 1997. Wood decay by the white-rotting basidiomycete *Physisporinus vitreus* from a cooling tower. *Holzforschung* 51, 193–200.
- Schmitt, U., Melcher, E., 2004. Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: A useful tool for lignin localisation, COST Action E20 Wood Fibre Cell Wall Structure pp. 105–117.
- Scott, J.A.N., Procter, A.R., Fergus, B.J., Goring, D.A.I., 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood description and validity of the technique. *Wood Science and Technology* 3, 73–92.
- Schwarze, F.W., 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews* 21, 133–170.
- Singh, A., Schmitt, U., Möller, R., Dawson, B., Koch, G., 2006. Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. *Wood Science and Technology* 40, 16–25.
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26, 31–43.
- Takabe, K., 2002. Cell walls of woody plants: autoradiography and ultraviolet microscopy. In: Chaffey, N. (Ed.), *Wood formation in trees*. Taylor & Francis, London, pp. 159–177.
- Takabe, K., Miyauchi, S., Tsunoda, R., Fukazawa, K., 1992. Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in Japanese beech (*Fagus crenata*): variation within annual ring. *IAWA Bulletin* 13, 105–112.
- Wilcox, W.W., 1993. Comparison of scanning electron-microscopy and light-microscopy for the diagnosis of early stages of brown-rot wood decay. *IAWA Journal* 14, 219–226.

Topochemical and transmission electron microscopic studies of bacterial decay in pine (*Pinus sylvestris* L.) harbour foundation piles*

Mathias Rehbein¹, Gerald Koch¹, Uwe Schmitt¹ and Tobias Huckfeldt²

¹Institute of Wood Technology and Wood Biology, Federal Research Institute of Rural Areas, Forestry and Fisheries (vTI), Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg, Germany

²Hohe Liedt 75, 22417 Hamburg, Germany

Communicating author:

Mathias Rehbein

Institute of Wood Technology and Wood Biology

Leuschnerstr. 91d

21031 Hamburg, Germany

Phone: #49-40-73962-438

Fax: #49-40-73962-499

Email: mathias.rehbein@vti.bund.de

Abstract

Bacterial degradation of *Pinus sylvestris* harbour foundation piles was studied topochemically by scanning UV-microspectrophotometry. This analytical technique enables direct imaging of lignin distribution within individual cell wall layers. Additionally, light and transmission electron microscopy (TEM) was used to characterise structural changes of the cell walls. Various decay stages were found in the samples. TEM revealed that the bacterial degradation occurred mainly in the S2, leaving granular remnants in degraded wall portions with lower as well as higher electron density than the surrounding unmodified wall. In the initial stages, topochemical investigations revealed that lignin modification starts in the innermost parts of the secondary wall, most clearly observed in latewood tracheids. During advanced degradation, lignin modification occurs more or less severe in walls of all cell types. However, even in cell portions with intensive decay, the compound middle lamellae and ray tracheids were undegraded. The knowledge about lignin modification at initial stages of wood degradation by bacteria is of fundamental importance to provide more information on the process of cell wall decay.

Keywords

Bacterial decay, *Pinus sylvestris*, wood degradation, topochemistry, universal microspectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM)

* Dedicated to Prof. Dr. Dr. h.c. Eberhard Schnepf on the occasion of his 80th birthday.

1. Introduction

Biodegradation of wood occurs under various environmental conditions and is mainly caused by fungi, but also by bacteria. In wet environments with distinctly reduced oxygen availability, e.g., in pilings of building foundations and harbour quay elements, soft rot fungi and bacteria are well known wood degraders (Klaassen, 2009). Both organisms can degrade wood individually as well as in combination (Singh, 1997). While the presence of fungi has always been proven in the course of wood degradation processes, it is now established that

bacteria also play an important role in cell wall degradation of wood. Bacteria are ubiquitous in the soil and in water (Schmidt, 2006) and, as compared to soft rot fungi, appear to be well adapted to degrade water-saturated wood under nearly anoxic conditions. Under these conditions, bacteria have been shown to play a major role in wood decay processes (Daniel et al., 1987). However, a comprehensive understanding of how bacteria degrade wood is presently not available (Blanchette, 2000). The identification of bacterial decay types is primarily based on morphological studies of the decay patterns (e.g. Kim and Singh, 2000). Accordingly, the degradation patterns are classified into two major categories, tunnelling and erosion, and a third seldom described cavitation type (Singh and Butcher, 1986; Nilsson et al., 1992; Daniel, 1994). Although bacteria can degrade lignified cell walls by extracellular enzymes, the degradation patterns differ distinctly from those caused by most fungi (Daniel and Nilsson, 1998). Erosion bacteria mainly degrade the S3 and S2 layers, whereas the middle lamella regions usually remain intact (Kim and Singh, 2000). The degraded cell wall portions contain variable amounts of wall residues consisting of lignin or lignin degradation products (Singh et al., 1990). Tunnelling bacteria are known to finally degrade all cell wall layers, including the compound middle lamella (Daniel and Nilsson, 1998). Such a decay pattern is characterised by the formation of tunnels which remain largely empty of precipitates or anything resembling a residual lignin skeleton (Daniel et al., 1987). Singh and Butcher (1991) described morphological differences as a function of different substrates. They found tunnels which remain largely empty as well as tunnels densely filled with granular material. However, the concordant decay patterns seem to be the appearance of cross walls inside the tunnel and the ability to also degrade the highly lignified CML. The cavitation type is characterised by diamond shaped or irregular cavities in the secondary wall with the larger dimension nearly perpendicular to the fibre direction (Singh and Butcher, 1991). Similar decay patterns are often described for the erosion type. Kim and Singh (2000) suggested that the cavitation type “may be a form of bacterial erosion found only in restricted situations”.

To analyse the degradation within individual cell wall layers, studies on a sub-cellular level are required. Methods such as transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) are well suited to reveal structural details of the degradation mechanism in bacteria infected woody tissues (Nilsson and Singh, 1984; Daniel and Nilsson, 1985; Singh and Butcher, 1986; Schmidt et al., 1987; Singh, 1989; Nilsson et al., 1992; Daniel, 1994; Schmidt and Liese, 1994; Liese et al., 1995; Schmidt, 1995; Daniel and Nilsson, 1998; Schmitt and Hoffmann, 1998; Björdal, 1999, 2000; Hoffmann, 2004; Schmitt and Melcher, 2004; Rehbein et al., 2008; Singh et al., 2009). To obtain topochemical information on bacterial cell wall degradation, special techniques like UV-microspectrophotometry (UMSP) must be applied. This technique is a powerful tool to provide general information on the distribution of lignin and phenolic extractives within individual cell wall layers of various cell types (Fergus and Goring, 1969; Scott et al., 1969; Koch and Kleist, 2001; Koch et al., 2003b; Mendonça et al., 2004; Singh et al., 2006; Kim et al., 2008; Rehbein et al., 2010).

The present paper is focused on topochemical analyses of cell wall degradation and lignin modification at increasing intensities of bacterial decay. Topochemical studies of the bacteria related degradation process are rare and conventionally performed by UV-spectroscopic point measurements (Schmidt and Bauch, 1980). For a more detailed topochemical characterisation of bacteria degraded wood, UV-spectroscopic scanning analyses were applied. This improved analytical technique enables direct imaging of the lignin distribution within individual cell wall layers and also offers a variety of graphical and statistical analyses with a resolution of 0.25 x 0.25 μm .

2. Material and Methods

Samples were taken from Hamburg harbour pine (*Pinus sylvestris* L.) quay wall foundation piles. No official records on the year of installation were available. However, general information on the history of harbour construction indicates a service life of the piles of more than 50 to 80 years. Sampling was done with a core driller from lower pile parts located in the intertidal zone. The cores with a diameter of 30 mm were divided visually into three different degradation zones at 1.5, 6 and 7.5 cm from the pile surface, from which samples were removed for microscopy. The outermost samples showed severe, the intermediate samples moderate decay symptoms; the innermost samples appeared mostly undamaged. From each of these sample series, small slivers of about 1.5 x 1.5 x 5 mm³ were split off with a rigid razor blade. The samples as well as one additional sound *P. sylvestris* sapwood control were fixed in a glutaraldehyde/paraformaldehyde solution (Karnovsky, 1965) and dehydrated in a graded series of acetone. After dehydration, the samples were embedded in Spurr's epoxy resin (Spurr, 1969).

2.1 Sample preparation and microscopy

For conventional and polarised light microscopy, hand cut sections stained with cotton blue as well as 1 µm semi-thin sections stained with toluidine blue were mounted in glycerine and examined with an Olympus BX 51 microscope, equipped with the CELL F (Olympus) evaluation program.

For UV-spectroscopy, 1 µm semi-thin sections were cut with an ultramicrotome equipped with a diamond knife. Thereafter, the sections were transferred to quartz microscope slides, thermally fixed and mounted in non UV-absorbing glycerine, and finally covered with a quartz cover slip.

For topochemical analyses, a Zeiss UMSP 80 microspectrophotometer equipped with a scanning stage was used for the determination of image profiles at constant wavelengths applying the scan program APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Zeiss) as described in detail by Koch and Kleist (2001). Lignin distribution was determined at a constant wavelength of $\lambda_{280\text{ nm}}$ (absorbance maximum of softwood lignin). The scan program digitises square fields of the tissue with a local geometrical resolution of 0.25 x 0.25 µm² and a photometrical resolution of 4096 grey scale levels, which are converted into 16 basic colours to visualise the local absorbance intensities. The scan can be depicted as a two or three dimensional image profile including a statistical evaluation (histogram) of the semi-quantitative lignin distribution. For semi-quantitative studies, 16 measurements in radial and 13 measurements in transverse direction of individual tracheid wall layers of the selected parts were carried out.

Lignin modification within the S2 layer of latewood tracheids was studied by photometric point measurements (spot size 1 µm²) in a wavelength range between $\lambda_{240\text{ nm}}$ and $\lambda_{400\text{ nm}}$ with a TIDAS MSP 800 microspectrometer (j&m Analytics) equipped with a TIDASDAQ software. For the evaluation of UV absorbance spectra, between 9 to 14 point measurements for each degradation step were carried out.

To characterise the fine structural changes within cell walls Transmission electron microscopy was applied. Ultrathin (80-100 nm) transverse sections of the embedded specimens were cut in transverse and radial direction. Sections were mounted on uncoated 300-mesh copper grids and stained with potassium permanganate according to Donaldson (1992). Examination was carried out with a Philips CM 12 TEM at accelerating voltages of 40 or 60 kV to enhance contrast.

3. Results and Discussion

3.1 Light and polarised light microscopy

Pine foundation piles from the Hamburg harbour with distinct decay symptoms were analyzed by means of conventional and polarised light microscopy. Mostly thick-walled latewood tracheids or occasionally tracheids of the transition zone between early- and latewood were examined, because degradation patterns could be more easily observed in these walls than in the thin-walled earlywood tracheids (Fig. 1, Klaassen, 2008).

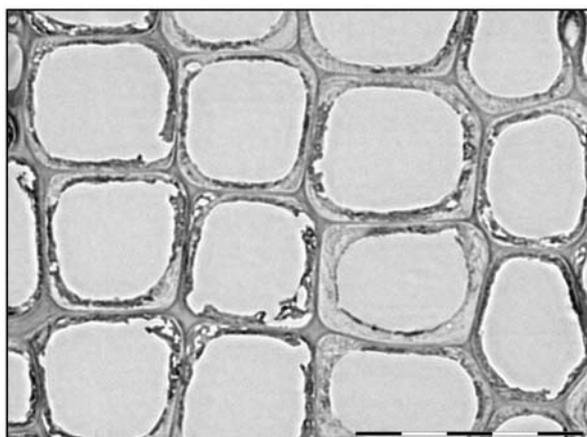


Fig. 1: Transverse section of the outermost part of bacteria degraded foundation pile (1.5 cm). Most cell walls are heavily degraded while some appear largely undamaged (scale bar 50 μm)

The identification of bacterial decay by light microscopy is based on the occurrence of some typical decay patterns, such as troughs and rhombic/diamond shaped cavities specific for erosion and cavitation bacteria, as well as minute holes and narrow tunnels known to be formed by tunnelling bacteria. The innermost parts of the foundation piles (sample distance 7.5 cm from the surface) revealed only few rhombic or crescent erosion troughs and diamond shaped cavities while most of the woody tissue appeared unaffected (Figs. 2 and 4). The outermost part (sample distance 1.5 cm from the surface)

showed severe degradation. Latewood tracheids showed irregular shaped cavities, erosion of secondary wall layers and ice-fern like decay patterns (Fig. 3).

Polarised light provided additional information on the degradation pattern. Cell wall regions where cellulose has been degraded, showed reduced birefringence and therefore appeared darker, while sound wall portions retained their bright birefringence (comp. Figs. 4 and 5). Lignin and hemicelluloses also appeared dark owing to their non-birefringent nature (Schwarze, 2007). A distinct loss of birefringence was found in the heavily degraded outermost pile parts (1.5 cm), whereas the innermost wood portions of the piles (7.5 cm) revealed only incipient decay in latewood tracheids; no advanced cell wall degradation was observed in these samples. Polarised light microscopy confirmed that crystalline cellulose became strongly degraded in axial tracheids and ray parenchyma cells. Only ray tracheids showed unmodified bright birefringence (Figs. 5 and 14). Such a decay pattern is similar to soft rot decay as described by Singh et al. (2006). Samples taken from the moderately degraded pile parts (6 cm) showed both tracheids with initial stages of decay and heavily degraded tracheids adjacent to sound cells. With increasing intensity of decay, it became more difficult to distinguish between the different types of bacterial decay patterns.

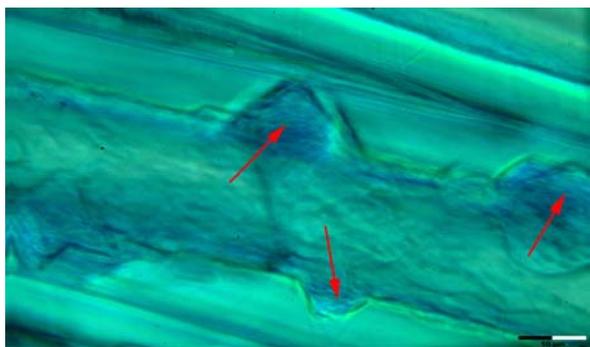


Fig. 2: Tangential section of a tracheid from the innermost part of a foundation pile (7.5 cm), with rhombic or crescent erosion troughs [↑].

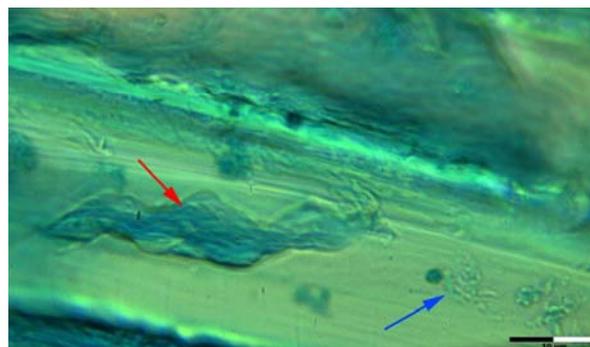


Fig. 3: Tangential section of a tracheid from the outermost part of a foundation pile (1.5 cm) with irregularly shaped cavities [↑] and ice-fern like decay pattern [↑].

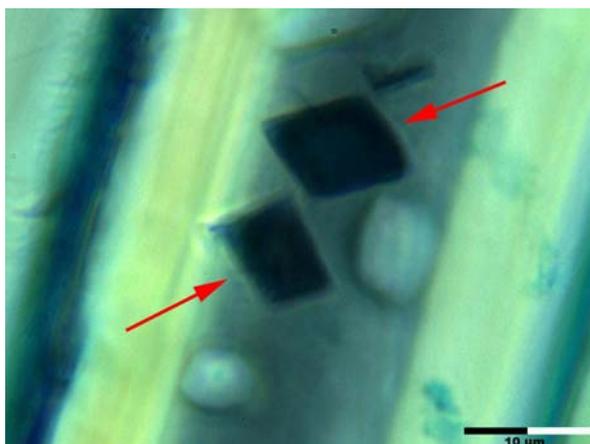


Fig. 4: Tangential section of a tracheid from the innermost part of a foundation pile (7.5 cm). Diamond shaped cavities [↑] appear dark under polarised light.

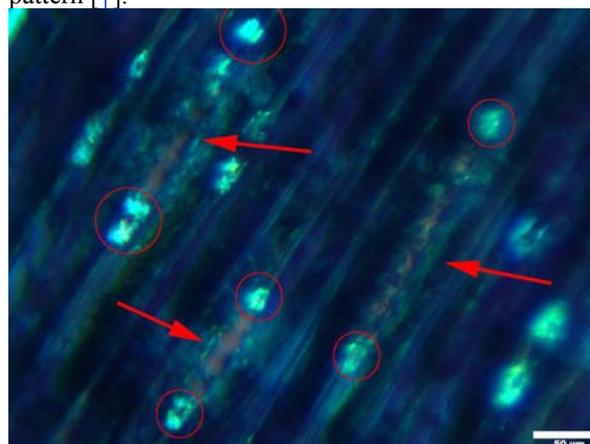


Fig. 5: Tangential section from the outermost part of a foundation pile (1.5 cm) under polarised light. Axial tracheids and ray parenchyma cells [↑] show a distinct loss of birefringence, only the ray tracheids remain birefringent [O].

3.4 Transmission electron microscopy

For analyses of the beginning of cell wall degradation and its related micromorphological cell wall modifications, transmission electron microscopy (TEM) was applied. This technique provides high resolution micrographs required to localize individual bacteria and their decay patterns within the different cell wall layers.

