

# **Isolierung und Identifizierung von Bakterien, die antagonistisch gegenüber holzerstörenden Pilzen wirken – ein Potenzial für biologische Holzschutzmittel**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
Institut für Holzwissenschaften  
der Universität Hamburg

Vorgelegt von  
Marieke Anna Nissen  
Kiel

2021

Tag der Disputation: 09.06.2021

Erstgutachterin: Prof. Dr. E. A. Magel

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Streit

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. B. Saake und Prof. Dr. I. Meier

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Kiel, den 21.02.2021

A handwritten signature in cursive script, reading "Janette Nissen". The ink is dark and the handwriting is fluid and legible.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei der Universität Hamburg für das Promotionsstipendium und das Abschlussstipendium im Rahmen des Gleichstellungsfonds, mithilfe derer ich meine Forschungsarbeit durchführen konnte.

Meiner Professorin Dr. Elisabeth Magel möchte ich besonders für ihre Unterstützung bei der Einreichung meines Forschungsvorhabens danken. Mit ihrer Hilfe bekam ich die Möglichkeit der finanziellen Unterstützung. Ich bedanke mich für das Vertrauen, das sie mir gab, meine Untersuchungen selbstständig in ihren Laboren durchführen zu können.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Streit möchte ich mich vielmals für das Zweitgutachten bedanken.

Amelie von der Heyde, Katharina Erdt, Dana Krüger und Anna Bogun gilt ein großer Dank, da sie mich bei meinen Tätigkeiten im Labor immer unterstützten. Bei Sarah Schmitt möchte ich mich für ihre Untersuchungen bedanken, die sie im Rahmen ihrer Bachelorarbeit für mich anstellte.

Ohne meine Kollegin und Freundin Annika Müller-Navarra hätte ich nicht so eine schöne und konstruktive Zeit in Hamburg gehabt – ich danke ihr für all die prima Stunden.

Der Universität Hamburg und dem Thünen-Institut danke ich für die Nutzung der Räumlichkeiten, Stefanie Warsow für das Vorbereiten meiner Holzproben, Marie Lenz für die Erklärungen der Prüfgeräte und der Bereitstellung der Prüfpilze und Dr. Eckhard Melcher für das stets offene Ohr meiner Fragen rund um das Thema Holzschutz.

Für die letzte entscheidene Schlussphase meiner Dissertation danke ich Marika Magyar, die mir zum Schreiben Räumlichkeiten der Ruhe ermöglichte. Moritz Müller-Navarra, meinem Bruder Boris Wanschura und meiner Freundin Jennifer Langfeldt danke ich für die Hilfe bei der Ergebnisauswertung und das Korrekturlesen meiner Forschungsarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in der gesamten Zeit unterstützte und begleitete. Meinem Mann Gunnar und meinen Kindern Nika und Jesse danke ich von ganzem Herzen – es ist so schön, dass es euch gibt!

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung.....	I
Danksagung .....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung .....	1
Summary.....	3
<b>1 Einleitung und Hintergrund der Forschungsarbeit .....</b>	<b>5</b>
1.1 Schäden an Holz durch Mikroorganismen.....	5
1.1.1 Holzverändernde Pilze .....	5
1.1.2 Schäden durch Bakterien .....	8
1.2 Rosskastanien-Komplexkrankheit .....	8
1.3 Wissensstand Holzschutz.....	9
1.4 Ziel der vorliegenden Untersuchung.....	13
<b>2 Material .....</b>	<b>14</b>
2.1 Bakterien .....	14
2.1.1 Probenherkunft.....	14
2.2 Holzzerstörende Pilze.....	17
2.3 Nährmedium .....	17
2.4 Holzprüfkörper .....	18
2.5 Geräte und Dienstprogramme .....	19
<b>3 Methoden.....</b>	<b>20</b>
3.1 Überblick Methoden.....	20
3.2 Isolierung der Bakterien.....	21
3.3 Numerische Erhebung der Bakterien .....	22
3.4 Charakterisierung der Bakterien.....	22
3.4.1 Morphologische Untersuchung.....	22
3.4.2 Biochemische Untersuchung - Gramfärbung .....	22
3.5 Molekularbiologische Methoden .....	23
3.5.1 DNA-Extraktion.....	23
3.5.2 Verwendete Primer.....	24
3.5.3 Polymerasekettenreaktion .....	25
3.5.4 PCR-Bedingungen.....	25
3.5.5 Nachweis der DNA-Abschnitte mithilfe von Gel-Elektrophorese .....	26
3.5.6 Aufreinigung und Sequenzierung .....	26
3.6 Herstellung der Medien .....	27
3.7 Aufbewahrung der Bakterien .....	27
3.8 Wachstumskurven .....	28
3.8.1 Photometrische Messungen .....	28
3.9 Dualkulturtestreihe.....	29
3.9.1 Vordualtests.....	29
3.9.2 Dualtests.....	29
3.10 Abbauprobversuche.....	31
3.10.1 Gewinnung der Bakterienlösung .....	32
3.10.2 Abbauprobversuche in Anlehnung an DIN EN 113 .....	32
3.10.3 Abbauprobversuche in Anlehnung an DIN EN 152 .....	36
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1 Isolierung der Bakterien.....	38
4.2 Numerische Erhebung.....	38