In accordance with light microscopic observations, TEM confirmed that the innermost parts of the foundation piles (7.5 cm) showed only initial stages of wood degradation, in particular the beginning of cell wall erosion of the S3 and S2 of the tracheids. Singh et al. (1990) described in detail that erosion bacteria have a preference for the S2, and that the S3 can also be degraded when the attack is severe. This paper also confirms the above observations with bacterial wall degradation mainly occurring in the S2 in combination with slight degradation of the S3 already at initial stages of decay (Figs. 6). Figure 7 clearly shows that the residual material in initially degraded S2 portions has a granular structure with lower electron density than the surrounding unmodified wall, while the S3 shows a more electron dense structure.

The intermediate zone of the foundation piles (6 cm) showed apparently sound tracheids adjacent to tracheids with incipient decay and others where severe bacterial decay occurred within the entire S2 (Figs. 9 and 10). Only a few bacteria were observed in close contact with the S3 (Fig. 8). The progress of bacterial decay is illustrated in Figure 8. Bacteria first degrade the S3, leaving an electron dense structure behind. Thereafter they form tunnel like

structures in the S2 which contain granular residual material, a pattern similar to that at advanced stages of S2 degradation (see also Figs. 9 and 10). Compared to the unmodified fine structure of the cell wall, the residual material at advanced stages of decay was either more or less dense, even within the S2 of an individual cell (Figs. 9-11). For bacteria degraded pine poles Björdal et al. (2000) described the occurrence of residual material with a loose structure, located near the middle lamellae, and material with a denser structure found in contact with the cell lumen. They assume that the compact residual material originated from secondary degraders, which are called scavenging bacteria. These bacteria are also assumed to utilise degraded cell wall material for their metabolism without degrading sound cell wall structures.

In the outermost zone (1.5 cm), the entire S2 and parts of the S3 showed severe degradation by bacteria. However, even at this stage, the highly lignified cell corners and CML regions of axial tracheids as well as the major portion of the S1 layers were unaffected (Figs. 11 and 13). Rays exhibited still sound tracheids with normal cell wall structures (Figs. 5 and 14). The observed decay patterns like tunnelling with or without discrete cross walls as well as large decayed secondary wall areas with residual material and no degradation of the CML represent a combination of the variously described specific patterns caused by tunnelling and erosion bacteria (e.g. Daniel and Nilsson, 1998).



Fig. 6: Innermost part of a foundation pile with beginning cell wall erosion by bacteria [↑]. The degradation process starts from the lumen side and proceeds in direction of the S2.

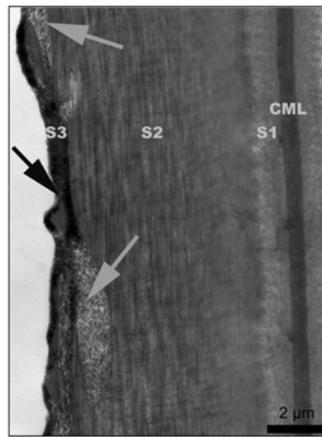


Fig. 7: Innermost part of a foundation pile in detail: parts of S3 are degraded by bacteria and are darker due to a higher electron density [↑]. Degraded parts of the S2 reveal a lower electron density [↑].

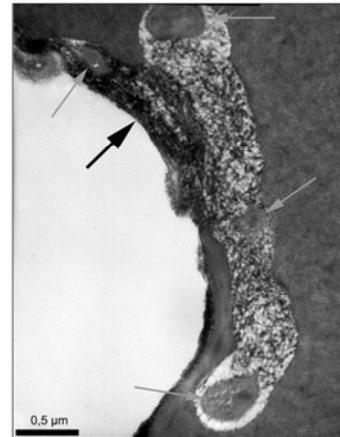


Fig. 8: Intermediate part of a foundation pile: bacteria [↑] first degrade the S3 [↑] and subsequently the S2 in a tunnel-like pattern leaving residual material behind.

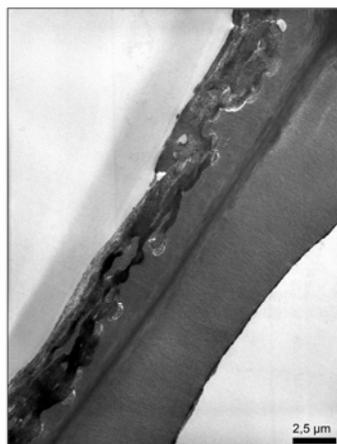


Fig. 9: Intermediate part of a foundation pile: bacteria degrade the S2 in a tunnelling action, leaving behind residual material with differing electron density.

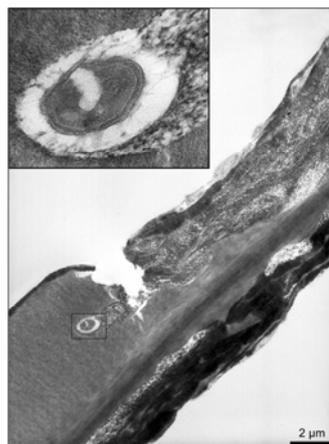


Fig. 10: Intermediate part of a foundation pile: the degradation process is not homogeneous in adjacent cell wall layers. The darker residual material appears compressed in comparison to the sound S2. Box: bacteria inside S2.

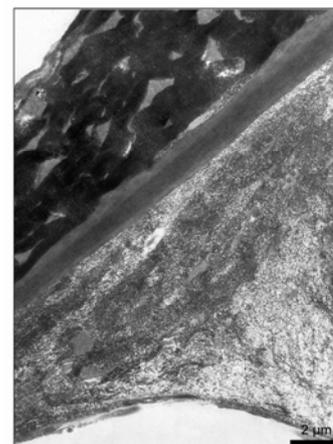


Fig. 11: Outermost part of a foundation pile: beneath the heavily degraded cell wall remain sound parts of the S2. The residual material reveals a tunnel-like structure with variable electron density.

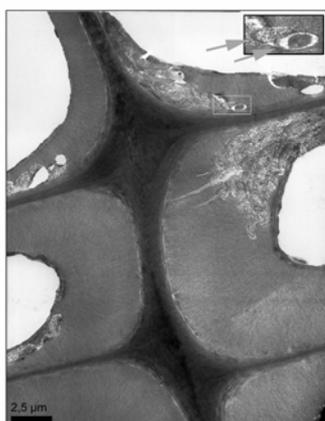


Fig. 12: Outermost part of a foundation pile: the degradation is heterogeneous throughout. In some parts a cross wall like structure can be observed (box [↑])

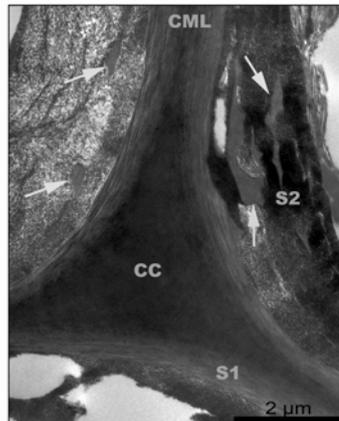


Fig. 13: Outermost part of a foundation pile: CML, cell corner, S1 and parts of S2 [↑] remain undamaged although the adjacent wall structures are heavily degraded.

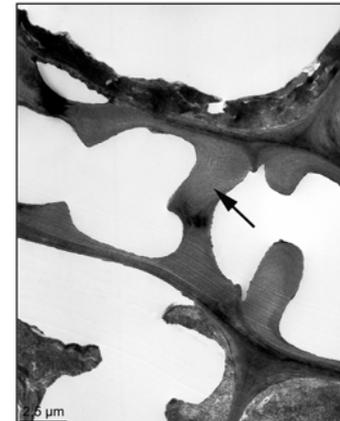


Fig. 14: Outermost part of a foundation pile: ray tracheids show hardly any damage [↑] although the adjacent walls are heavily degraded.

3.2 Cellular scanning UV microspectrophotometry

Scanning UV-image profiles of variously degraded cell wall layers of latewood tracheids are shown in Figures 15 and 16. The colour pixels indicate different intensities of UV absorbance at a wavelength of $\lambda_{280\text{nm}}$ (absorbance maximum of softwood lignin). The high resolution ($0.25 \times 0.25 \mu\text{m}^2$ per pixel) enables the differentiation of UV absorbance within different cell wall layers (Koch et al., 2003a).

Figure 15a represents a sound *Pinus sylvestris* latewood tracheid (control) with a typical absorbance profile of lignin distribution. The distinct lignification of the compound middle lamella (CML) is illustrated by purple to green colour pixels, with highest absorbance values in the cell corner regions (range of $\text{abs}_{280\text{nm}}$ 0.8-0.9). The UV-absorbance values of the CML were somewhat variable depending on the radial or tangential orientation (see also Takabe, 2002). The adjacent secondary walls showed significantly lower intensities in a range of $\text{abs}_{280\text{nm}}$ 0.3, illustrated by brown to red colour pixels on either side of the

compound middle lamella. The UV scanning profile revealed that the average lignin absorbance in the secondary wall is less than in the compound middle lamella. The absorbance values in the cell corners are about three times higher than those in the S2. This observation agrees with other topochemical studies of lignin distribution and concentration by scanning UV-microspectrophotometry (Scott et al., 1969; Koch and Grünwald, 2004; Singh et al., 2006).

In Figure 15b, recorded from the innermost part of a foundation pile (7.5 cm), the absorbance decreased in the region of pit channels and pit chambers (abs_{280nm} 0.2, Fig. 15b arrow), representing initial steps of cell wall decomposition caused by bacteria. The present study clearly confirmed that bacteria colonise wood via rays and pits, and that decay often starts at the bordered pits of tracheids (Björdal et al., 2005).

The UV-image profile in Figure 15c was recorded from cells of intermediate, moderately degraded pile parts (6 cm). It shows initial decay stages with pronounced local modifications of the UV absorbance within the S2 layers of latewood tracheids. The S2 revealed locally heterogeneous patterns of lower intensities (Fig. 15c, yellow arrows) as well as spots of higher absorbance values (range of abs_{280nm} 0.5-0.6, red arrows). The areas of high UV absorbance intensities represent highly condensed aromatic compounds of lignin or lignin derivatives with a strong absorbance maximum at 280 nm as detected by UV spectroscopic point measurements (comp. Fig. 17). The detection of specific areas with high and low UV absorbance intensities may be explained by different bacterial degradation strategies that lead to a non-homogeneous attack within the S2. During bacterial wood decay the lignocellulosic matrix of the S2 becomes decomposed into an amorphous material of bacterial slime and remaining unmodified and highly absorbing modified lignin (structures shown in Fig. 10). The local decrease in absorbance is either related to the occurrence of erosion troughs without UV-absorbing residual material or the presence of cavitation bacteria known to produce cavities in the S2 layer with little or no residual material (Singh and Butcher, 1991).

The outermost parts of the foundation piles (1.5 cm) revealed heavily degraded cell walls (Fig. 15d). The entire S2 is strongly affected by the bacteria as characterised by a steep increase of absorbance (range of abs_{280nm} 0.7-0.9) due to modified lignin with an absorbance maximum at 280 nm. The high absorbance mainly occurs in areas parallel to the radial CML. S2 areas with a decreased absorbance were only marginally detectable due to the compression of highly degraded and biochemically altered wall areas or the occurrence of secondary degraders (comp. Figs. 10, 11, 13). No distinct changes of the absorbance behaviour were observed in the tangential CML and the cell corners. The restriction of topochemical changes mostly to radial walls can be morphologically explained by the fact that the pits, main entry ports for bacteria, are located primarily in the radial walls of tracheids.

The results obtained from transverse sections are confirmed by measurements of radial cell walls. Fig. 16 shows the typical absorbance behaviour of a progressing decay as already described above, especially the occurrence of S2 areas with high UV absorbance intensity due to lignin modification. Furthermore, the empty spaces as a result of total bacterial cell wall degradation are visible in detail.

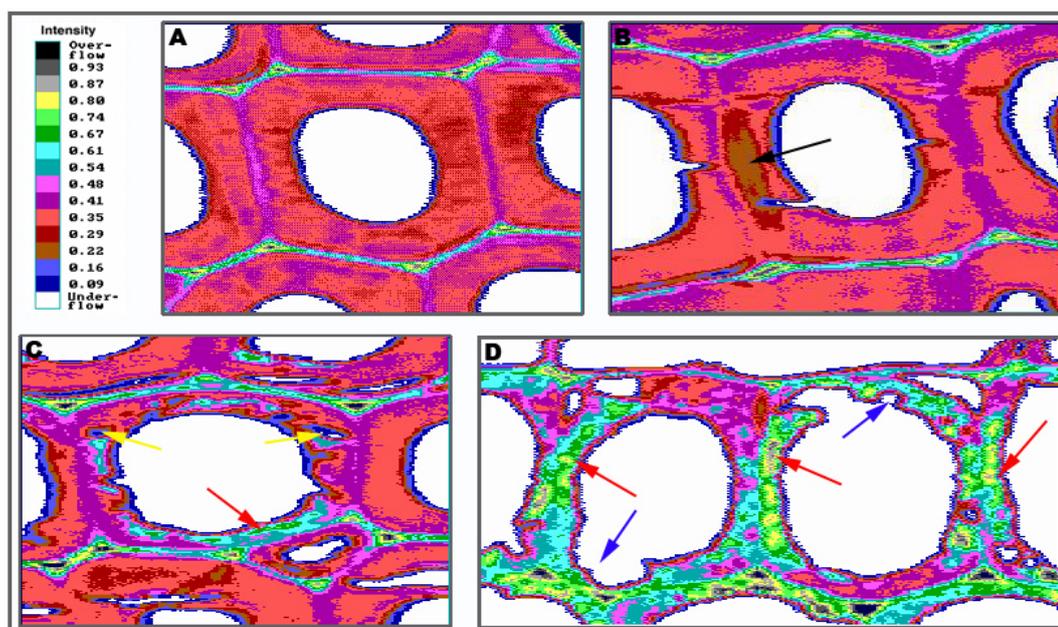


Fig. 15: Representative UV microscopic scanning profiles of *Pinus sylvestris* latewood tracheids (transverse section) with increasing intensities of bacterial degradation. The differently coloured pixels mark the absorbance intensity at $\lambda_{280\text{ nm}}$; A (top): sound control with highest absorbance values in the area of the compound middle lamella; B: tracheid from the innermost part of a foundation pile with beginning wood degradation in the area of pit channel and pit chamber [↑]; C: tracheid from the moderately degraded part of a foundation pile. The S2 reveals locally an inhomogeneous pattern of lower intensities [↑] as well as spots of higher absorbance values [↑]; D: tracheid from the outermost part of a foundation pile. The UV profile reveals a distinct lignin modification within the entire cell wall. High absorbance areas occur in the S2 [↑] and also erosion troughs where no absorbance remains [↑]. The S3 seems to be largely unaffected.

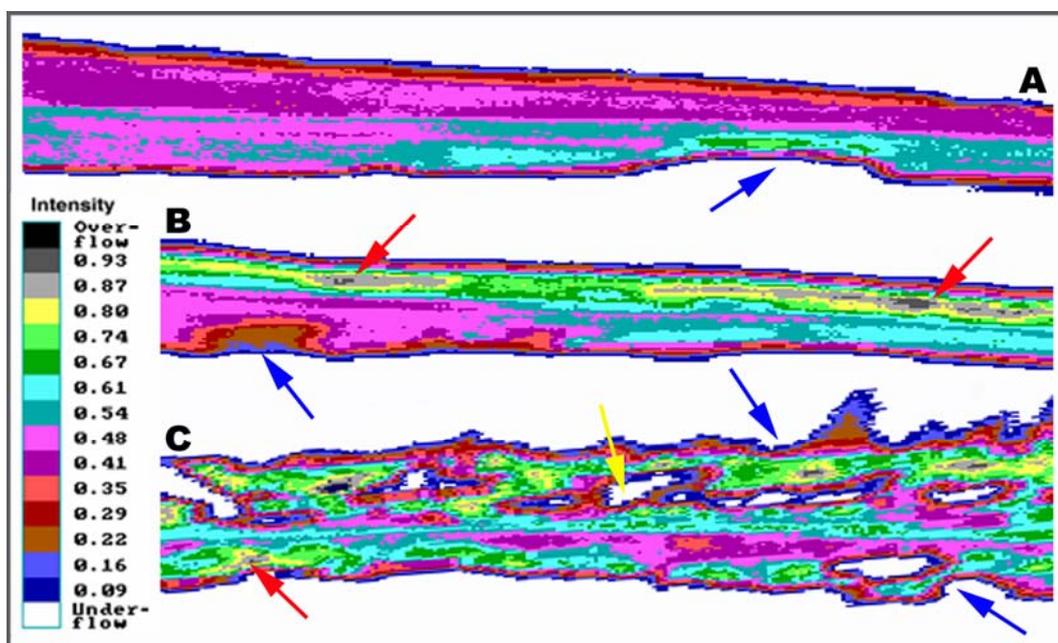


Fig. 16: Representative UV microscopic scanning profiles of *Pinus sylvestris* latewood tracheids (radial section) with increasing intensities of bacterial degradation. The differently coloured pixels mark the absorbance intensity at $\lambda_{280\text{ nm}}$; A (top): tracheid from the innermost part of a foundation pile with beginning wood degradation by erosion bacteria [↑] and higher absorbance underneath the erosion trough. B: tracheid from the moderately degraded part of a foundation pile. The S2 reveals locally an inhomogeneous pattern of lower intensities [↑] caused by erosion troughs on one side of CML and a profoundly changed absorbance behaviour of the S2 with higher absorbance values on the other side [↑]; C: tracheid from the outermost part of a foundation pile. The UV profile reveals a distinct lignin modification within the entire cell wall. High absorbance areas occur at the S2 [↑] and also erosion troughs [↑] and empty spaces inside the S2 where no absorbance remains [↑]. The S3 seems to be largely unaffected.

3.3 UV absorbance line spectra

Lignin decomposition and modification during bacterial wood degradation in the pine foundation piles was also studied by UV point analyses within a wavelength range between $\lambda_{240\text{ nm}}$ and $\lambda_{400\text{ nm}}$. Figure 17 shows representative UV absorbance line spectra of the S2 of latewood tracheids at different stages of degradation (sound, degraded and heavily degraded). The undamaged S2 (Fig. 17 black line) shows the UV absorbance characteristics typical of lignified softwood tracheids with highest UV absorbance at $\lambda_{280\text{ nm}}$ (S2 $\text{abs}_{280\text{ nm}}$ 0.3) and a continuous decrease of absorbance with increasing wavelength (Koch and Kleist, 2001).

The moderately degraded S2 cell wall areas display an absorbance maximum at $\lambda_{280\text{ nm}}$ of around 0.32.

The UV absorbance spectra of S2 layers of intensively degraded tracheids in the outermost pile portions are characterised by a distinct increase of the absorbance maximum up to $\text{abs}_{280\text{ nm}}$ 0.42 (Fig. 17 dashed line). No shift of the absorbance maximum to higher wavelength was observed.

The process of cell wall degradation by bacteria is yet not entirely understood. It is commonly accepted that the degradation proceeds slowly and that the residual material consists of bacterial slime, bacteria and lignin derivatives (Singh et al., 1990). The spectral characteristics confirm that the residual material consists of unmodified and modified lignin. The increase in UV-absorbance as compared to the S2 of sound wood is caused by a depolymerization of the native ligno-cellulosic matrix.

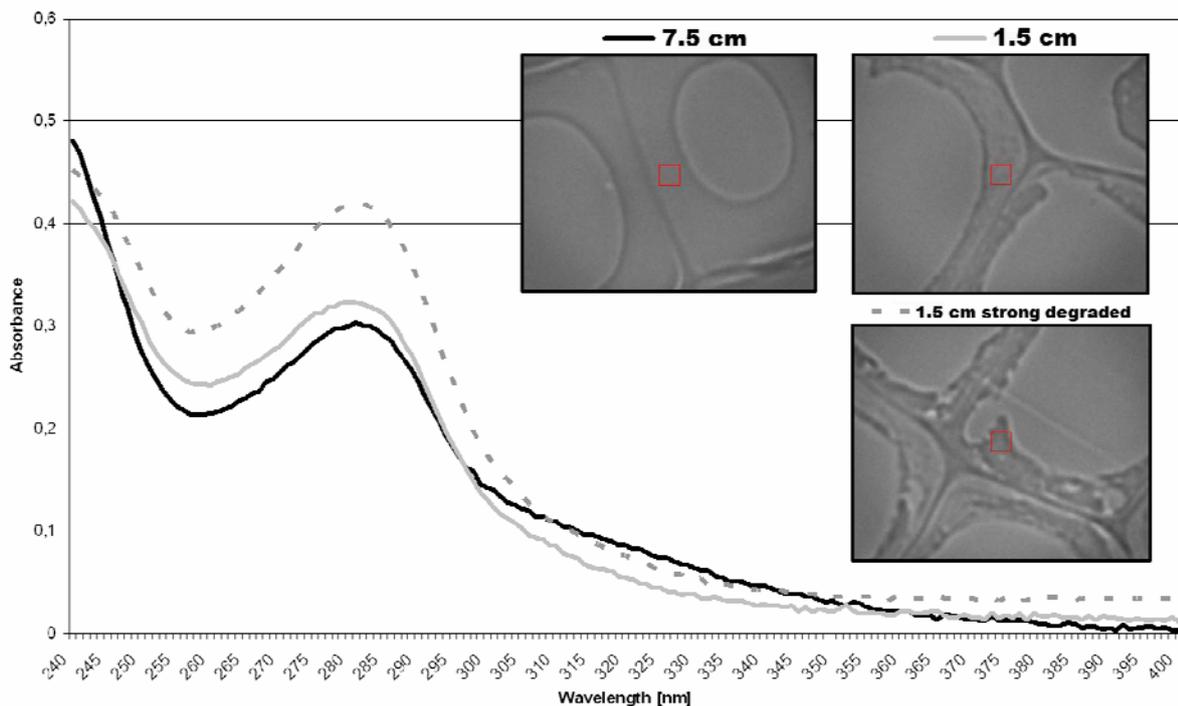


Fig. 17: UV absorbance line spectra of *Pinus sylvestris* sapwood degraded by bacteria (average of 9-14 individual point measurements). The spectra were taken from the S2 of latewood tracheids from the innermost (7.5 cm) and outermost (1.5 cm) part of a foundation pile with different degradation intensities.

In general, the recorded topochemical details demonstrate that the bacterial degradation of the pine poles is strongest in the outermost portions. The decay intensity in the inner pile portions decreases in and no pronounced degradation was found in the innermost portions. The results support the usefulness of the scanning UV microspectrophotometry technique for interpretation and detection of the bacterial wood degradation process.

4. Conclusions

The subcellular analyses of cell wall degradation by bacteria were studied by means of light microscopy, TEM and UV microspectrophotometry. TEM reveals basic information on morphological changes of the cell wall structure and shows that bacterial wall degradation occurs mainly in the S2 with a degradation of the S3 already at initial stages. Even at late stages of bacterial decay, cell wall degradation is not homogeneous, the highly lignified cell corners and CML regions of axial tracheids as well as the major parts of the S1 are unaffected while the entire S2 and parts of the S3 in those cells are degraded. Ray tracheids are not affected by bacterial decay and retain their regular wall structures.

UMSP area scans and additional point analyses allow insights into the topochemistry *in situ*. In particular, the technique provides fundamental information on the lignin modification process during cell wall decomposition by bacteria. Lignin modification occurs mainly in the S2, the beginning of lignin modification becomes evident at the innermost part of the secondary wall layer. The spectral characteristics of the point measurements confirm that the residual material left behind after cell wall degradation by bacteria consists of unmodified and modified lignin. The increase in UV-absorbance as compared to the S2 of sound wood is caused by a depolymerization of the native ligno-cellulosic matrix. TEM and UV microspectrophotometry techniques as used in combination enable the determination of variations in lignin distribution and modification within individual cell wall layers.

Acknowledgements

The authors thank D. C. Knospe, Hamburg, for supporting this work with samples, Prof. Dr. O. Schmidt and Dr H.G. Richter Hamburg, for critical reading of the manuscript and T. Potsch and K. Brandt for the assistance in embedding, sectioning and microscopic analyses.

References

- Björdal, C., Daniel, G., Nilsson, T., 2000. Depth of burial, an important factor in controlling bacterial decay of waterlogged archaeological poles *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 15-26.
- Björdal, C., Nilsson, T., Bardage, S., 2005. Three-dimensional visualisation of bacterial decay in individual tracheids of *Pinus sylvestris* *Holzforschung*, Walter de Gruyter, 59, 178-182.
- Björdal, C., Nilsson, T., Daniel, G., 1999. Microbial decay of waterlogged archaeological wood found in Sweden. Applicable to archaeology and conservation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 43, 63-73.
- Blanchette, R. A. A., 2000. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 189-204.
- Daniel, G., 1994. Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 199-233.
- Daniel, G., Nilsson, T., 1985. Ultrastructural and T.E.M. - EDAX Studies on the degradation of CCA treated radiata pine by tunnelling bacteria. Swedish University of Agricultural Sciences, 1-14.
- Daniel, G. F., Nilsson, T., Singh, A., 1987. Degradation of lignocellulosics by unique tunnel-forming bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 943-948.
- Daniel, G., Nilsson, T., 1998. Developments in the Study of Soft Rot and Bacterial Decay. *Forest Products Biotechnology*, 37-62.
- Donaldson, L., 1992. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata* D. Don. *IAWA Bulletin n. s.* 13, 381-387.

- Fergus, B., Goring, D. A. I., 1969. The topochemistry of delignification in kraft and neutral sulphite pulping of birch wood. Pulp and Paper Magazine of Canada, 55th annual meeting of the technical section, T314, 65-73.
- Hoffmann, P., Singh, A., Kim, Y., Wi, S., Kim, I., Schmitt, U., 2004. The Bremen Cog of 1380 - An electron microscopic study of its degraded wood before and after stabilization with PEG. *Holzforschung*, 58, 211-218.
- Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137-138.
- Kim, JS., Lee, KH., Cho, CH., Koch, G., Kim, YS., 2008. Micromorphological characteristics and lignin distribution in bamboo (*Phyllostachys pubescens*) degraded by the white rot fungus *Lentinus edodes*. *Holzforschung* 62, 481-487.
- Kim, Y. S., Singh, A. P., 2000. Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: A review. *IAWA Journal*, 21, 135-155.
- Klaassen, R. K., 2008. Bacterial decay in wooden foundation piles--Patterns and causes: A study of historical pile foundations in the Netherlands. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61, 45 – 60.
- Klaassen, R. K., 2009. Factors that influence the speed of bacterial wood degradation. 10 COST IE 0607 HAMBURG.
- Koch, G., Grünwald, C., 2004. Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. *Wood Fiber Cell Walls: Methods to study their Formation, Structure and Properties*, 119-130.
- Koch, G., Kleist, G., 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung*, 55, 563-567.
- Koch, G., Puls, J., Bauch, J., 2003a. Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung*, 57, 339-345.
- Koch, G., Patt, R., Kordsachia, O., 2003b. Topochemical investigation on delignification of *Picea abies* [L.] Karst. during alkaline sulfite (ASA) and bisulfite pulping by scanning UV microspectrophotometry. *Holzforschung*, 57, 611-618.
- Liese, W., Schmidt, O., Schmitt, U., 1995. On the behaviour of hardwood pits towards bacteria during water storage. *Holzforschung*, 49, 389-393.
- Mendonça R., Ferraz, A., Kordsachia, O., Koch, G., 2004. Cellular UV-microspectrophotometric investigations on pine wood (*Pinus taeda* and *Pinus elliottii*) delignification during biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilbn. & Ryv. and alkaline sulfite/anthraquinone treatment. *Wood Science and Technology*, 38, 567-575.
- Nilsson, T., Singh, A. P., 1992. Cavitation bacteria. *The International Research Group on Wood Preservation*, 15, 1-15.
- Nilsson, T., Singh, A., Daniel, G., 1992. Ultrastructure of the attack of *Eusideroxylon zwageri* wood by tunnelling bacteria. *Holzforschung*, 46, 361-367.
- Rehbein, M., Koch, G., Klein, P., 2008. Moorleiche "Frau von Peiting". *Holzbiologische Befunde vom Sarg. Restauro*, 5, 320-325.
- Rehbein, M., Pereira, M., Koch, G., Kordsachia, O., 2010. Topochemical investigation into the delignification of *Eucalyptus globulus* chips during semi-chemical sulfite pulping. *Wood Science and Technology*, 44, 435-449.
- Schmidt, O., 1995. Holzabbau durch Bakterien *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 11, 428.
- Schmidt, O., 2006. *Wood and tree fungi. Biology, damage, protection and use.* Berlin: Springer.
- Schmidt, O., Bauch, J., 1980. Lignin in woody tissues after chemical pretreatment and bacterial attack. *Wood Science and Technology*, 14, 229-239.

- Schmidt, O., Liese, W., 1994. Occurrence and significance of bacteria in wood. *Holzforschung*, 48, 271-277.
- Schmidt, O., Nagashima, Y., Liese, W., Schmitt, U., 1987. Bacterial wood degradation studies under laboratory conditions and lakes. *Holzforschung*, 41, 137-140.
- Schmitt, U., Hoffmann, P., 1998. Zur Zellwandstruktur von 1600 Jahre altem, wassergesättigtem Eichenholz. *European Journal of Wood and Wood Products*, 56, 211-212.
- Schmitt, U., Melcher, E., 2004. Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. *COST Action E20 Wood Fibre Cell Wall Structure*, 105-117.
- Schwarze, F. W., 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, 21, 133-170.
- Scott, J. A. N., Procter, A. R., Fergus, B. J., Goring, D. A. I., 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood description and validity of the technique. *Wood Science and Technology*, 3, 73-92.
- Singh, A., 1989. Certain aspects of bacterial degradation of *pinus radiata* wood. *IAWA*, 10, 405-415.
- Singh, A. P., 1997. Initial pit borders in *Pinus radiata* are resistant to degradation by soft rot fungi and erosion bacteria but not tunnelling bacteria. *Holzforschung*, 51, 15-18.
- Singh, A., Butcher, A., 1986. Degradation of CCA-treated *Pinus radiata* posts by erosion bacteria. *Wood Science and Technology*, 10, 140-144.
- Singh, A. P., Butcher, J. A., 1991. Bacterial degradation of wood cell walls: A review of degradation patterns. *Journal of the Institute of Wood Science*, 12, 143-157.
- Singh, A., Nilsson, T., Daniel, G., 1990. Bacterial attack of *Pinus sylvestris* wood under near anaerobic conditions. *Journal of the Institute of Wood Science*, 11, 237-249.
- Singh, A. P., Schmitt, U., Dawson, B. S., Rickard, C., 2009. Biomodification of *Pinus radiata* wood to enhance penetrability. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 39, 145-151.
- Singh, A., Schmitt, U., Möller, R., Dawson, B., Koch, G., 2006. Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. *Wood Science and Technology*, 40, 16-25.
- Spurr, AR., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43.
- Takabe, K., 2002. Cell walls of woody plants: autoradiography and ultraviolet microscopy. In: Chaffey, N. (ed.), *Wood formation in trees*: 159-177. Taylor & Francis, London.

Moorleiche „*Frau von Peiting*“ Holzbiologische Befunde vom Sarg

Wood biological investigation on the coffin of the bog body „*Frau von Peiting*“

Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein¹, PD Dr. Gerald Koch¹ und Prof. Dr. Peter Klein²

¹ Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI). Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB), Leuschnerstraße 91, 21031 Hamburg

² Abteilung Holzbiologie im Zentrum Holzwirtschaft der Universität Hamburg, Leuschnerstraße 91, 21031 Hamburg

Diplom-Holzwirt Mathias Rehbein, ist wissenschaftlicher Angestellter am Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI), Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB). Tätigkeitsfeld: Erstellung von Gutachten für das Fachgebiet Holzqualität und Holzschäden. Laufende Promotion an der Universität Hamburg mit dem Schwerpunkt: Topochemische Charakterisierung delignifizierter Hölzer.

PD Dr. Gerald Koch ist wissenschaftlicher Leiter der Holzsammlung und des holzanatomischen Labors am Institut für Holztechnologie und Holzbiologie (HTB) des vTI, Venia legendi für das Fachgebiet Holzbiologie an der Universität Hamburg, Gutachter für Holzartenbestimmung und das Washingtoner Artenschutzabkommen CITES, Mitglied in Normausschüssen und des Fachgremiums Holzarten für den Fensterbau (VFF).

Dr. habil. Peter Klein ist wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Holzbiologie an der Universität Hamburg. Venia legendi für das Fachgebiet Holzbiologie, Wissenschaftlicher Schwerpunkt „Dendrochronologie an Kunstwerken“. Honorarprofessor an der Hochschule für angewandte Wissenschaften, Hildesheim, Fachrichtung Restaurierung.

Zusammenfassung:

Der hölzerne Sarg der Moorleiche „*Frau von Peiting*“ weist einen sehr guten Erhaltungszustand auf. Zur Charakterisierung des Holzgewebes (Holzartenbestimmung) und mikrobiologischen Holzabbaus wurden lichtmikroskopische und histochemische Untersuchungen durchgeführt. Die holzanatomischen Untersuchungen haben eindeutig ergeben, dass die Seitenbretter sowie Deckel und Boden des Sarges aus der Holzart Fichte = *Picea abies* und die Befestigungsdübel aus der Holzart Esche = *Fraxinus excelsior* hergestellt wurden. Eine verlässliche dendrochronologische Altersbestimmung (Jahringbreitenvermessung) ist aufgrund der zu geringen Anzahl an Jahrringen für das Objekt nicht möglich. Die mikrobiellen Untersuchungen ergeben für die Seitenbretter aus Fichte einen leichten und für die Holzdübel einen intensiveren Holzabbau, der im Wesentlichen durch Bakterien verursacht wurde. Der verhältnismäßig gute Erhaltungszustand des Sarges muss auf die spezifischen Lagerungsbedingungen (saurer Bodenmilieu unter Sauerstoffarmut) zurückgeführt werden, was durch elementanalytische Untersuchungen des Holzgewebes belegt werden kann.

Abstract:

The wooden coffin of the bog body „*Frau von Peiting*“ is in a good state of conservation. Light microscopic and histochemical investigations were carried out to study the wood structure (wood identification) and microbiological decay of the wooden tissue. The wood anatomical studies reveal that the boards (sides, bottom, and cover) are manufactured from spruce = *Picea abies*. The dowels for fixing the boards consist of ash = *Fraxinus excelsior*. A reliable dendrochronological determination of the age of the coffin is not possible, because of too few numbers of growth rings. The microbiological studies reveal a slight wood decay of the spruce tissue and a more insensitive decay of the dowels from ash mainly caused by bacteria. The good preservation state must be explained by the specific storage conditions of the coffin (acid soil conditions without oxygen) which were characterised by spectroscopic analyses of the element content in the wooden tissue.

Keywords:

Holzartenbestimmung, Holz Anatomie, Dendrochronologie, Mikrobieller Holzabbau, Bakterien, Mikroskopische Holzuntersuchung, Raster- / Transmissions-elektronenmikroskopie

Vorgeschichte:

Am 23. Juli 1957 wurde beim Abbau des Moores „Schwarzer Laich“ in der Nähe des Ortes Peiting (Landkreis Schongau) ein hölzerner Sarg mit der gut konservierten Leiche einer Frau gefunden. Der auf das Jahr 1110±80 n.Chr. (¹⁴C-Isotopen-Methode) datierte Sarg weist, ebenso wie der Leichnam, einen guten bis sehr guten Erhaltungszustand auf. Im Jahr 2007 wurden an der ehemaligen Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (jetzt Johann Heinrich von Thünen Institut) umfassende Untersuchungen am Holz des Sarges durchgeführt (Abb. 1).