4.3	Morphologische Charakterisierung.....	42
4.4	Biochemische Untersuchungen - Gramfärbung .....	44
4.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	45
4.5.1	<i>DNA-Extraktion</i> .....	45
4.5.2	<i>Identifizierung über die Sequenz-Abschnitte</i> .....	45
4.6	Dualkulturtestreihe.....	49
4.6.1	<i>Wachstum der Schadpilze in Reinkultur</i> .....	49
4.6.2	<i>Dualkulturen</i> .....	51
4.7	Holzschutzmitteltest in Anlehnung an DIN EN 113 und DIN EN 152 .....	65
4.7.1	<i>Wachstumskurven der Bakterien</i> .....	65
4.7.2	<i>Biologische Lösung Gemisch A und B im Test</i> .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>77</b>
5.1	Material- und Methodendiskussion.....	77
5.1.1	<i>Probenherkunft</i> .....	77
5.1.2	<i>Nährmedium</i> .....	78
5.1.3	<i>Biochemische Untersuchung</i> .....	78
5.1.4	<i>Molekularbiologische Identifizierung</i> .....	78
5.2	Ergebnisdiskussion.....	79
5.2.1	<i>Dualkulturtestreihe</i> .....	79
5.2.2	<i>Holzschutzmitteltestreihe</i> .....	82
5.3	Bakterienarten als Potential für biologische Holzschutzmittel .....	87
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>91</b>

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Wirkung von antagonistischen Bakterien gegenüber holzerstörenden Pilzen durchgeführt. Ziel war es, von Baumborken isolierte Bakterienkolonien zu identifizieren, die die Fähigkeit besitzen, holzerstörende Pilze in ihrem Wachstum zu hemmen oder gar ein Ansiedeln dieser zu verhindern.

In Form von Freilandversuchen wurden Proben von der Borke verschiedener Baumindividuen genommen und mithilfe mikrobiologischer Methoden auf Agarplatten kultiviert. Dominant auftretende Bakterienarten wurden in Reinkultur gebracht und molekularbiologisch bestimmt. Weiterführend wurden das Wachstumsverhalten und die synergistischen bzw. antagonistischen Beziehungen der Pilz- und Bakterienarten untereinander untersucht, indem in Anlehnung an Oppermann (1951) Dualkulturen durchgeführt wurden. Zu den holzerstörenden Pilzen zählten sieben Weißfäulepilze, u.a. *Irpex lacteus*, *Trametes versicolor* und *Flammulina velutipes* und zwei Braunfäulepilze, *Daedalea quercina* und *Fomitopsis pinicola*, die gegenüber den 46 ausgewählten Bakterienarten getestet wurden. Für die Auswertung der Dualtestreihe wurde die durch das Bakterium verursachte Wachstumshemmung der Schadpilze mit der Pilz-Kontrolle (ohne Bakterium) verglichen und nach Jeyaseelan & Jashothan (2012) mithilfe des Inhibitionsfaktors P [%] dargestellt. Je höher P [%] desto stärker der Antagonismus des jeweiligen Bakteriums. Da die Schadpilze den Bakterien-Isolaten unterschiedlich stark gegenübertraten, schwankten die Werte des Inhibitionsfaktors, auch innerhalb einer Bakterienart. Prozentuale Werte < 20 % konnten Bakterienarten zugeordnet werden, die keine große Hemmwirkung gegenüber den Schadpilzen bewirkten. Bakterien-Isolate der Gattung *Bacillus*, insbesondere *Bacillus subtilis*, kamen häufiger vor und wiesen Werte zwischen ca. 35 % (gegenüber *Trametes versicolor*) und ca. 80 % (gegenüber *Stereum hirsutum*) auf. Die Bakterienarten *Pseudomonas fluorescens* und *Stenotrophomonas rhizophila* hemmten das Wachstum des Schadpilzes *Pleurotus ostreatus* mit einem Inhibitionsfaktor von ca. 50 %. Nebst Ermittlung des Inhibitionsfaktors wurden die Dualkulturen am Ende der Versuchsreihe visuell begutachtet und in Anlehnung an Schreiner (2008) in vier Inhibitionsklassen unterteilt. Stark, gut und schwach hemmende Bakterienarten wurden den Klassen I-III zugeordnet, wobei die Klasse III (schwach hemmend) mit 44 % den größten Anteil ausmachte (Klasse I: 12 %; Klasse II: 22 %). In Klasse IV gruppierten sich mit einem Anteil von 22 % Bakterien-Isolate, deren Hemmwirkung gegenüber den Schadpilzen ausblieb. Darauf wurde eine Auswahl unterschiedlich stark hemmender und verschiedenartiger Bakterienarten der

Klassen I und II getroffen, diese jeweils in Flüssigmedium kultiviert und für die Holzschutzmitteltestreihe zu zwei biologischen Lösungen zusammengemischt.

In Anlehnung an die europäischen Normen zur Prüfung der Wirksamkeit von Holzschutzmitteln DIN EN 113 (1996-11) und DIN EN 152 (2011), wurden mit und ohne (Kontrolle) Bakterien-Lösung behandelte Prüfkörper der Holzarten *Pinus sylvestris* (Splintholz), *Fagus sylvatica* und *Aesculus hippocastanum* auf der mit dem jeweiligen Pilzmycel der Norm-Prüfpilze *Trametes versicolor* (Linnaeus ex Fries), *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fries) und *Aureobasidium pullulans* (de Bary) bewachsenen Agarplatte positioniert. Dafür wurden zwei Gemische aus Bakterienarten der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas* und *Stenotrophomonas* hergestellt und die Prüfkörper darin getränkt. Nach Kultivierung wurden diese in gewissen Abständen ausgebaut und der mittlere Masseverlust [%] einhergehend mit der Ausbaufeuchtigkeit der Pk bestimmt. Für den Bläuepilz *A. pullulans* wurde als Bewertungskriterium zudem der Bewuchs- und Verfärbungsgrad herangezogen. Die Testreihe ergab, dass die behandelten Prüfkörper ähnlich starke Verfärbungen aufwiesen wie die unbehandelten Prüfkörper. Eine Minderung der Verblauung durch das Auftragen des Gemischs B konnte nicht gezeigt werden. Die mit dem Gemisch A imprägnierten Prüfkörper der Holzart *Pinus sylvestris* wiesen nach 16 Wochen Versuchsdauer einen Masseverlust von ca. 2,5 % auf. Im Vergleich konnte bei den Kontrollen, die nur mittels Flüssigmedium, d.h. ohne Bakterien-Gemisch behandelt wurden, ein Holzabbau von ca. 28 % festgestellt werden. Auffallend dabei war die über den Zeitraum stark ansteigende Feuchtigkeit in den Holz-Prüfkörpern.