Abbildung 1: Untersuchungsmaterial (Holzdübel und Holzspan aus dem Seitenbrett „Bruchstelle/Fußende“) für die holzbiologischen Untersuchungen

Anatomische Untersuchungen zur Holzartenbestimmung

Für die holz anatomische Bestimmung einzelner Bauteile des Sarges wurden ein loser Holzspan aus dem Seitenbrett (Bruchstelle/Fußende) und ein Holzdübel zur Befestigung der

Seitenbretter zur Verfügung gestellt (Abb. 1). Von den Proben wurden Mikrotomschnitte (Schichtdicken ca. 10 bis 15 µm) in den drei holzanatomischen Richtungen (Quer-, Tangential- und Radialschnitt) hergestellt. Die Schnitte wurden zur besseren Kontrastierung des Holzgewebes mit den Standard-Farbreagenzien Safranin/Astrablau angefärbt und an einem Forschungsmikroskop mit digitaler Bildanalyse lichtmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurden an den beiden Mustern rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (REM [HITACHI]) zur feinstrukturellen Charakterisierung des Holzgewebes durchgeführt. Die mikroskopischen Untersuchungen führen zu dem Ergebnis, dass das Seitenbrett aus der Holzart Fichte = *Picea abies* (Familie der PINACEAE) hergestellt wurde. Der untersuchte Dübel zeigt eine vollständige Übereinstimmung mit dem Holz der botanischen Art *Fraxinus excelsior* = Esche aus der Familie der OLEACEAE.

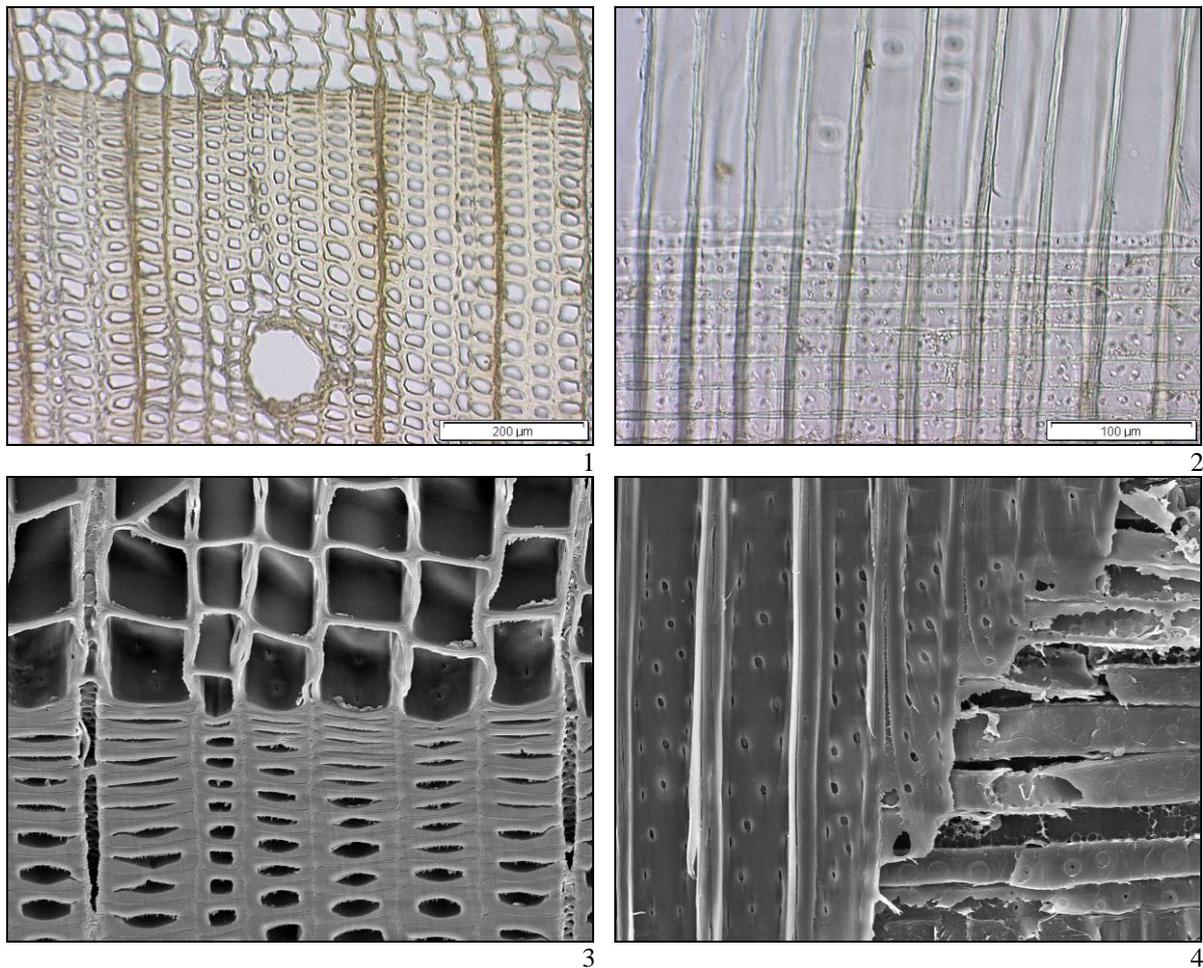


Abbildung 2: Lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Holzgewebes der Fichte (Holzspan Seitenbrett „Bruchstelle/Fußende“). 1: Querschnitt (Jahringgrenze) mit axialem Harzkanal; 2: Radialschnitt (Kreuzungsfeld) mit den für Fichte typischen piceoiden Kreuzungsfeldtüpfeln; 3: Detailaufnahme eines Jahringübergangs (Querschnitt) mit dem Rasterelektronenmikroskop; 4: Detailaufnahme eines Kreuzungsfeldes (Radialschnitt) mit dem Rasterelektronenmikroskop

Das Ergebnis der Holzartenbestimmung für den Holzspan aus dem Seitenbrett (Fichte) widerlegt die bisherigen Beschreibungen und Dokumentationen in denen angegeben wird, dass das Holz des Sarges (Seitenbretter, Boden und Deckel) aus Kiefer (bot. = *Pinus sylvestris*, Familie der PINACEAE) besteht.

Das Holzgewebe der Fichte und Kiefer kann zweifelsfrei an dem diagnostischen Strukturmerkmal der piceoiden (für *Picea abies*) und fensterförmigen (für *Pinus sylvestris*) Kreuzungsfeldtüpfel unterschieden werden. Die untersuchten Schnittpräparate aus dem Seitenbrett zeigen eindeutig piceoide Kreuzungsfeldtüpfel, wie sie bei der Fichte vorkommen. Eine anatomisch/strukturelle Abgrenzung zur Holzart Tanne (bot. = *Abies alba*), die der Fichte makroskopisch ähnelt, erfolgte mikroskopisch u.a. durch den Nachweis von regulären (d.h. nicht traumatischen) Harzkanälen und Quertracheiden (Abb. 2).

Für den Holzdübel (Verbindungselement) kann eindeutig die Laubholzart Esche = *Fraxinus excelsior* bestimmt werden. Eschenholz wird traditionell aufgrund seiner hohen dynamischen Festigkeitswerte für den Gestell- und Gerätebau eingesetzt und eignet sich besonders gut als konstruktives Verbindungselement (Holzdübel), was im vorliegenden Fall für eine gezielte Holzartenauswahl spricht.

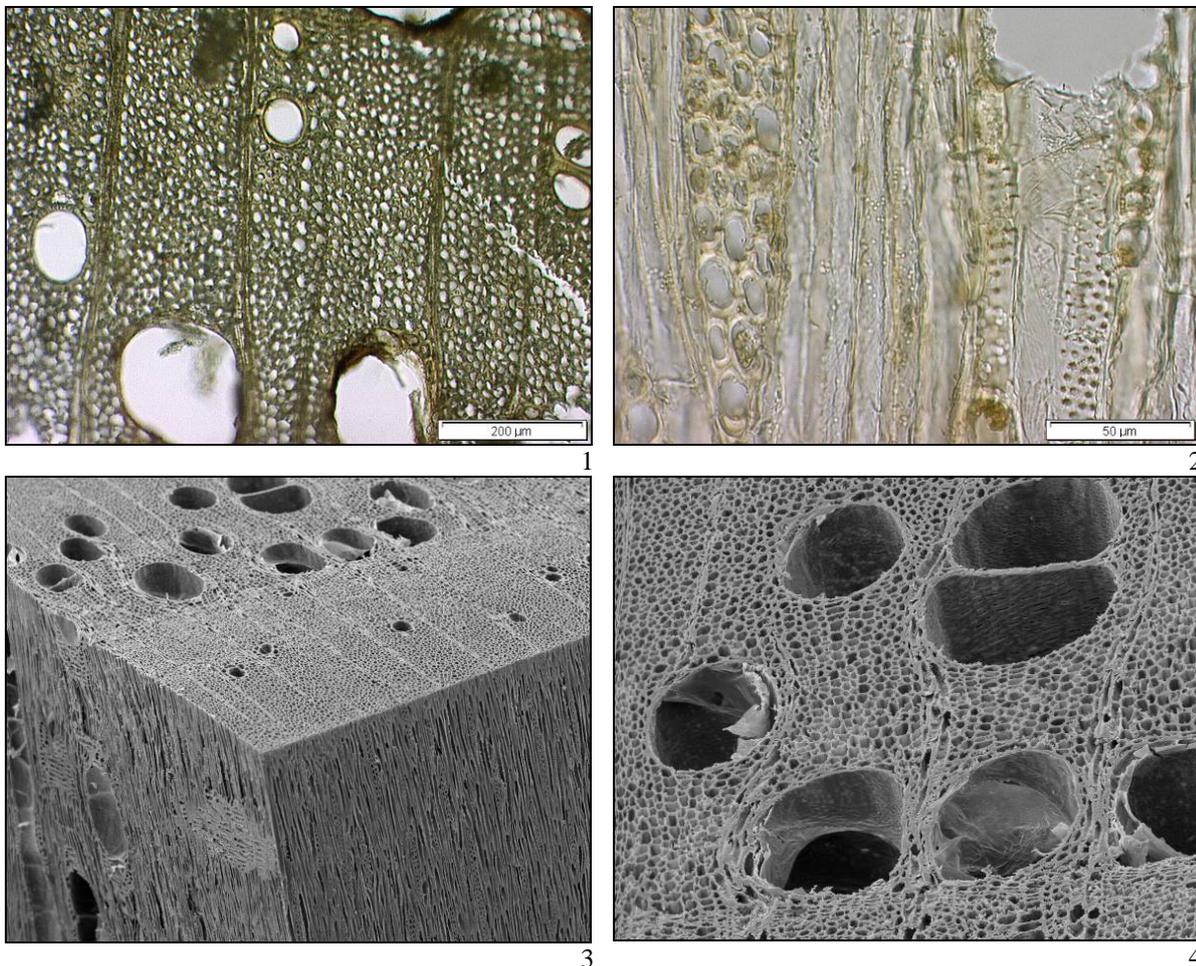


Abbildung 3: Lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Holzgewebes der Esche (Holzdübel). 1: Querschnitt (Übergang vom Früh- zum Spätholz) mit ringporiger Gefäßanordnung; 2: Tangentialschnitt mit angeschnittenem Holzstrahl und kleinen Gefäßtüpfeln (\varnothing ca. 4 µm); 3: Übersichtsaufnahme des Holzgewebes der Esche in den drei anatomischen Richtungen (Rasterelektronenmikroskop); 4: Detailaufnahme der Gefäße (Poren) mit Thyllen = Gefäßverschlüsse (Rasterelektronenmikroskop)

Altersbestimmung des Holzes

Für eine Altersbestimmung des Holzes (= Dendrochronologie) werden die Jahrringbreiten eines hölzernen Objektes vermessen und mit bestehenden Standardchronologien rezenter Bäume oder datierten Objekten eines entsprechenden Wuchsgebietes verglichen. Das Prinzip der Altersbestimmung basiert darauf, dass in Abhängigkeit von klimatische Einflüssen (vor allem Niederschläge und Temperaturen) unterschiedlich breite Jahrringe im lebenden Baum ausgebildet werden, die als Marker („Weiser“) für eine Altersbestimmung dienen. Dendrochronologische Untersuchungen zur Altersbestimmung können nur verlässlich an einigen Laubbäumen (z.B. Eiche, Buche) und Nadelhölzern durchgeführt werden, die aufgrund ihrer Strukturmerkmale ausgeprägte Zuwachszonen ausbilden, die einem Jahreszuwachs entsprechen.

Die für die Bretter des Holzсарges bestimmte Holzart Fichte eignet sich prinzipiell für eine dendrochronologische Untersuchung. Voraussetzung ist jedoch, dass das zu untersuchende Objekt mindestens 50 Jahrringe auf einem durchgehenden Querschnitt aufweist.

Die makroskopisch (visuell) untersuchten Querschnitte der Bretter des Sarges weisen alle deutlich unter 50 Jahrringe auf (ca. 30 bis 35), so dass eine verlässliche dendrochronologische Altersbestimmung des Objektes nicht möglich ist. Weiterhin weist das Holzgewebe relativ breite (einheitliche) Jahrringe ohne markante z.B. feinringige „Weiserringe“ auf, was eine verlässliche Datierung zusätzlich erschwert bzw. nicht möglich macht (Abb. 4). Für die Altersbestimmung des Objektes ist in diesem Fall die ^{14}C -Isotopen-Methode verlässlicher, nach der ein Alter von 1110 ± 80 Jahre n. Chr. Geb. bestimmt wurde.



Abbildung 4: Makroskopische Aufnahme der Zuwachszonen (= Jahrringe) an den Seitenflächen (Querschnitte) des Sarges. Die geringe Anzahl der Jahrringe und die „einheitliche“ Jahrringstruktur eignen sich nicht für eine Altersbestimmung des Holzes

Mikrobiologische Untersuchungen des Holzgewebes

Die mikrobiologischen Untersuchungen zum Abbau des Holzgewebes erfolgten an den Proben, die auch für die holzanatomischen Analysen zur Verfügung gestellt wurden. Von den Proben wurden Handschnitte sowie Mikrotomschnitte (Schichtdicken ca. 10 bis 15 µm) in transversaler und tangentialer Richtung hergestellt. Die Schnitte wurden zur besseren Kontrastierung des Holzgewebes und des mikrobiellen Holzabbaus mit den Farbreagenzien Pikrin-Anilinblau sowie Kaliumpermanganat angefärbt und an einem Forschungsmikroskop AX 70 [Olympus] mit digitaler Bildanalyse lichtmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurden an den beiden Mustern (Sargwand/Sargnagel) rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronische Untersuchungen (REM / TEM) zur feinstrukturellen Charakterisierung des Holzabbaus durchgeführt.

Das Holzgewebe des untersuchten Spans aus Fichte (Seitenbrett „Bruchstelle/Fußende“), deren natürliche Dauerhaftigkeit nach DIN EN 350-2 als „wenig dauerhaft“ (entsprechend Klasse 4) eingestuft wird, weist einen außergewöhnlich guten Erhaltungszustand auf, der auf die besonderen Lagerungsbedingungen im Moor (Lagerung unter Sauerstoffarmut und saurem pH-Wert Milieu) zurückgeführt werden muss. Eine solche Umgebung spricht gegen einen Befall durch holzerstörende Basidiomyceten, die unter Sauerstoffmangel nur geringfügige bis keine Abbauleistungen erbringen können. Je nach Sauerstoffzufuhr sind in einem solchen Milieu Ascomyceten, Deuteromyceten (Moderfäulepilze) oder Bakterien als Verursacher des Zellwandabbaus zu erwarten.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen am Holzspan aus dem Seitenbrett (Fichte) zeigen im Randbereich der Proben (Moorseite) sowie im Bereich der Holzstrahlen und dem umgebenden Gewebe unterschiedliche Stadien des Zellwandabbaus (Abb. 5). Pilzhypen konnten nur vereinzelt im Lumen der Tracheiden nachgewiesen werden und nicht, wie für holzabbauende Pilze typisch, im Bereich der Zellwände.

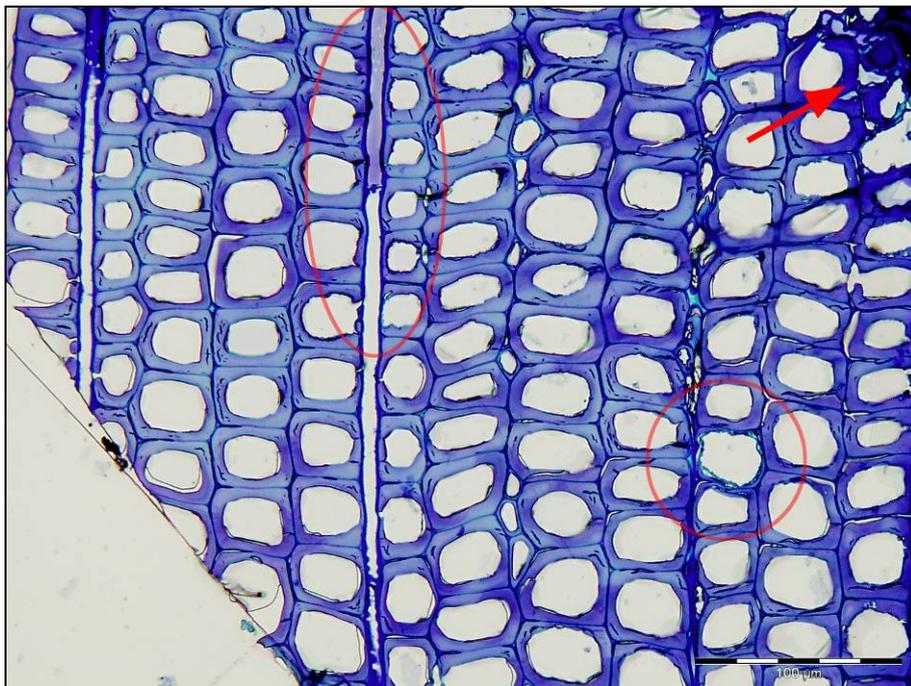


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Querschnittsaufnahme der Fichte. Randbereich mit zerstörtem Spätholz (Pfeil) und zusätzlich abgebauten Sekundärwandbereichen (Kreise). Die Zerstörungen gehen vom Holzstrahl aus.

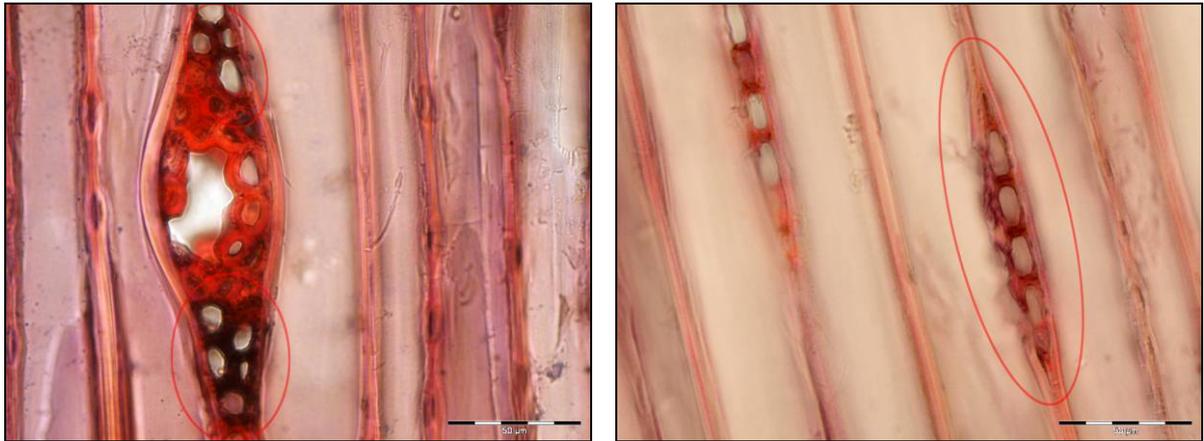


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen vom Holzstrahl der Fichte. Links: Holzstrahl mit Harzkanal und befallenen Zellbereichen (dunkle Zellen im Kreis); Rechts: Holzstrahl mit abgebauten Zellwänden (Kreis)

Bei detaillierter lichtmikroskopischer Betrachtung der Holzstrahlen ist eine beginnende Zerstörung der Zellwände deutlich zu erkennen. Die befallenen Bereiche breiten sich von den Holzstrahlen ausgehend über die Zelltüpfel in das benachbarte Zellgewebe aus (Abb. 5-6). Die Betrachtung der Schnitte unter Anwendung eines Polarisationsfilters, der die kristallinen Bereiche der Cellulose besonders hervorhebt (sog. Doppelbrechung), ergab für den größten Teil des Holzgewebes der Fichte einen geringfügigen Celluloseabbau. Eine stärkere Abnahme der Doppelbrechung tritt nur in den Bereichen auf, die im Zuge eines fortgeschrittenen Zellwandabbaus kaum noch Zellwandmaterial (Sekundärwandschichten) aufweisen. Ein selektiver Celluloseabbau (Braunfäulebefall) kann somit nicht bestätigt werden, vielmehr handelt es sich hierbei um einen vom Zelllumen ausgehenden simultanen Abbau der Zellwandbestandteile.

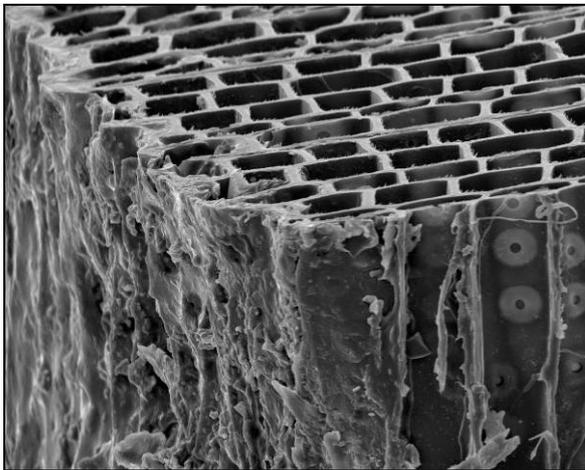


Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Fichte. Randbereich mit starker Zerstörung des Zellwandgefüges

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (47–2200 fache Vergrößerung) belegen, dass ein Abbau des Holzgewebes vom Randbereich ausgehend stattgefunden hat. Insgesamt ist das Zellgewebe, wie auch die lichtmikroskopischen Schnitte belegen, in einem guten Zustand. Die abgebauten Holzzellen liegen vermehrt im Randbereich der Probe (Abb. 7). Mit Hilfe der transmissionselektronischen Untersuchungen konnten in den angegriffenen Bereichen der Zellwände Erosions-Bakterien als Verursacher des

Holzabbaus identifiziert werden. Der Bakterienbefall weist einen kraterförmigen Abbau (Erosion) der Zellwand vom Lumen ausgehend auf, sowie einzelne Löcher (Kavernen) im Bereich der Sekundärwand S2 (Abb. 8). Vereinzelt sind durch Moderfäuleerreger verursachte Kavernen vorhanden. Ein Befall durch Weißfäule- sowie Braunfäulepilze konnte nicht bestätigt werden.

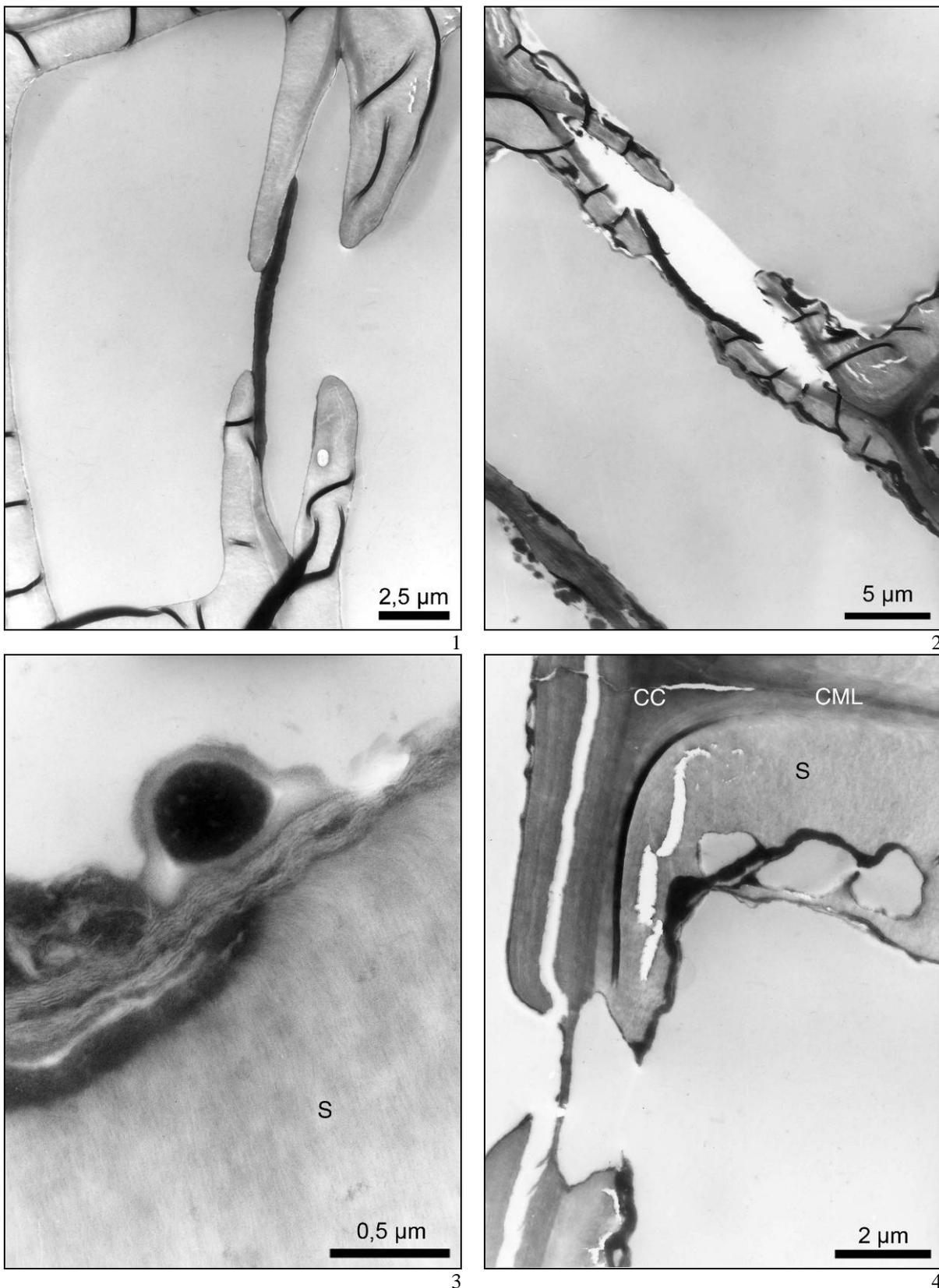


Abbildung 8: Transmissionselektronische Aufnahmen der Fichte. 1: Intakter Fichtentüpfel; 2: Befallener Fichtentüpfel; 3: Sekundärwand (S) zum Zelllumen mit Bakterium; 4: Durch Bakterien verursachte Kavernen im Sekundärwandbereich (S), die Mittellamelle (CML) sowie die Zellzwinkel (CC) erscheinen intakt

Das Gewebe des HolzdüBELs aus Esche weist im Vergleich zum Fichtenholz (Seitenbrett) einen intensiveren mikrobiellen Holzabbau auf. Als sog. Splintholzbaum werden im

Holzgewebe der Esche keine dauerhaften (phenolischen) Inhaltsstoffe synthetisiert und eingelagert, so dass das Eschenholz nach DIN EN 350-2 als „nicht dauerhaft“ (entsprechend Klasse 5) eingestuft wird. Neben dem für die Fichte ermittelten Zellwandabbau durch Bakterien weist das Holzgewebe der Esche zusätzlich einen starken Verlust der Doppelbrechung im polarisierten Licht auf (Abb. 9). Diese Untersuchungsmethode hebt die cellulosehaltigen Bereiche der Zellwand optisch hervor. Zellwände die durch einen selektiven Abbau einen geringeren Celluloseanteil aufweisen erscheinen dunkel (Hinweis auf einen Braunfäulebefall). Pilzhyphen zur Bestätigung einer Braunfäule konnten weder lichtmikroskopisch noch durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie sicher bestimmt werden. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigen deutlich den Verlust der Sekundärwände, die bevorzugt in den Frühholzbereichen abgebaut wurden (Abb. 9). Der Zugang der Mikroorganismen erfolgte über die Wasserleitsysteme (Gefäße) und von dort über die Tüpfel in das umgebende Zellgewebe.

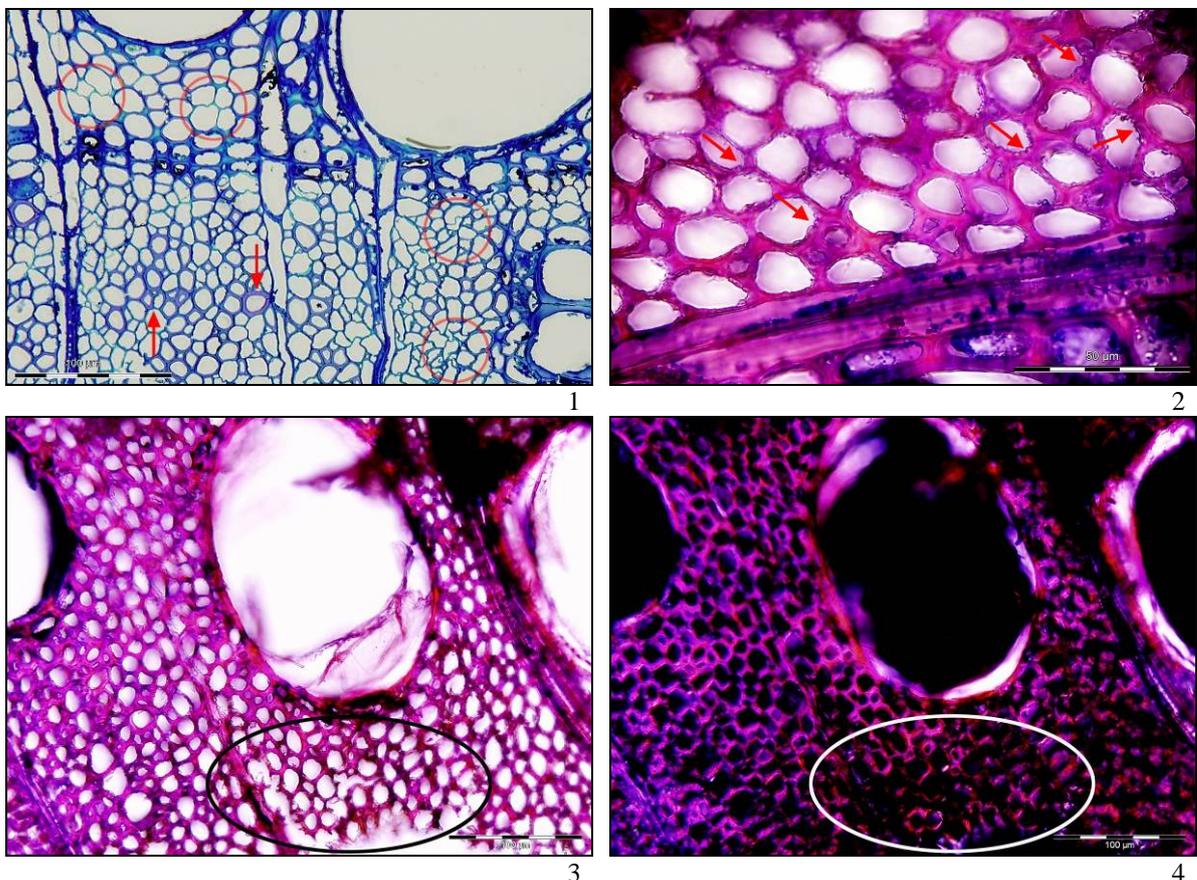


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen stark abgebauter Eschenquerschnitte. 1: Stark abgebaute Bereiche im Frühholz sowie im Bereich der Gefäße (Kreise). Bereiche mit geringem Abbau (Pfeile); 2: Beginnender Zellwandabbau (Pfeile); 3: Querschnitt mit abgebautem Bereich (Kreis); 4: Querschnitt mit abgebautem Gewebe (Kreis) im polarisierten Licht

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen den intensiveren Zellwandabbau des Holzgewebes der Esche im Vergleich zur Fichte. Der Festigkeitsverlust, hervorgerufen durch den Abbau der Cellulose in der Zellwand (Sekundärwandschichten), wird durch ein typisches kurzfasriges Bruchbild charakterisiert (Abb. 10).

Die transmissionselektronischen Untersuchungen belegen analog zur Fichtenprobe das Vorkommen von Erosions-Bakterien (Abb. 11).