## Summary

The following dissertation presents investigations that were carried out on the effect of antagonistic bacteria against wood-destroying fungi. The aim was to identify isolated bacterial colonies from tree bark, that have the ability to slow down wood-destroying fungi in their growth or even to prevent fungi from appearing in the first place. Field studies were undertaken by means of collecting samples from the bark of various tree species and cultivating the bacteria on agar plates using microbiological methods. The dominant bacterial species were isolated and determined using molecular biology. Additionally, the investigation also focused on growth behaviour and synergistic or antagonistic relationships between the fungal and bacterial species by performing dual cultures based on Oppermann (1951). In total 46 selected bacterial species were tested on wood-destroying fungi. This included seven white rot fungi, e.g. *Irpex lacteus*, *Trametes versicolor* and *Flammulina velutipes*, and two brown rot fungi, *Daedalea quercina* and *Fomitopsis pinicola*. To evaluate the dual test series, the bacterium's growth inhibition or reduction of the harmful fungi was compared with a fungus control group (without bacterium). The results were evaluated by using the inhibition factor P [%] in accordance to Jeyaseelan & Jashothan (2012). It was assumed that the higher the result in P [%], the stronger the antagonism effect would be, caused by the bacterium. However, it was also observed that the values of the inhibition factor fluctuated, even within one bacterial species. This can be explained by the fact that harmful fungi had faced the bacterial isolates in various degrees of concentration. Results with a percentage value less than 20 % were assigned to types of bacteria that did not have a major inhibitory effect on the harmful fungi. Bacterial isolates of the genus *Bacillus*, especially *Bacillus subtilis*, occurred more frequently and had values between approx. 35 % (compared to *Trametes versicolor*) and approx. 80 % (compared to *Stereum hirsutum*). The bacterial species *Pseudomonas fluorescens* and *Stenotrophomonas rhizophila* inhibited the growth of the harmful fungus *Pleurotus ostreatus* with an inhibition factor of approx. 50 %. In addition to determining the inhibition factor, the dual cultures were visually assessed at the end of the test series and divided into four inhibition classes based on Schreiner (2008). Major, moderate and mildly inhibiting types of bacteria were assigned to class I, II and III, with class III (mildly inhibiting) being the largest proportion with 44 % (class I: 12 %; class II: 22 %). The last group, class IV, represented the 22 % bacterial isolates where no inhibitory effect against the harmful fungi was recorded. Following the results of the afore mentioned tests, a range of different types of inhibiting and different types of bacteria of class I and class II was selected. Each selected strain of bacteria was individually cultivated in a liquid medium and then mixed together to form two biological solutions (mixture A and B) for the final wood preservative test series. Based on the

European standards for testing the effectiveness of wood preservatives, see DIN EN 113 (1996-11) and DIN EN 152 (2011), test specimens of the wood species *Pinus sylvestris* (sapwood), *Fagus sylvatica* and *Aesculus hippocastanum* were treated with and without (control) bacteria solution (A and B). All wood test objects were positioned on agar plate, which was overgrown with the respective fungi mycelium of the standard test fungi *Trametes versicolor* (Linnaeus ex Fries), *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fries) and *Aureobasidium pullulans* (de Bary). For this purpose, and as explained at the beginning, two mixtures of bacterial solutions (A and B) of the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* were produced. The test specimens were soaked in the the respective mixutres. After cultivation, each test specimen was taken out at predefined intervals, and the mean loss of mass [%] was determined, as well as the moisture content of the test specimens. For the blue fungus *A. pullulans* additional evaluation criteria were considered, the degree of growth and the discoloration. The test series showed that the treated test specimens had similarly strong discoloration as the untreated test specimens. It was not possible to show any reduction in blue-staining due to the application of mixture B. The test specimens of the wood species *Pinus sylvestris* (sapwood), which were soaked in mixture A showed a weight loss of approx. 2.5 % after a test duration of 16 weeks. However, in the same time period, the control group with the untreated wood, which is without any bacterial mixture, showed a significant higher degradation of approx. 28 %. It was specifically noticeable that the moisture content in the wooden test specimens tremendously increased over the test period.

## 1 Einleitung und Hintergrund der Forschungsarbeit

Die Möglichkeit biologische und biotechnologische Verfahren, anstatt chemische Holzschutzmittel und Pestizide, für den Schutz von Holz und Pflanzen zu verwenden, rückt aufgrund von Nachhaltigkeits- und Umweltaspekten immer mehr in den Vordergrund. Dabei werden in der Natur existierende Bakterien und Pilze zur Bekämpfung des Wachstums von holzerstörenden Pilzen herangezogen. Entweder um die Pilze im Besiedeln zu hindern oder einen Befall abzumildern (Freitag & Morrel, 1991). Die Etablierung von antagonistischen Mikroorganismen oder ihrer Wirksubstanzen ist sinnvoll, wenn die Aspekte der Wirksamkeit, der Mensch- und Umweltverträglichkeit und der Wirtschaftlichkeit in Bezug auf die Produktion und den praktischen Einsatz erfüllt werden (Graf, 2001).

### 1.1 Schäden an Holz durch Mikroorganismen

#### 1.1.1 Holzverändernde Pilze

Eine Besiedlung holzverändernder Pilze ist abhängig von der Feuchtigkeit, dem Luftsauerstoff, der Temperatur und dem Nahrungsangebot. Dabei sind die Ansprüche der Pilze artenspezifisch (Huckfeldt & Schmidt, 2006). Manche Pilze befinden sich ausschließlich auf der Oberfläche des Holzes, andere besitzen die Fähigkeit über das Holzstrahlgewebe und die Tüpfel in das Holzinere vorzudringen (Schmidt, 1994). Anhand des Abbaus spezifischer Zellkomponenten kann eine Differenzierung in Braun-, Weiß- und Moderfäulepilze erfolgen (Falck & Haag, 1927).