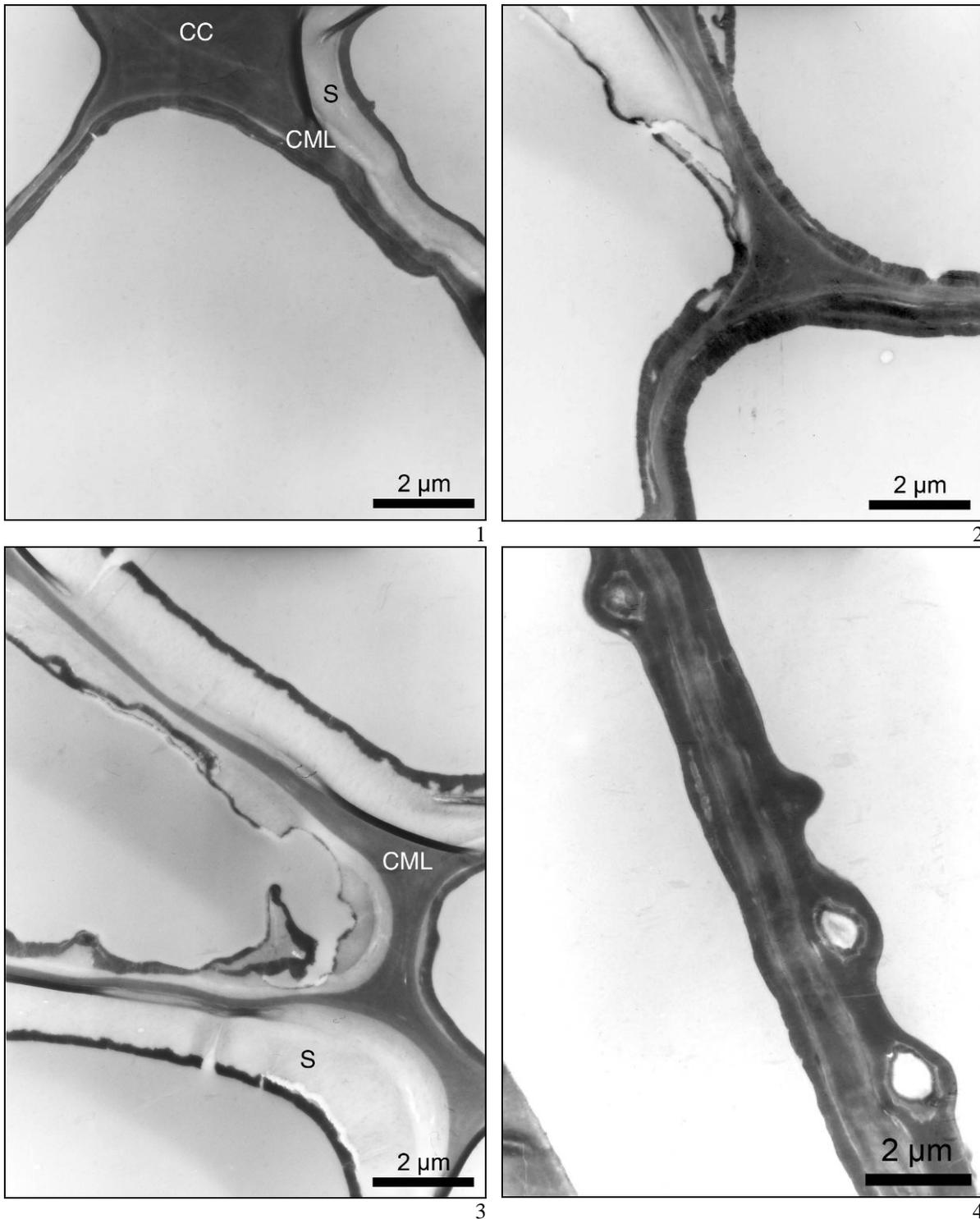


Abbildung 11: Transmissionselektronische Aufnahmen abgebauter Zellwandbereiche der Esche. 1-2: Zellwinkel (CC) mit komplett abgebauter Sekundärwand (S), Mittellamelle (CML) gut erhalten; 3: Fortgeschrittener Abbau der Sekundärwand (S) mit deutlicher Erosion; 4: Zellwand mit abgebauter Sekundärwand und Bakterien

Der Bakterienbefall wird als Verursacher des Zellwandabbaus angesehen. Zusätzlich kann ein Holzabbau durch einen Braunfäuleerreger nicht ausgeschlossen werden, da sowohl der

Verlust der Doppelbrechung in optisch intakten Bereichen der Zellwand wie auch das Bruchbild (kurzfaseriger Bruch) als Indizien dafür sprechen. Ein solcher Befall kann auch vor dem Versenken des Sarges im Moor am gelagerten Holz aufgetreten sein und ist im sauren und sauerstoffarmen Milieu des Moores abgestorben. Insgesamt kann sowohl bei der Fichte als auch bei der Esche ein Befall durch Erosions-Bakterien bestätigt werden.

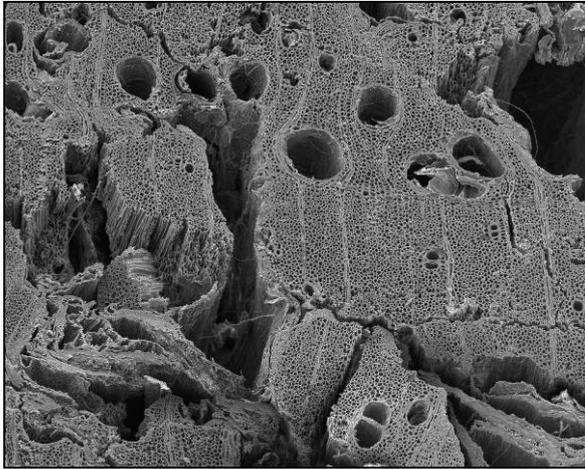


Abbildung 10: Querschnitt der Esche im Elektronenrastermikroskop, deutliche Zerstörung des Zellgefüges durch den Abbau der Sekundärwände

Elementanalytische Untersuchungen des Holzgewebes

Zur chemischen Charakterisierung des Holzgewebes wurden elementanalytische Untersuchungen (ICP-OES) anorganischer Verbindungen (Metallionen) durchgeführt. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung anorganischer Verbindung erlaubt Rückschlüsse über die Lagerungsbedingungen oder Behandlung des Holzgewebes.

Für die elementanalytischen Untersuchungen wurden kleine

Spanfraktionen aus den beiden Mustern Holzdübel (Esche) und Holzspan-Sarg (Fichte) herauspräpariert und mit konzentrierter Salpetersäure (HNO_3) aufgeschlossen. Die Elementgehalte in den einzelnen Jahrringfraktionen wurden anschließend mit einem sequentiell gesteuerten ICP-OES mit induktiv geheizter Argonplasmafackel (Inductively-Coupled-Plasma with Optical-Emission-Spectrometry), Firma Perkin-Elmer Optima 3000 bestimmt. Als Eichlösungen wurden dabei unterschiedlich konzentrierte Multielementstandards (blank; 0,1 ppm; 1,0 ppm; 10 ppm) verwendet. Die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse der Elementanalysen zeigen für beide Proben (Holzdübel und -span) eine signifikante Zunahme der Aluminium- und Eisenkonzentrationen ($\gg 10 \text{ ppm} = \text{mg/kg}$) im Vergleich zu den Gehalten, die im frisch eingeschlagenen Holz (Xylem) gemessen werden können ($\ll 10 \text{ ppm}$). Die Ursache für die Zunahme der Aluminium- und Eisengehalte im Holzgewebe kann chemisch durch den sauren Boden-pH-Wert (pH 3,3) im Moor erklärt werden, wodurch diese Elemente freigesetzt und in das Holzgewebe aufgenommen werden. Als Ursache für die ebenfalls signifikant erhöhten Konzentrationen der Schwermetalle Zink, Kupfer und Chrom kommen die nachträglichen Behandlungen des Holzgewebes (Konservierungsmaßnahmen) in Frage. Die drei Schwermetalle dienen in vielen (alten) Konservierungs- oder auch Holzschutzmitteln unter anderem der Fixierung.

Tabelle 1: Ergebnisse der Elementanalyse (Metallionen in den Holzgeweben des Holzdübels (Esche) und Holzspans-Sarg (Fichte)

	Holzdübel	Holzspan	Kommentar
Metallionen	Esche [ppm]	Fichte [ppm]	(Vgl. frisches Holz)
Aluminium Al	43	77	deutlich erhöht [< 5 ppm] „Versauerung“
Eisen Fe	172	79	deutlich erhöht [< 10 ppm] „Versauerung“
Zink Zn	32	25	deutlich erhöht [< 3 ppm]
Kupfer Cu	15	23	deutlich erhöht „Konservierung“
Chrom Cr	70	183	deutlich erhöht „Konservierung“

Schlussfolgerungen:

Die holzbiologischen Untersuchungen an den bereitgestellten Proben des Sarges ermöglichen eine zweifelsfreie anatomische Bestimmung der verarbeiteten Hölzer. Zusätzlich können detaillierte Aussagen zum mikrobiellen Holzabbau des Gewebes gemacht werden, der im Wesentlichen durch einen Bakterienbefall verursacht wurde. Insgesamt weist das Holzgewebe jedoch einen außergewöhnlich guten Erhaltungszustand auf, der auf die besonderen Lagerungsbedingungen im Moorboden (saurer Bodenmilieu unter Sauerstoffarmut) zurückgeführt werden muss, was durch elementanalytische Untersuchungen des Holzgewebes belegt werden kann.

Weiterführende Literatur:

- Blanchette, Ra.; Cease, KR.; Abad, AR.; Koastler, RJ.; Simpse, E.; Sams, GK. (1991b): An evaluation of different form of deterioration found in archaeological wood. Intern Biodeter 28:3-22
- Grosser, D. (1977): Die Hölzer Mitteleuropas. Springer-Verlag, Berlin
- Richter, H. G.; Dallwitz M. J. (2000 onwards): Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, and Spanish. Version 2006
- Schmidt, O.; Liese, W. (1994): Occurrence and significance of bacteria in wood. Holzforschung 48:271-277
- Schmitt, U.; Singh, A. P.; Thieme, H.; Friedrich, P. (2005): Electron microscopic characterization of cell wall degradation of the 400,000-year-old wooden Schöningen spears. Holz als Roh- und Werkstoff 63:118-122
- Schweingruber, F.H.; Schoch, W.H. (1992): Holz, Jahrringe und Weltgeschehen. Baufachverlag beim hep verlag. Schweiz
- Singh, AP.; Nilsson, T. Daniel, G. (1990): Bakterial attack of *pinus sylvestris* wood under near-anaerobic conditions. J Inst Wood Sci 11:237-249

Topochemical investigation into the delignification of *Eucalyptus globulus* chips during semi-chemical sulfite pulping

Mathias Rehbein · Miguel Pereira · Gerald Koch · Othar Kordsachia

Received: 17 December 2009 / Published online: 14 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The course of delignification of *Eucalyptus globulus* fibers during neutral semi-chemical sulfite pulping (NSSC) was studied by universal micro-spectrophotometry (UMSP 80, ZEISS). UV-investigation into a cellular level enables the topochemical analyses of delignification within individual cell wall layers during cooking. Cooks were carried out in a laboratory seven liter digester with liquor circulation and electrical heating device. Chip samples were taken throughout the cooking for chemical and UV microscopic analyses. UV microscopy analysis revealed for *Eucalyptus globulus* chips a preferred lignin removal during NSSC cooking in cell corner and compound middle lamella regions.

Introduction

Selective delignification of individual cell wall layers is one of the main challenges modern cooking is faced with. The pathways of cooking chemicals into the wood tissue largely depend on the pH of the cooking liquor (Pereira 2009). Alkali causes swelling of the fiber wall, which facilitates a homogeneous impregnation of the cell wall. Neutral and acid liquors preferentially dissolve lignin from the middle lamella (Davies 1966; Jayme and Torgersen 1967). If an early fiber separation is targeted,

This article is dedicated to Gerd Wegener on the occasion of his retirement as professor at the Technische Universität München.

M. Rehbein (✉) · G. Koch · O. Kordsachia
Institute of Wood Technology and Wood Biology, Federal Research Institute for Rural Areas,
Forestry and Fisheries (vTI), Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg, Germany
e-mail: mathias.rehbein@vti.bund.de

M. Pereira
Laboratorio de Productos Forestales, Departamento de Ingeniería Química Facultad de ingeniería,
Universidad de Concepción, Concepción, Chile

acid pulping liquors are better suited to attain this purpose. At neutral or weakly alkaline pH, the attainable delignification rate is so low that the point of fiber separation is not reached under moderate cooking conditions. Nonetheless, pulping under these conditions, applying sodium sulfite cooking liquors, is a well-established method for producing semi-chemical or high-yield pulps. In neutral sulfite semi-chemical pulping (NSSC), a supporting alkali source, sodium carbonate or sodium hydroxide is usually added in small charges to a sodium sulfite solution in order to maintain alkaline cooking conditions and thus accelerate the delignification process. The resulting alkaline darkening of the pulp is not critical because NSSC pulp is normally applied unbleached, especially as fluting material in corrugated boards (e.g. Fengel and Wegener 1984; Ingruber 1985). In this study, however, a pure sodium sulfite solution was used in order to avoid alkaline darkening, which is essential when a bleachable pulp grade should be produced. Another advantage of using a pure sulfite solution is the increased selectivity of the pulping process, because deacetylation and dissolution of hemicelluloses occurring under alkaline conditions is considerably retarded. In comparison with kraft or other alkaline pulping processes, neutral sulfite pulping proceeds slowly but under substantially higher selectivity. Unfortunately, comparable studies on the kinetics of kraft, acid sulfite or conventional NSSC cooking of *Eucalyptus globulus* or other eucalypts are not available in the relevant literature. Direct comparison of the delignification processes by chemical, topochemical or electron microscopic analyses would be of great interest, particularly with respect to the relevant initial cooking phase.

The surface characteristics of native as well as chemically pulped fibers have been extensively studied by using electron microscopy (TEM/SEM) (Davies 1966; Maurer and Fengel 1991; Börås and Gatenholm 1999; Schmitt et al. 2000; Snell et al. 2001; Fromm et al. 2003; Singh et al. 2003). To study the delignification within different cell wall layers, investigations into a cellular level are required. To attain this purpose by using electron microscopy, SEM-EDXA or TEM-EDXA techniques were developed. The EDXA technique enables the detection of elements with atomic numbers higher than neon and involves the specific bromination for lignin and subsequent analysis of bromine concentration in different cell wall regions (Saka et al. 1982a, b; Westermark 1985). Bromination results reveal a distinct dependence on the structural variation of lignin constitution. To compensate this dependency, mercurization was used. The mercurization seems to be less sensitive to the different lignin component distribution than the bromination and is also suitable for lignin detection by the EDXA technique (Eriksson et al. 1988; Westermark et al. 1988). To visualize cell wall constituents by transmission electron microscopy (TEM), sections staining with potassium permanganate or osmium tetroxide are applied to enable lignin localization in wooden cell walls (Daniel et al. 1991; Schmitt and Melcher 2004).

The topochemistry of delignification is of fundamental importance in pulping research. To provide information on the topochemical distribution of lignin and phenolic extractives in woody tissue, the UV microspectrophotometry has proved to be a useful tool (Jayme and Torgersen 1967; Procter et al. 1967; Fergus and Goring 1969; Koch and Kleist 2001; Koch et al. 2003b; Mendonça et al. 2004; Singh et al. 2006; Kim et al. 2008). This technique enables direct imaging of lignin distribution

within individual cell wall layers with a resolution of $0.25 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$ and is found to be ideally suited for the study of lignin removal during pulp processes (Koch and Grünwald 2004).

Both mentioned techniques have been used for the determination of the lignin distribution in woody tissues (Tirumalai et al. 1996). A direct comparison of results is not given because of the higher dependence of lignin structure, reactivity as well as the chemical pre-treatment by the bromination technique (Westermarck et al. 1988). The present study describes the application of cellular UV microspectrophotometry for the topochemical analyses of delignification during neutral sulfite (NSSC) pulping of plantation grown *Eucalyptus globulus*.

Materials and methods

Pulping processes and sampling

Industrial wood chips from *Eucalyptus globulus* originating from Chile were used. Chips larger than 40 mm and those smaller than 8 mm were sorted out. Knots were removed manually. The chips with a water content of 56.6% were stored in a freezer at -18°C . Cooks were carried out in a laboratory seven liter digester with liquor circulation and electrical heating device. The cooking process was performed with 1,000 g of chips (dry basis) and liquor to wood ratio of 3:1. For cooking, Na_2SO_3 liquor was used containing 55 g/l. The total sulfite charge on dry wood was 16.5%. Before cooking, the wood chips were steamed for 30 min to facilitate impregnation. The heating time from 40°C to a maximum temperature of 170°C was 90 min. The maximum cooking time at 170°C was 180 min.

Neutral sulfite cooks were stopped at different cooking times to track the course of sulfonation, yield loss, delignification and carbohydrate dissolution (see Table 2). The material was fiberized in a Sprout-Bauer 12 Defibrator, classified and stored in a fridge. The monomeric composition of the carbohydrates was analyzed by borate complex exchange chromatography after acid hydrolysis according to Puls (1982). The lignin content was determined using the Klason method, and the degree of sulfonation was determined according to Katz (1984). For UV microspectrophotometrical analyses, some chips were separated after heating, 20, 45 and 180 min cooking time. These chips were thoroughly washed with distilled water, immersed in water for 24 h and afterwards dried for topochemical analyses.

Light microscopy and cellular scanning UV microspectrophotometry

For light microscopy and UV spectroscopic analyses, small blocks ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) of untreated control as well as samples from different cooking stages (four stages) were dissected from the inner parts of collected chips and embedded in epoxy resin (Spurr 1969), as described by Kleist and Schmitt (1999) without prior dehydration. After curing, the embedded samples were cut to $1 \mu\text{m}$ semithin sections with an ultramicrotome Ultracut E (Reichert-Jung) equipped with a diamond knife. The sections were then transferred to quartz microscope slides,

thermally fixed and mounted in glycerine. For light microscopy investigation and image documentation, semithin sections ($1\ \mu\text{m}$, Fig. 1) were stained with toluidine blue as a general staining agent for woody tissue.

The topochemical analyses were carried out using a ZEISS UMSP 80 microspectrophotometer equipped with a scanning stage enabling the determination of image profiles at constant wavelengths using the scan program APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Fa. Zeiss) as described by Koch and Kleist (2001). For detection of the lignin distribution, a wavelength of $\lambda_{278\text{nm}}$ (absorbance maximum of hardwood lignin) was selected. The scan program digitises square fields of the tissue with a local geometrical resolution of $0.25\ \mu\text{m} \times 0.25\ \mu\text{m}$ and a photometrical resolution of 4,096 gray scale levels, which are converted into 14 basic colors to visualize the local distribution of aromatic compounds (absorbance intensities). The scan can be depicted as a two- or three-dimensional image profile including a statistical evaluation (histogram) of the semi-quantitative lignin distribution. For semi-quantitative studies, 16 measurements of individual cell wall layers of each cooking step were carried out; ten image profiles at the fiber wall, three at the ray and three image profiles at the vessel wall as shown in Fig. 1. The delignification of individual cell wall layers was additionally displayed by line scanning measurements at $\lambda_{278\text{nm}}$ to determine lignin removal within the cell wall at different cooking stages.