Die zu den Basidiomyceten gehörenden Braunfäulepilze zersetzen die Kohlenhydrate des Holzes, die Cellulose und Hemicellulosen, und das Pektin (Liese & Schmid, 1962; Vorreiter, 1949). An dem Abbau von Cellulose und Hemicellulosen sind überwiegend Hydrolasen beteiligt, die die glykosidischen Bindungen spalten und dabei Wasser einlagern (Eriksson et al., 1990; Schmidt, 1994). Weil das Lignin und die Lignin-Derivate nicht enzymatisch zersetzt werden, kommt es zur typischen Braunfärbung und je nach Zersetzungsstärke des Holzes zu einem in der Größe variierenden Würfelbruch. Dabei reißt die Oberfläche des Holzes quer zur Faser und kann bei stärkerem Abbau unter leichtem Druck zerfallen. Die Festigkeit und Dimensionsstabilität des Holzes nimmt bereits zu Beginn des Befalls stark ab (Wilcox, 1978). Bei den Weißfäule verursachenden Pilzen werden entlang der vordringenden Hyphen Lignin und Kohlenhydrate des Holzes abgebaut (Rypacek, 1966). Dabei kann der Abbau simultan oder sukzessiv erfolgen (Blanchette, 1984). Bei der simultanen Weißfäule werden in Abhängigkeit von der Pilzart und der Zersetzungsstärke Kohlenhydrate und Ligninbestandteile annähernd zur gleichen Zeit abgebaut,

z.B. bei *Trametes versicolor* und *Fomes fomentarius* (Schmidt, 1994). Beim sukzessiven Holzabbau wird mithilfe von niedermolekularen Agenzien bevorzugt das Lignin, welches für den stabilen Zellverbund sorgt, zersetzt (Messner et al., 2003). Typische Pilze mit sukzessiver Weißfäule sind *Heterobasidion annosum* und *Bjerkandera adusta*. Generell ist die Intensität des Holzabbaus und die Minderung der Festigkeit vom Fäuletyp abhängig. Letzteres ist bei Braunfäulepilzen stärker zu verzeichnen als bei Weißfäuleerregern (Bariska et al., 1983).

Möderfäulepilze gehören den Asco- oder Deuteromyceten an (Liese & Schmid, 1962) und bauen wie die Braunfäulepilze Cellulose und Hemicellulosen enzymatisch ab. Eine Besiedlung des Holzes erfolgt über die Holzstrahlen und Gefäße, wobei das Wachstum hauptsächlich innerhalb der Zellwand stattfindet. Dabei werden zwei Typen unterschieden. Beim Moderfäuletyp 1 durchdringt der Pilz mithilfe dünner Perforationshyphen (Liese, 1966) die Tertiärwand und wächst entweder nach L-förmiger Kurve in eine Richtung oder nach T-förmiger Verzweigung in beide Richtungen in der Sekundärwand weiter (Nilsson, 1976). Der Moderfäuletyp 2 ist daran auszumachen, dass die Pilzhyphe die Tertiärwand vom Lumen her erodieren, um darauf bis zur Primärwand bzw. Mittellamelle vorzudringen (Schmidt, 1994). Moderfäulepilze besiedeln vorrangig Hölzer in feuchter Umgebung, wie z.B. in Berieselungsanlagen oder Masten und Pfosten in Erdkontakt (Liese & Ammer, 1964). Nach der Trocknung befallener Hölzer, weisen diese oft ein braunfäuleähnliches Schadbild mit Würfelbruch auf (Huckfeldt & Schmidt, 2006; Schmidt, 1994). Die Festigkeitseigenschaften des Holzes werden durch einen Befall mit Moderfäulepilzen deutlich herabgesetzt (Liese, 1964).

Die ebenfalls den Asco- oder Deuteromyceten zugehörigen Schimmel- und Bläuepilze besiedeln den Rohstoff Holz oberflächlich und ernähren sich von Bestandteilen, die sich in Holzparenchymzellen und im Splintholzkapillarwasser befinden (Göbelsmann, 2008; Huckfeldt & Schmidt, 2006; Liese, 1970). Die Stoffwechselprodukte dieser Pilze führen häufig zu Farbveränderungen im Holzgewebe (Schmidt, 1994; Shigo, 1965), welche in Bezug auf die weitere Verwendbarkeit von Hölzern nicht gewünscht ist. Der in dieser Forschungsarbeit verwendete Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* tritt häufig bei gestrichenen Hölzern nach erneuter Befeuchtung auf, z.B. bei Fenstern, Türen und Gartenmöbeln, und wird daher auch als Anstrichbläue bezeichnet (Schmidt, 1994).

#### 1.1.1.1 Verwendete Schadpilze

Die verwendeten Schadpilze wurden aufgrund ihrer Verschiedenartigkeit und Verfügbarkeit der AG Magel, Universität Hamburg, und des Prüfpilzbestandes des Thünen-Instituts, ausgewählt.