Results and discussion

Neutral sulfite semi-chemical pulping of *Eucalyptus globulus*

In the classical NSSC pulping process, Na_2CO_3 or NaOH are added to the sodium sulfite liquor in order to keep a weakly alkaline pH of about 8. At this pH, the

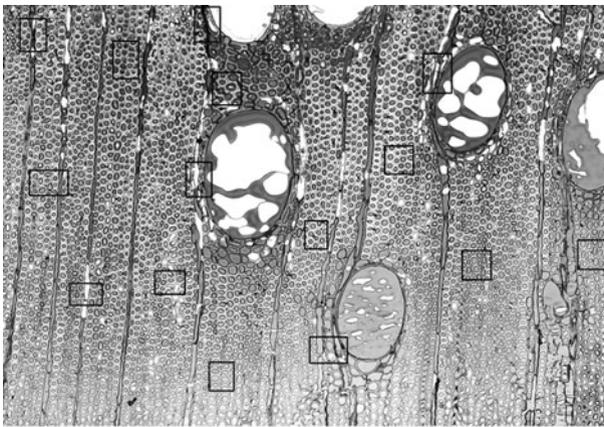


Fig. 1 Light microscope transverse section of *Eucalyptus globulus* (sample after 90 min heating up time) with representative measuring fields

cooking process proceeds faster than under weakly acid conditions, which are obtained during the cooking process when no supporting alkali is added to the sodium sulfite liquor (Table 2). Due to alkaline darkening, pulps produced in the pH-buffered NSSC process have a lower brightness than pulps produced with pure sodium sulfite solution. Therefore, the NSSC process should be carried out without additional alkali, if a bleachable pulp grade should be produced. The absence of a buffering agent in the neutral sulfite liquor reduces the speed of the cooking process because lignin fragmentation and subsequent dissolution of the lignin are retarded. On the other hand, sulfonation of lignin is accelerated under acidic conditions (Gierer 1968; Gellerstedt et al. 1976; Sjöström 1993). This reaction is desired, since it benefits the hydrophilic character of the fibers of high-yield pulps, which improves its strength properties, in particular its bonding ability (Heitner and Hattula 1988). The data listed in Table 1 confirm that the lignin content and the mean absorbance at a wavelength of 278 nm are reduced very slowly when a pure sodium sulfite solution is applied. The increasing gap between total lignin and Klason lignin content during the cooking process can be traced back to the increased degree of sulfonation during the course of cooking (Table 2), which renders greater parts of the residual lignin soluble in acid.

The applied cooking conditions without using Na_2CO_3 or NaOH as additional alkali facilitate selective delignification and enhance the degree of sulfonation. Thus, a pulp with good strength properties, especially high fiber-bonding ability, can be produced in high yield. Moreover, such a pulp with high initial brightness can be bleached quite easily to high brightness (publication in preparation). The delignification starts after approximately 60 min of heating time, when the temperature is about 130°C. After 90 min of heating, about 60% of the maximum degree of sulfonation of the lignin is already reached, although the degree of delignification is only 3% at that time. After extensive cooking for 180 min at 170°C, the lignin content of the fibers was decreased from 21.7 to 10.5%. Obviously, delignification of *E. globulus* with pure sodium sulfite liquors is limited to a value close to 50%. This delignification under rather harsh conditions was accompanied by a yield loss of only 30% (Fig. 2). Due to the still high lignin content in the fibers, it is not possible to separate the fibers without a refining stage.

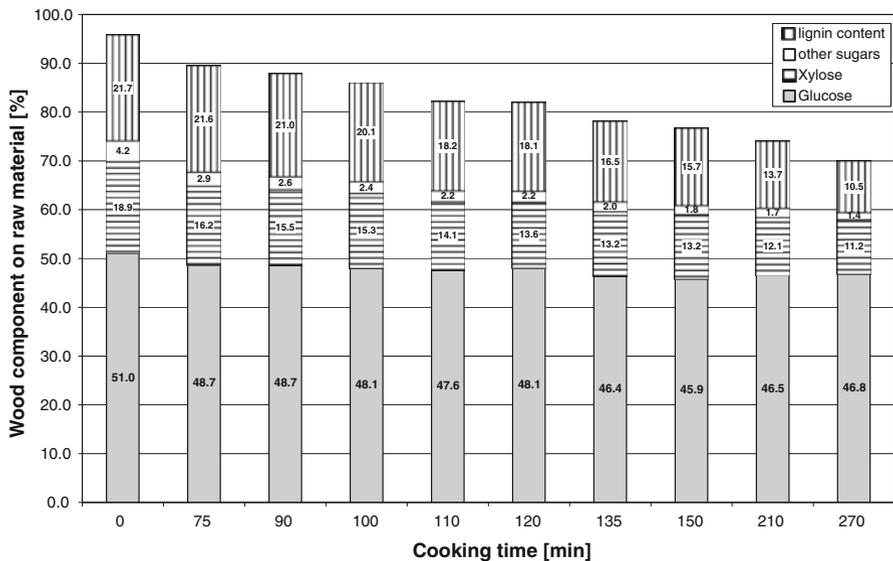
The losses of the different hemicelluloses during cooking can be evaluated by the amount of monomer sugars, which are detected after hydrolysis of the carbohydrate

Table 1 Cooking time, mean absorbance and lignin content during sulfite pulping of *Eucalyptus globulus* (Total lignin content = Klason lignin + acid-soluble lignin)

Sample	Control	1	2	3	4
Heating up time (min)		90	90	90	90
Cooking time at 170°C (min)		0	20	45	180
Overall cooking time (min)		90	110	135	270
Mean absorbance	0.213	0.190	0.144	0.139	0.131
Total lignin content (%)	21.7	24.0	22.2	19.0	15.0
Klason lignin (%)	21.7	21.0	18.2	16.5	10.5

Table 2 Chemical analysis of semi-chemical sulfite pulping (NSSC) of *E. globulus*

Time/temp. (min/°C)	Total yield (%)	Klason lignin (% on raw material)	Degree of sulfonation (mmol/Kg lignin on pulp)	pH (–)
0/0 (40)	100	21.7	0	9.7
75/140	89.3	21.6	268	6.8
90/170	87.4	21.0	288	6.4
100/170	85.6	20.1	333	6.3
110/170	82.0	18.2	350	6.3
120/170	82.1	18.1	353	6.2
135/170	78.0	16.5	388	6.2
150/170	76.9	15.7	424	6.2
210/170	73.7	13.7	474	6.1
270/170	69.8	10.5	468	6.1

**Fig. 2** Dissolution of the main wood components during NSSC cooking

part of the obtained pulp sample. The amounts of glucose, xylose and other sugars after a certain cooking time are shown in Fig. 2. The fraction of other sugars consists of small amounts of mannose, galactose, arabinose and rhamnose. The content of carbohydrates decreases from 75.1 to 59.4% after 270 min of cooking time. The heating phase (first 90 min) causes a significant reduction in the carbohydrate content. During this part, deacetylation reactions, formation of dissolved lignosulfonates and the neutralization of corresponding acids formed, distinctly reduce the cooking liquor pH from 9.7 to 6.4 (Table 2). The reduction in the glucose content is mainly caused by the dissolution of glucomannans but

presumably also some short-chained cellulose constituents were dissolved. Noticeable are the comparably high losses of xylans in the heating phase. These losses can be explained by elimination of acetyl group side chains due to the alkaline cooking conditions prevailing in the initial cooking phase. The further moderate losses of xylans and the other carbohydrates in the course of cooking can be mainly explained by hydrolysis occurring at high temperature and slightly acidic conditions.

Light microscopy and cellular scanning UV microspectrophotometry

The delignification of different cell wall layers during NS pulping was analyzed by light microscopy and scanning UV microspectrophotometry with a defined wavelength of $\lambda_{278\text{nm}}$.

Light microscopy revealed different stages of delignification during the NS pulping process (Fig. 3, stained with toluidine blue). In ascending order of cooking time, the middle lamella and both adjacent primary walls, termed compound middle lamella (CML), appear to disintegrate, while the secondary walls are swollen but morphologically unaffected (only some caves after 270 min of cooking time occurred).

In Figs. 4–8, two- and three-dimensional UV microspectrophotometric image profiles of progressing stages of NS pulping are shown. The color pixels indicate different intensities of UV absorbance at a selective wavelength of $\lambda_{278\text{nm}}$ (absorbance maximum of hardwood lignin). The high resolution ($0.25\ \mu\text{m} \times 0.25\ \mu\text{m}$ per pixel) enables a high differentiation of the UV absorbance within the different cell wall layers (Koch et al. 2003a).

The untreated cell walls of the fiber tissue (control sample) display the usual lignin distribution (Fig. 4) with a mean absorbance of $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.213 (Fig. 9). The red up to green staining of the CML indicates a distinct lignification with highest absorbance values in the cell corners (Fig. 10 control, average Abs. $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.46). The absorbance values of the neighboring secondary wall shows a lower lignin concentration, slightly varying, depending on the radial or tangential orientation of the cell wall (Fig. 10 control, average Abs. $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.17) (Fergus et al. 1969; Fergus and Goring 1970).

The average lignin concentration in the secondary wall is less than in the compound middle lamella. The absorbance value in the cell corner is about three times of that in the secondary wall of fibers. This observation agrees with other topochemical studies of lignin concentration by scanning UV microspectrophotometry (Scott et al. 1969; Koch and Grünwald 2004; Singh et al. 2006; Rehbein 2007).

After 90 min heating time, when the cooking liquor reached the maximum pulping temperature of 170°C, first changes within the individual cell wall layers can be observed (Fig. 5, second from top). The mean absorbance shows a considerable decrease to $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.190 (Fig. 9). The cell walls are slightly swollen and the decrease of absorbance reveals the onset of delignification in the region of cell corners (Fig. 10, average Abs. $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.346). The S2 layers show only a slight decrease in the UV absorbance at this stage (Fig. 10, S2 average Abs. $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.171).

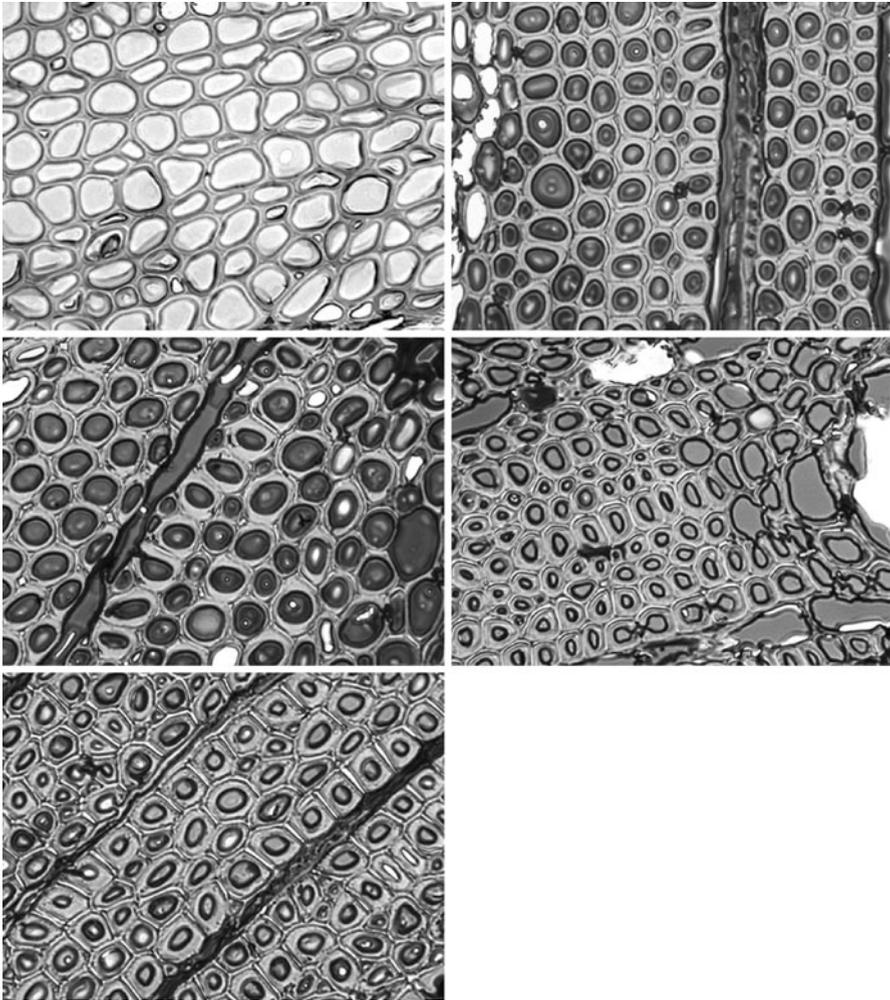


Fig. 3 Light microscope images of *Eucalyptus globulus* in relation to the cooking performance (toluidine blue stained sections, magnification of the used objective 10 \times). *Upper left*: Untreated control; *Upper right*: Sample after 90 min heating up time; *Middle left*: Sample after 110 min overall cooking time; *Middle right*: sample after 135 min overall cooking time; *Down left*: Sample after 270 min overall cooking time

After 110 min of cooking time (90 min heating up time plus 20 min cooking time at 170°C, Fig. 6), the whole cell wall area seems to be clearly affected by the cooking reactions. A distinct loss of mean absorbance (mean Abs. $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.144) can be detected within all cell wall layers (Fig. 9). The main (relative) delignification occurs in the compound middle lamellae as well as in the cell corner regions indicating high selectivity at this phase of the NS pulping process.

The topochemical study of the following cooking stage (135 min, Fig. 7, upper down) confirms this result. The slight change (decrease) of mean absorbance from 110 to 135 min of cooking time with average absorbance $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.144 to 0.139

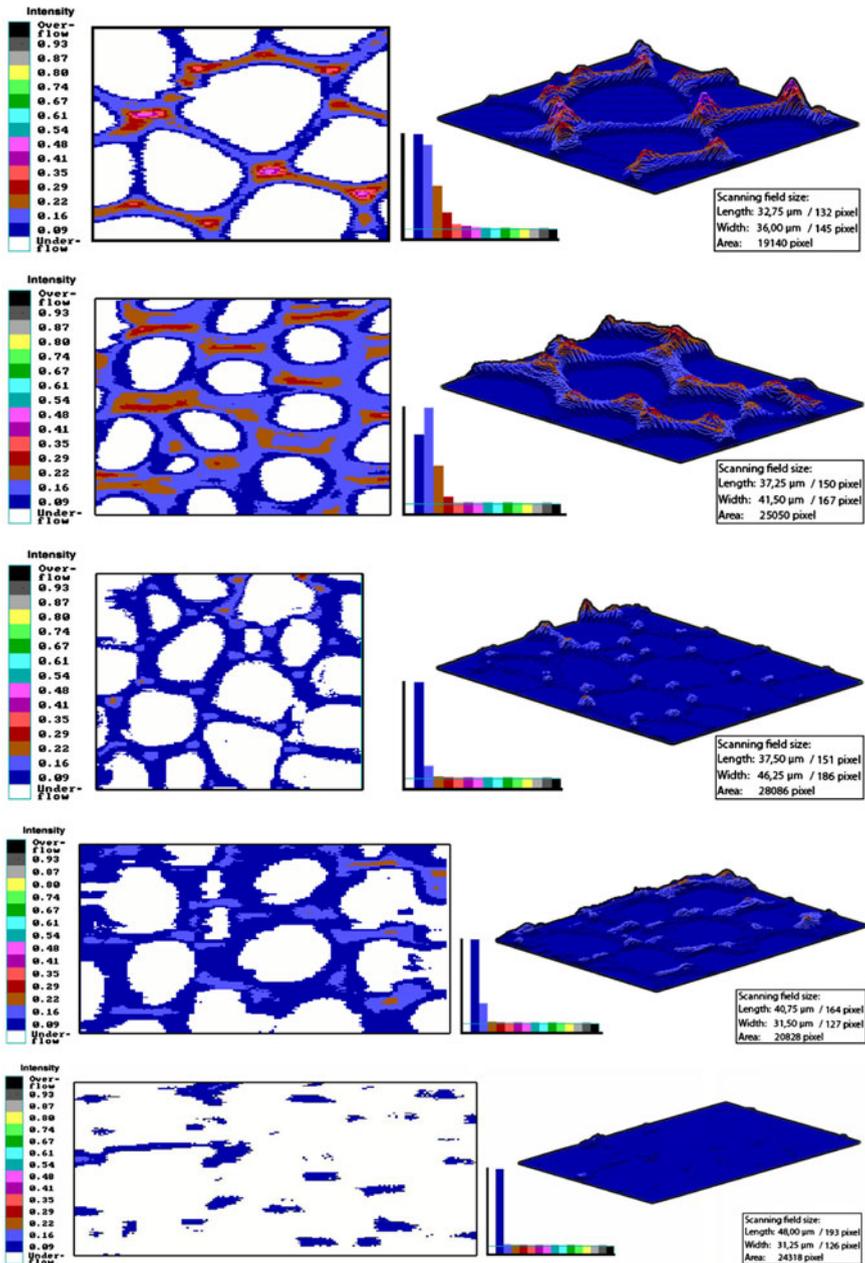


Fig. 4–8 Representative UV microscopic scanning profiles (area and 3D) of NS-pulped *Eucalyptus globulus* fibers with a statistical evaluation (histogram). The colored pixels mark the absorbance intensity at $\lambda_{278\text{nm}}$. **4 top:** untreated *E. globulus* control; **5 second from top:** *E. globulus* fibers after 90 min heating up time; **6 upper middle:** *E. globulus* fibers after 110 min overall cooking time; **7 upper down:** *E. globulus* fibers after 135 min overall cooking time; **8 down:** *E. globulus* fibers after 270 min overall cooking time

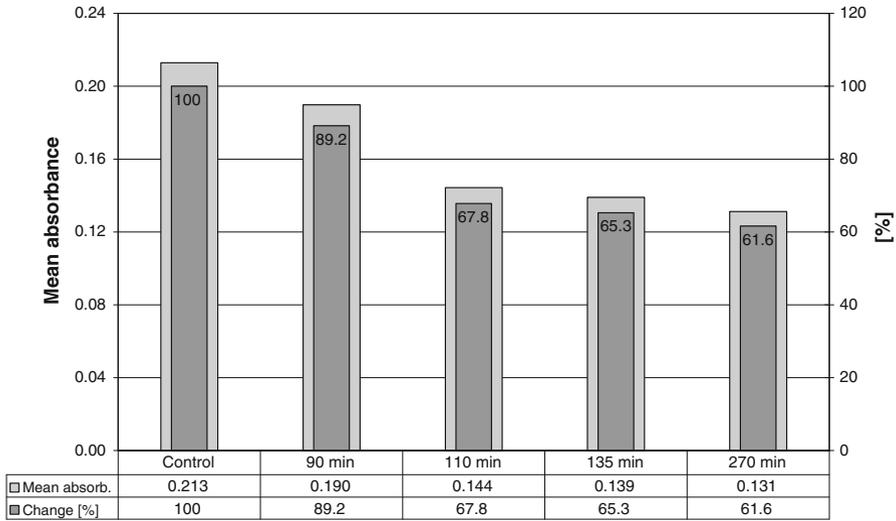


Fig. 9 Mean absorbance (overall cell wall layers) and percentage change in relation to the cooking performance. *Gray* = Mean absorbance, *dark-gray* = percentage change in relation to the control