- a) *Stereum hirsutum* wird als Striegeliger Schichtpilz bezeichnet, erzeugt eine Weißfäule und gilt als schwacher Holzzerstörer (Huckfeldt & Schmidt, 2006). Dieser wird als Erreger von Rotstreifigkeit beschrieben, die auch zur Entwertung von Holz führen kann (v Pechmann et al., 1967).
- b) *Irpex lacteus* ist ein Schadpilz, der eine simultane Weißfäule an Laubbäumen verursacht und ein rasches Wachstum aufweist (Zabel & Morrell, 2012).
- c) *Trametes versicolor* tritt an gelagertem und verbautem Holz auf. Auch am stehenden Baum ist der simultane Weißfäuleerreger anzutreffen (Blanchette, 1984).
- d) *Flammulina velutipes* gilt als Saprophyt (Schlechte, 1986), kommt häufig an Park- und Straßenbäumen vor und erzeugt eine Weißfäule (Seehann, 1979).
- e) *Ganoderma adspersum* wird als wulstiger Lackporling bezeichnet, besiedelt vor allem Park- und Straßenbäume und ruft Fäulen im Stock- und Wurzelbereich hervor (Butin, 1989).
- f) *Trametes hirsuta* ist ein Saprobiont und erzeugt eine Weißfäule im Holz, vorzugsweise bei der Rotbuche. Die Striegelige Tramete tritt an lichtexponierten Standorten, an Park- und Straßenbäumen und am Waldrand auf (Krieglsteiner, 2000).
- g) *Pleurotus ostreatus* verursacht eine simultane Weißfäule, die unterschiedlich stark auftreten kann (Lichtenauer et al., 2013). Dieser gilt als Schwächeparasit und erscheint hauptsächlich an Laubhölzern, selten an Nadelholz (Krieglsteiner, 2000).
- h) *Daedalea quercina* wird als Eichenwirrling oder auch Eichen-Tramete bezeichnet und bewirkt eine Braunfäule in Eichenholz. Dieser ist in der Lage auch das widerstandsfähige Kernholz abzubauen (Domanski et al., 1973) und befällt insbesondere Hölzer, die in Erdkontakt sind, u.a. Schwellen, Gartenmöbel, Zaunpfähle und Brücken (Huckfeldt & Schmidt, 2006).
- i) *Fomitopsis pinicola* ist an Laub- und Nadelbäumen zu finden und befällt sowohl lebende Bäume als auch liegende Stämme. Der rotrandige Baumschwamm verursacht eine Braunfäule und kommt in der Natur sehr häufig vor (Huckfeldt & Schmidt, 2006).
- j) *Coniophora puteana* ist als Brauner Kellerschwamm bekannt und gilt als einer der häufigsten Hausfäuleerreger in Neubauten. Auch an verbautem Holz im Außenbereich sowie als Wund- und Schwächeparasit am lebenden Baum ist der Braunfäulepilz anzutreffen (Kreisel, 1961). Dieser ist in der Lage sowohl Nadel- als auch Laubhölzer abzubauen (Wälchli, 1976).

### 1.1.2 Schäden durch Bakterien

Als Nährstoff der Bakterien dienen bevorzugt frei zugängliche Zucker und bestimmte Inhaltsstoffe der Parenchymzellen. Schmidt & Dietrichs (1976) fanden im Rahmen von Laboruntersuchungen heraus, dass manche Bakterien in der Lage sind Pektin, Cellulose und Hemicellulosen abzubauen, ebenso Ligninderivate (Vicuña, 1988). Zu einer saprophytischen Besiedlung von Bakterien kommt es vorwiegend bei nassgelagertem Holz, Sturmwurf-Hölzern oder Hölzern in Erdkontakt (Klaassen, 2008; Klaassen & van Overeem, 2012). Ein bakterieller Holzabbau geht oft mit Moderfäulepilzen einher (Singh & Wakeling, 1993). Bei lebenden Baumindividuen liefern besiedelnde Bakterien, dann als Parasiten bezeichnet, meist die Eintrittspforten für holzerstörende Pilze (Müller-Navarra, 2019; Rayner & Boddy, 1988; Shigo, 1965).

Anhand des unterschiedlichen Zellwandabbaus lassen sich Bakterien in drei Gruppen einteilen: cavity-, erosion- und tunnelling-Bakterien (Singh & Butcher, 1991; Singh et al., 1992). Das Abbaumuster der cavity- und erosions-Bakterien ähnelt dem der Moderfäuletypen 1 und 2 (s. Kap. 1.1.1). Die tunneling-Bakterien können sich mithilfe ihrer Schleimhüllen durch ihre Zellwandhöhlungen bewegen (Schmidt, 1994). Aufgrund der von den Bakterien synthetisierten Stoffwechselprodukte kommt es zu Veränderungen des pH-Wertes, welches zu dunklen Verfärbungsreaktionen im Holz führt (Schmidt & Mehringer, 1989). Bakterien greifen die nicht-lignifizierten Tüpfelmembranen an (Liese, 1970) und erhöhen damit die Wegsamkeit, u.a. für Holzschutzmittel oder Farbanstriche (Willeitner, 1971), wodurch es zu einer ungleichmäßigen Überaufnahme kommt (Hof, 1971). Auch kann die lokal veränderte Durchlässigkeit des Holzes bei technischer Trocknung zur Rissbildung führen (Hartley et al., 1961; Schink et al., 1981).

## 1.2 Roskastanien-Komplexkrankheit

Aufgrund der Aktualität der neuen Roskastanien-Komplexkrankheit ist diese Thematik mit in diese Forschungsarbeit aufgenommen worden. Die Komplexkrankheit tritt bei Weißblühenden (*Aesculus hippocastanum*) und Rotblühenden Roskastanien (*Aesculus x carnea*) auf, die von dem Primärschädling *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* besiedelt werden (Müller-Navarra et al., 2014). Dieses Bakterium dringt über kleinste Wunden innerhalb der Rinde in den Baum ein (Schmidt et al., 2014) und verursacht aufgrund ausscheidener Stoffwechselprodukte Rindennekrosen (Green et al., 2009). Diese können sich anhand rotbrauner/schwärzlicher Ausflüsse zeigen und bei absterbendem Gewebe zu Rissen entlang der Borke führen (Mertelik et al., 2013; Müller-Navarra et al., 2014). Ist die Abwehrreaktion des befallenen Baumindividuums zu schwach, kann das Bakterium bis zum Kambium vordringen und dadurch Eintrittspforten für holzerstörende Pilze liefern, u.a. *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus* (Dujesiefken et al., 2016). Zum einen ist

die Rosskastanie dafür bekannt Schadorganismen schlecht abschotten zu können (Dujesiefken & Liese, 2015) und zum anderen ist der Verlauf dieser Komplexkrankheit sehr rasch, weswegen die meisten Bäume, insbesondere aus Verkehrssicherheitsgründen, zügig gefällt werden müssen (Müller-Navarra, 2019).

### 1.3 Wissensstand Holzschutz

Generell besteht das Ziel des Holzschutzes darin, alle Möglichkeiten der Schutzmaßnahmen umzusetzen, um die Entwicklung von Holzpilzen und anderen Schadorganismen zu vermeiden oder wenigstens einen Befall einzudämmen. Die Schutzprinzipien werden von Willeitner (1981b) anhand der Voraussetzungen für die Entwicklung von Holzpilzen und dessen Gegenmaßnahmen formuliert. Beim baulichen Holzschutz, der den konzeptionellen und konstruktiven Holzschutz umfasst, ist die Auswahl geeigneter Holzarten und Hilfsstoffe, sowie die zweckmäßige Konstruktion und die entsprechende Einschnittsform relevant (Willeitner, 1981a). Dadurch kann Feuchtigkeit vermieden und weiterführend Fäulnisschäden verhindert werden. Natürlich dauerhafte Holzarten zeichnen sich durch ihren hohen Extraktstoffanteil im Kern aus.

Handelt es sich um wenig natürlich dauerhafte Holzarten oder Splintholz, kann das Holz modifiziert oder chemisch mithilfe biozider Substanzen geschützt werden. Ersteres geht mit einer Veränderung der Holzsubstanz einher, z.B. Acetylierung oder Hitzebehandlung. Bei der Holzimprägnierung werden Hölzer mit einem geeigneten Holzschutzmittel (HSM) getränkt, um diese widerstandsfähig gegenüber Schadorganismen zu machen. Chemische HSM basierend auf dem Kohlenwasserstoff Pentachlorphenol (PCP) fanden aufgrund ihrer starken fungiziden Wirkung vielseitig Anwendung. Hierbei wurde das PCP oft mit dem Insektizid Lindan versetzt, im Verhältnis PCP: Lindan von ca. 10: 1, und i.d.R. mit einem PCP-Gehalt von 5 % eingesetzt. Mit dem Ziel der Vorbeugung eines Befalls wurden die imprägnierten Hölzer im Dachstuhlbereich verbaut oder für Holzfenster, Holzverkleidungen und Holzfußböden verwendet. Auch für Hausschwamm-sanierungen oder Insektenbefälle wurden Lösungen auf PCP-Basis eingesetzt. Da PCP gesundheitsschädlich ist, wurden Gemische mit PCP-Verbindungen im Rahmen des Verbotes nach §1 der Verordnung und Beschränkungen des Inverkehrbringens gefährlicher Stoffe, Zubereitungen und Erzeugnisse nach dem Chemikaliengesetz (Chemikalien-Verbotsverordnung – ChemVerbotsV) im Jahr 1989 verboten.<sup>1</sup> Holzschutzmittel auf Basis von Chromiertem Kupferarsenat (engl. CCA, dt. CKA), welches Chrom, Kupfer und Arsen beinhaltet, wurden für die

---

1

[https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?start=%2F%2F%5B%40attr\\_id%3D%27bgbl193s1720.pdf%27%5D#\\_\\_bgbl\\_\\_%2F%2F%5B%40attr\\_id%3D%27bgbl193s1720.pdf%27%5D\\_\\_1598434264549](https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?start=%2F%2F%5B%40attr_id%3D%27bgbl193s1720.pdf%27%5D#__bgbl__%2F%2F%5B%40attr_id%3D%27bgbl193s1720.pdf%27%5D__1598434264549), aufgerufen am 26.08.2020

Konservierung von Holz verwendet und hatten ihren Beginn in den 1930er Jahren. Da auch diese Mittel stark gesundheitsschädliche Eigenschaften besitzen, ist im Rahmen der Richtlinie 2003/2/EG geregelt worden, dass der direkte Kontakt von Verbrauchern mit arsenbehandeltem Holz verboten ist, mit Ausnahme bestimmter Anwendungsbereiche, für die strikte Vorgaben gelten.<sup>2</sup> Seitdem werden größtenteils wasserlösliche HSM auf Salzbasis verwendet, u.a. Chrom-, Kupfer- und Borverbindungen (CKB), die insektizid und fungizid wirken. Je nach Gebrauchsklasse sind dementsprechend die empfohlenen HSM anzuwenden. In der Normenreihe DIN 68800 (2011) besteht grundsätzlich das Vorhaben den baulichen Holzschutz vor den chemischen Holzschutz zu stellen.<sup>3</sup> Zusätzlich ist geregelt, dass ausschließlich im Außenbereich chemische HSM verwendet werden dürfen, nicht im Innenraum. Für ersteres gilt in Bezug auf nichttragende Bauteile der Gebrauchsklasse 4 (vorwiegend bis ständig feucht), dass das HSM mittels Kesseldruckverfahren in Hölzer eingebracht werden muss, um die Dauerhaltbarkeit zu gewährleisten.

Weil generell chemische HSM sowohl in der Produktion und Anwendung als auch in der Entsorgung umweltbelastend und schädlich für Menschen und Tiere sind, ist es notwendig, die Forschung in Richtung nachhaltiger biologischer Produkte voranzubringen.

Mithilfe antagonistischer Mikroorganismen, z.T. auch in Kombination mit chemischen HSM (Nicolotti et al., 1999), kann der Einsatz von Chemikalien reduziert und eine umweltfreundliche Alternative geschaffen werden. Dabei ist auch entscheidend, in welchem Bereich das biologische Präparat eingesetzt werden soll. Verschiedene Trichoderma-Arten sind bereits als antagonistische Gegenspieler zu Basidiomyceten bekannt, u.a. zur Vermeidung der Verbreitung von Forstschadpilzen an Baumstubben (Holdenrieder, 1984), Besiedlung lagernder Rundhölzer (Bruce et al., 1991) oder frischen Wunden nach dem jährlichen Schnitt von Stadtbäumen (Schubert et al., 2008).