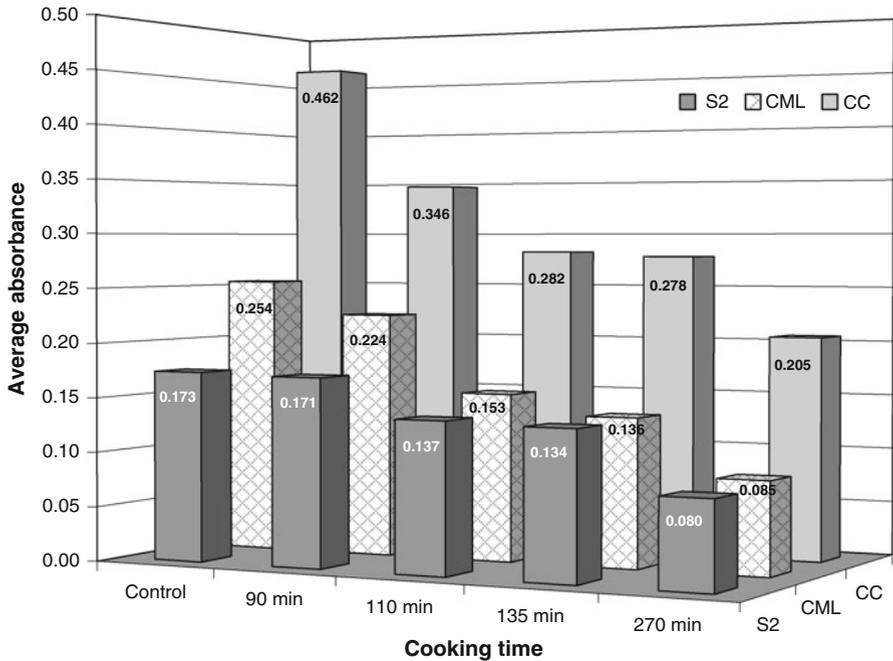


Fig. 10 Average absorbance ($\lambda_{278\text{nm}}$) in relation to the cooking performance. *CC* cell corner, *CML* compound middle lamellae, *S2* secondary wall

mainly results from a decrease of the absorbance in the compound middle lamella (average absorbance change 0.153 to 0.136, Fig. 10).

After the end of cooking (270 min), the scanning UV microspectrophotometry reveals a delignification within the entire cell wall (Fig. 8). Only parts of the cell corner can be depicted by the UV scanning technique because of the low (remaining) absorbance values in the range of $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.08 in the compound middle lamellae as well as secondary wall. The absorbance of the cell corners decrease from $\lambda_{278\text{nm}}$ 0.278 to 0.205 (Fig. 10) and is, as expected, still the part with highest (remaining) absorbance values.

UV line absorbance spectra in relation to ascending cooking stages

To determine the delignification within the individual cell wall layers at ascending stages of NS cooking, the lignin removal was also studied by evaluation of the UV absorbance line spectra with a defined wavelength of $\lambda_{278\text{nm}}$. In Fig. 11, typical UV absorbance line spectra across the cell walls of untreated fibers (control) as well as different stages of delignification are illustrated. The UV line absorbance spectra of untreated control (Fig. 11 red line) shows the UV absorbance characteristic of a typical lignified hardwood fiber with highest UV absorbance in the compound middle lamella and a slight decrease (primary wall) to the adjacent secondary wall. The secondary wall can be divided into three different wall layers (Maurer and Fengel 1991). Starting from the compound middle lamella, the first wall is the secondary wall 1 with a much lower lignin concentration compared to the middle lamella. This observation agrees with other topochemical investigations, where the highest lignin concentration is found in the compound middle lamella (Koch and Kleist 2001; Fromm et al. 2003; Jungnikl et al. 2008). The S2 layer is the major part of the composite wall system. In the S2 layer, the lignin concentration is considerably lower than in the compound middle lamella and S1 (Bentum et al. 1969; Fergus and Goring 1969). The third layer is the S3 which is described as highly lignified (Sachs et al. 1963; Parameswaran and Liese 1982) but only 0.1–0.2 μm in width (black spruce) (Fromm et al. 2003). Using the specified UV technique, it is not possible to detect the S3 layer individually with the preset resolution of the scanning device.

As described, the lignin distribution within the S2 layer is inhomogeneous, and the UV absorbance gradually increases from the lumen side to the S1 layer, as can be seen in the representative UV line scan (control, red line) in Fig. 11.

After 90 min of heating of the cooking liquor to the maximum pulping temperature of 170°C, the whole cell wall is slightly swollen depending on the sulfonation process. The UV line absorbance values reveal the beginning of delignification in the region of the compound middle lamella (Fig. 11, yellow line). Slightly higher UV absorbance in the region of S2 depends on the natural variability of cell wall lignification and is not related to the cooking process. Twenty minutes later after a total cooking time of 110 min, a considerable change of UV line absorbance behavior at between 90 and 110 min cooking time was recorded. The spectral characteristic of the scanned fibers is characterized by an obvious decrease of intensity (max absorbance 0.25 to 0.14) of S2 and particularly of the CML. This

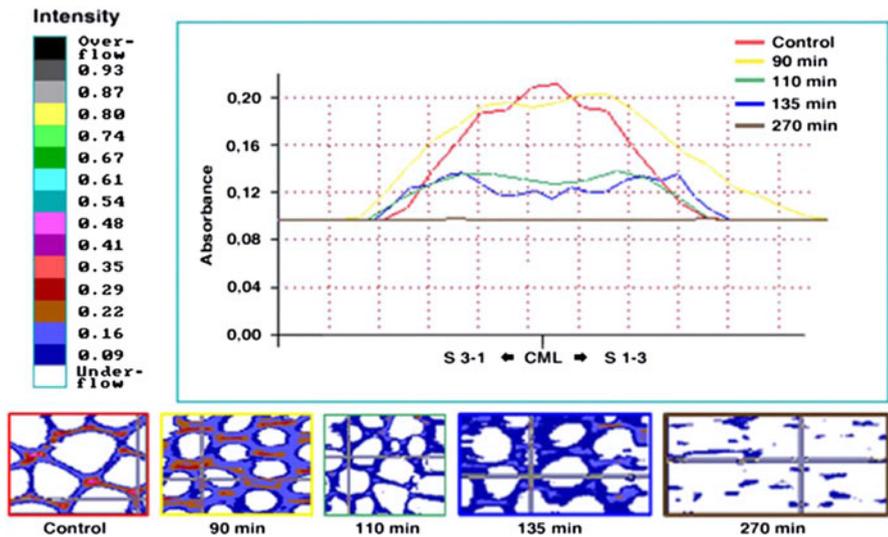


Fig. 11 Representative UV line absorbance scans at $\lambda_{278\text{nm}}$. *Upper left*: The colors represent the different UV absorbance values. *Upper right*: UV absorbance line spectra at $\lambda_{278\text{nm}}$ cross the cell wall (the color does not apply to the absorbance bar). *Down*: Scanning profiles ($\lambda_{278\text{nm}}$) of ascending cooking stages. The cross marks the measurement range for the line spectra

finding corresponds with the average absorbance in Fig. 10, where the first distinct step of delignification can be observed after 110 min of cooking time.

At a cooking time of between 110 and 135 min, only a distinct loss of UV absorbance in the inner part of the S2 layer and the compound middle lamella can be observed. The second step of delignification occurs at between 135 and 270 min of cooking time. The UV absorbance line of the pulped fiber cell wall (Fig. 11, brown line) represents (nearly) “complete delignification” (detection limit of absorbance values), although the Klason lignin decreases only from 21.7 to 10.5% (Table 1). The contradiction of the Klason lignin content and UV absorbance measurements depends on the sensitivity of the microscope scanning device and system calibration according to the Lambert–Beer’s law (Koch and Grünwald 2004).

Conclusion

The subcellular analysis of the delignification of *Eucalyptus globulus* fibers was studied by using UV microspectrophotometry. The presented results provide fundamental insight into the topochemistry and selectivity during NSSC pulping as well as general insights into the lignin removal depending on the cooking time. In this study, NSSC cooking was performed with pure sodium sulfite cooking liquor. An additional alkali source was not charged in order to avoid alkaline darkening of the pulp, which would affect subsequent pulp bleaching considerably. The use of a non pH-buffered sulfite cooking liquor results in a pH decrease into the acid range during cooking, which retards the delignification process but also the dissolution of

alkali-sensitive carbohydrates explaining the high selectivity of this process. The slight acid pH supports lignin sulfonation and thus improves pulp bonding ability. Due to the high selectivity and high degree of sulfonation, pulps produced with this modified NSSC process have excellent strength properties. The high selectivity of the applied, modified NSSC cooking of *Eucalyptus globulus*, especially in the early cooking phase at maximum temperature, is reflected in a preferred delignification of the cell corners and the compound middle lamellae. The combination of chemical analyses and UV microspectrophotometry represents a useful instrument to determine topochemical variations of lignin distribution within individual cell wall layers.

Acknowledgments The authors thank T. Potsch and K. Brandt, Hamburg, for the assistance in embedding, sectioning and microscopic analysis and Prof. Dr. R. Patt and Dr. Uwe Schmitt, Hamburg, in critical reading of the manuscript.

References

- Bentum ALK, Côté WA, Day AC, Timell TE (1969) Distribution of lignin in normal and tension wood. *Wood Sci Technol* 3:218–231
- Börås L, Gatenholm P (1999) Surface properties of mechanical pulps prepared under various sulfonation conditions and preheating time. *Holzforschung* 53:429–434
- Daniel G, Nilsson T, Pettersson B (1991) Poorly and non lignified regions in the middle lamella cell corners of birch (*Betula verrucosa*) and other wood species. *IAWA Journal* 12:70–83
- Davies GW (1966) Optical and electron microscopy of NSSC pulps. *Appita* 19:95–110
- Eriksson I, Lidbrandt O, Westermark U (1988) Lignin distribution in birch (*Betula verrucosa*) as determined by mercurization with SEM- and TEM-EDXA. *Wood Sci Technol* 22:251–257
- Fengel D, Wegener G (1984) Wood chemistry—ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin
- Fergus BJ, Goring DAI (1969) The topochemistry of delignification in kraft and neutral sulphite pulping of Birch wood. *Pulp Paper Mag Can* T-314:6573
- Fergus BJ, Goring DAI (1970) The distribution of lignin in Birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung* 24:118–124
- Fergus BJ, Procter AR, Scott JAN, Goring DAI (1969) The distribution of lignin in spruce wood as determined by ultraviolet microscopy. *Wood Sci Technol* 3:117–138
- Fromm J, Rockel B, Lautner S, Windeisen E, Wanner G (2003) Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. *J Struct Biol* 143:77–84
- Gellerstedt G, Gierer J, Pettersson EL, Szabolcs I (1976) Reaction of Lignin during neutral sulphite cooking.6. Reactions of intermediates of stilbene type. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 2021–2036
- Gierer J (1968) Über den chemischen Verlauf der Neutralsulfitekochung. *Das Papier* 22:649–654
- Heitner C, Hattula T (1988) Ultra-high-yield pulping. Part VI. The effect of Sulfonation on the development of fiber properties. *J Pulp Pap Sci* 14(1):J6–J11
- Ingruber OV (1985) Pulp and paper manufacture, vol. 4: sulfite science and technology. vol 4. The joint textbook committee of the paper industry (TAPPI/CPPI), 24–49
- Jayme G, Torgersen HF (1967) Topochemie der Delignifizierung beim Aufschluß von Fichtenholz nach dem Sulfit- und Sulfatverfahren. Teil 1: Ultraviolett-mikroskopische Untersuchungen an teilweise delignifiziertem Fichtenholz. *Holzforschung* 21:110–116
- Jungnikl K, Koch G, Burgert I (2008) A comprehensive analysis of the relation of cellulose microfibril orientation and lignin content in the S2 layer of different tissue types of spruce wood (*Picea abies* (L.) Karst.). *Holzforschung* 62:475–480
- Katz PSAM (1984) The determination of strong and weak acidic groups in sulfite pulps. *Svensk Papperstidning* 87:R48–R53
- Kim JS, Lee KH, Cho CH, Koch G, Kim YS (2008) Micromorphological characteristics and lignin distribution in bamboo (*Phyllostachys pubescens*) degraded by the white rot fungus *Lentinus edodes*. *Holzforschung* 62:481–487

- Kleist G, Schmitt U (1999) Evidence of accessory compounds in vessel walls of Sapeli heartwood (*Entandrophragma cylindricum*) obtained by transmission electron microscopy. *Holz Roh-Werkst* 57:93–95
- Koch G, Grünwald C (2004) Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt U, Anderer P, Barnett JR, Emons AMC, Jeronimidis G, Saranpää P, Stanzl-Tschegg S (eds) *Wood fiber cell walls: methods to study their formation, structure and properties*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp 119–130
- Koch G, Kleist G (2001) Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55:563–567
- Koch G, Puls J, Bauch J (2003a) Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung* 57:39–345
- Koch G, Rose B, Patt R, Kordsachia O (2003b) Topochemical investigation on delignification of *Picea abies* [L.] Karst. During alkaline sulfite (ASA) and bisulfite pulping by scanning UV microspectrophotometry. *Holzforschung* 57:611–618
- Maurer A, Fengel D (1991) Elektronenmikroskopische Darstellung von strukturellen Einzelheiten in Nadelholz-Zellwänden anhand sehr dünner Ultramikrotomschnitte. *Holz Roh- Werkst* 49:53–56
- Mendonça R, Ferraz A, Kordsachia O, Koch G (2004) Cellular UV-microspectrophotometric investigations on pine wood (*Pinus taeda*. and *Pinus elliottii*) delignification during biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát Gilbn. & Ryv.) and alkaline sulfite/anthraquinone treatment. *Wood Sci Technol* 38:567–575
- Parameswaran N, Liese W (1982) Ultrastructural localization of wall components in wood cells. *Holz Roh- Werkst* 40:145–155
- Pereira MA (2009) Herstellung von Halb- und Vollzellstoffen aus *Eucalyptus globulus* Labill. und *Eucalyptus nitens* Maiden aus Chile mit alkalischen Sulfitlösungen. Universität Hamburg, Dissertation, S. 162
- Procter AR, Yean WQ, Goring DAI (1967) The topochemistry of delignification in kraft and sulphite pulping of spruce wood. *Pulp and Paper Magazine of Canada* 68:445–460
- Puls J (1982) Chemical analysis for lignocellulosic residues. In: Strub A, Cartier P, Schleser G (eds) *Energy from biomass*. Applied Science Publishers Ltd, London, pp 863–867
- Rehbein M (2007) Untersuchung der natürlichen Dauerhaftigkeit und Gebrauchseigenschaften von Substitutionshölzern für konstruktive Außenanwendungen. Diplomarbeit, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg
- Sachs IB, Clark IT, Pew JC (1963) Investigation of lignin distribution in the cell wall of certain woods. *J Polym Sci Part C Polym Symp* 2:203–212
- Saka S, Thomas RJ, Gratzl JS, Abson D (1982a) Topochemistry of delignification in Douglas-fir wood with soda, soda-anthraquinone and kraft pulping as determined by SEM-EDXA. *Wood Sci Technol* 16:139–153
- Saka S, Whiting P, Fukazawa K, Goring D (1982b) Comparative studies on lignin distribution by UV microscopy and bromination combined with EDXA. *Wood Sci Technol* 16:269–277
- Schmitt U, Melcher E (2004) Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. In: COST Action E20 *Wood Fibre Cell Wall Structure*, 105–117
- Schmitt U, Singh AP, Kordsachia O, Pöhler E (2000) The topochemistry of delignification of *Pinus radiata* during ASAM pulping. In: Kim YS (ed) *New horizons in wood anatomy*. Chonnam Nat. Univ. Press, Kwangjupp, pp 189–197
- Scott JAN, Procter AR, Fergus BJ, Goring DAI (1969) The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood description and validity of the technique. *Wood Sci Technol* 3:73–92
- Singh AP, Kim YS, Chung GC, Park BD, Wong AHH (2003) TEM examination of surface characteristics of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) HTPM fibers. *Holzforschung* 57:579–584
- Singh A, Schmitt U, Möller R, Dawson B, Koch G (2006) Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. *Wood Sci Technol* 40:16–25
- Sjöström E (1993) *Wood chemistry, fundamentals and applications*. Academic Press, San Diego
- Snell R, Groom LH, Rials TG (2001) Characterizing the surface roughness of thermomechanical pulp fibers with atomic force microscopy. *Holzforschung* 55:511–520
- Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31–43

- Tirumalai VC, Agarwal UP, Obst JR (1996) Heterogeneity of lignin concentration in cell corner middle lamella of white birch and black spruce. *Wood Sci Technol* 30:99–104
- Westermark U (1985) Bromination of different morphological parts of spruce wood (*Picea abies*). *Wood Sci Technol* 19:323–328
- Westermark U, Lidbrandt O, Eriksson I (1988) Lignin distribution in spruce (*Picea abies*) determined by mercurization with SEM-EDXA technique. *Wood Sci Technol* 22:243–250