Im Pflanzenschutz und in der Forstwirtschaft wird bereits auf biologische Präparate zurückgegriffen. Generell ist unter biologischem Pflanzen- und Holzschutz der Schutz durch ein oder mehrere Mikroorganismen gegenüber Schadorganismen zu verstehen. Dabei sind verschiedene Mechanismen wie Platz- und Nährstoffkonkurrenz, Mykoparasitismus (Harman 2000) oder die Produktion von Antibiotika bzw. Enzymen von Bedeutung. Cook (1988) beschreibt die

---

<sup>2</sup> <https://www.europarl.europa.eu/sides/getAllAnswers.do?reference=E-2003-0582&language=DE>, aufgerufen am 26.08.2020

<sup>3</sup> <https://www.din.de/de/ueber-normen-und-standards/nutzen-fuer-den-verbraucher/verbraucherrat/ueber-uns/entwurf-din-68800-3-holzschutz-teil-3-vorbeugender-schutz-von-holz-mit-holzschutzmitteln-veroeffentlicht-327260>, aufgerufen am 30.08.2020



Fähigkeit der raschen Vermehrung von Mikroorganismen, die damit eine „lebende Barriere“ darstellen und Pathogenen keine Möglichkeit der Besiedlung bieten. Beim Mykoparasitismus besiedeln Mikroorganismen pflanzenpathogene Pilze und unterdrücken diese, wie es z.B. bei Arten der Gattung *Trichoderma* vorkommt (Kendrick 1992). Außerdem besitzen diese Mikroorganismen die Fähigkeit, Nährstoffe in der Erde zu mobilisieren und den Pflanzen zur Verfügung zu stellen (Harman 2000). Diese aus der Abteilung der Schlauchpilze stammenden Pilze wurden bereits hinreichend untersucht und u. a. im Bereich nachhaltiger Agrarwirtschaft eingesetzt. Durch *Trichoderma*-Isolate konnte ein erhöhtes Wachstum, eine verbesserte Entwicklung und schließlich eine höhere Ausbeute der Pflanzen gezeigt werden (Bailey et al., 2006; Lo & Lin, 2002). Im Rahmen von Dualkulturen zeigten Jeyaseelan et al. (2012), dass *T. harzianum* den Pathogenpilz *Pythium aphanidermatum*, der für geringere Ausbeuten von Tomaten verantwortlich ist, signifikant zu hemmen vermochte. Neben dem Schutz wirkten sowohl *T. harzianum* als auch *T. viride* wachstumsfördernd. Der bodenbürtige Erreger *Rhizoctonia solani* befällt Kartoffeln und Salat und konnte unter kontrollierten Bedingungen in Kultur von *T. viride* und *T. reesei* gehemmt werden (Grosch et al., 2007). Auch im Bereich der Forstwirtschaft kommen Präparate mit Trichoderma-Isolaten zum Einsatz, die bereits patentiert wurden (Messner et al., 1997). Das Produkt Rotstop® der finnischen Firma Verdera, welches getrocknete Pilzsporen von *Phlebiopsis gigantea* enthält, wird als natürlicher Gegenspieler des Wurzelschwammes *Heterobasidion annosum* auf Fichten-Baumstümpfe appliziert (Metzler et al., 2005). Annesi et al. (2005) verglichen das Produkt Rotstop® mit einem eigenen Isolat von *P. gigantea*, in dem sie Fichten-Holzstämme mit den biologischen Suspensionen beimpften und diese nach 1h mit einer *H. annosum*-Lösung besprühten. Sowohl das kommerzielle Produkt als auch der eigene *P. gigantea*-Stamm wiesen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine Schutzwirkung auf. Neben *Picea abies* konnte auch bei *Pinus sylvestris* eine Inhibition durch *P. gigantea* gegenüber des Basidiomyceten *H. annosum* festgestellt werden (Holdenrieder, 1984; Rishbeth, 1963). Nicolotti et al. (1999) führten ebenfalls Versuche zur biologischen Bekämpfung von *H. annosum* an Fichtenstümpfen durch. Die besten Ergebnisse erzielten sie mit Behandlungen von *Phanerochaete velutina*, der Konidiensuspension von *Verticillium bulbillosum* und der Kombination von *V. bulbillosum* mit dem chemischen Mittel Propiconazol. Lundborg & Unestam (1980) zeigten anhand von *in vitro*-Untersuchungen auf Malz-Medium, dass die Stoffwechselprodukte u.a. von *Trichoderma harzianum* abtötend gegenüber *H. annosum* wirken. Weiter wurden Isolate von *T. harzianum* zur Wachstumsstärkung von Apfelsamen eingesetzt, wodurch sich der Befall des Wurzelpathogens *Phellinus noxius* verringerte (Roiger & Jeffers, 1991). Im Rahmen von Untersuchungen der in der südlichen Hemisphäre

vorkommenden Baumart *Araucaria angustifolia* wurde der Pilzpathogen, welcher für die fehlerhafte Entwicklung der Samen verantwortlich ist, durch bodenbürtige Streptomyceten inhibiert (Dalmas et al., 2013). Die von den Streptomyceten ausgeschiedenen Sekundärmetabolite wurden mittels HPLC-MS-Analyse (*high performance liquid chromatography-mass spectrometry*) identifiziert, z.B. Filipin und Lagosin. *Streptomyces violaceusniger* produziert mykolytische Enzyme, u.a.  $\beta$ -1, 3-Glucanase, die hemmend gegenüber verschiedenen Braun- und Weißfäulepilze wirken (Kumar & Gupta, 2004; Nagpure et al., 2014). Croan & Highley (1994) stellten Untersuchungen zu *Streptomyces rimosus* an, indem sie Kiefer-Prüfkörper mit inhibierenden Komponenten beimpften und nach acht Wochen Prüfungsdauer weder Holzersetzen noch Verfärbungen der Prüfkörper feststellten. Aus der natürlichen Umgebung einer norwegischen Fichte konnte ein Isolat des Actinobakteriums *Streptomyces spp.* gewonnen und in Bezug auf Mykorrhiza-Pilze und mehreren Stämmen des Pathogens *H. annosum* näher untersucht werden (Lehr et al., 2007). Anhand von Dualkulturen und Versuchen mit Holzscheiben der Baumart *Picea abies* konnte bestätigt werden, dass das Isolat *Streptomyces spp.* sekundäre Metabolite produziert und dadurch den Schaderreger im Wachstum stark beeinflusst. Im Rahmen von Laboruntersuchungen beimpften Benko & Highley (1990a) Kiefer-Prüfkörper (*Pinus spp.*) mit einer Bakterien-Lösung bestehend aus sechs verschiedenen Bakterien-Gattungen, u.a. *Streptomyces* und *Pseudomonas*, und setzten diese verschiedenen Schadpilzen aus. Nach zwei Monaten Prüfungsdauer konnte ein Masseverlust von unter 1 % festgestellt werden. Dass sich die gramnegativen Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, u.a. *Pseudomonas fluorescens*, rasch vermehren und effektiv kolonisieren, ist für den Einsatz als Antagonisten von Vorteil (Haas & Défago, 2005). Auch das Bakterium *Bacillus subtilis* besitzt fungizide Eigenschaften und wurde in Hinblick auf die Zellvermehrung, der Sporulation und der Entwicklung von Metaboliten mit der Wahl verschiedener Medien näher untersucht (Feio et al., 2004; Kreber & Morrell, 1992). Aufgrund des mikrobiellen Befalls von Hackschnitzeln in der Zellstoff- und Papierindustrie, testeten Bernier et al. (1986) *B. subtilis* in Gegenüberstellung u.a. mit dem Bläuepilz *Aureobasidium pullulans*. Sowohl die Produktion von Antibiotika als auch das rasche Wachstum des Bakteriums und damit die Sicherung der Nährstoffe waren dafür verantwortlich, dass sich der Bläuepilz nicht etablieren konnte (Bernier et al., 1986). Tamehiro et al. (2002) untersuchten das von *B. subtilis* synthetisierte Phospholipid Bacilysocin und zeigten, dass dieser Stoff vom Bakterium nach Erreichen der stationären Phase produziert wird und vermutlich bei der Sporenbildung eine Rolle spielt.

Viele fungizide Metabolite und Enzyme von bestimmten Bakterienarten sind bereits näher im Rahmen von Laboruntersuchungen beschrieben worden, jedoch fehlt es an Erfahrung hinsichtlich

der Anwendung unter Feldbedingungen. Um schließlich ein biologisches Holzschutzpräparat auf dem Markt etablieren zu können, müssen die Produktionskosten gering und das Präparat leicht zu lagern und anzuwenden sein. Außerdem ist eine möglichst lange Behauptung gegenüber holzerstörender Pilze Voraussetzung, um gängigen chemischen Holzschutzmitteln Konkurrenz zu bieten (Kumar & Gupta, 2005).

#### **1.4 Ziel der vorliegenden Untersuchung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aufzuzeigen, dass Bakterienkolonien auf der Borke jeglicher Baumindividuen dazu beitragen, für eine Art „natürlichen Schutz“ vor Schadorganismen zu sorgen. Dieses biologische Abwehrsystem kann bei lebenden Baumindividuen aufgrund von verschiedenen Gegebenheiten, z.B. Stadtbäumen, die Bodenverdichtungen oder vermehrten Schadstoffen ausgesetzt sind, geschwächt sein. Dadurch können der jährliche Schnitt oder Verletzungen am Baum eine weitere Herausforderung darstellen. Mithilfe einer biologischen und antagonistisch wirksamen Bakterien-Suspension könnten offene Schnittstellen oder erkrankte Baumindividuen geschützt bzw. gestärkt werden. Ebenfalls könnte eine solche Bakterien-Lösung für verbautes Holz, z.B. Terrassendielen oder Gartenelemente, eingesetzt werden, indem statt konventioneller HSM ein biologisches Präparat mittels Kesseldruckverfahren in Hölzer eingebracht wird. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Anfänge dieser möglichen Anwendungsbereiche gemacht, indem der natürlichen Umgebung entnommenen Bakterienarten identifiziert und auf ihre antagonistischen Eigenschaften hin untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Bakterien

#### 2.1.1 Probenherkunft

Die Beschaffung der Borkeproben unterschiedlicher Baumarten fand sowohl auf dem Arboretum der Universität Hamburg des Zentrums Holzwirtschaft als auch in Wulfsode (Niedersachsen), Oechtringen (Niedersachsen) und Bordesholm (Schleswig-Holstein) statt. Dabei wurden mithilfe eines sterilen Beutels Borkeproben von ausgewählten Bäumen an folgenden Bereichen entnommen:

- im Bereich des Stammfußes
- im Brusthöhenbereich und
- von der Rinde 1-2-jähriger Äste.

Es wurden von insgesamt 32 Baumindividuen elf verschiedener Baumarten Borkeproben genommen (Tab. 1), dessen Auswahl aufgrund der Faktoren Standorteinfluss und Vitalitätszustand getroffen wurde. Auch wurden die Koordinaten der Baumstandorte, die Himmelsrichtung der Probenentnahme und die Temperatur bzw. die allgemeine Wetterlage notiert. Zum Sammelzeitpunkt 1, am 15.05.2014, wurden 23 Borkeproben der Baumarten *Aesculus hippocastanum*, *Ginkgo biloba*, *Juglans nigra*, *Larix decidua*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*, *Robinia pseudoacacia*, *Quercus petraea* und *Quercus robur* eines Standortes genommen. Die Probenentnahmen am 14.07.2014 und 21.07.2014 betrachteten die unterschiedlich vorherrschenden Vitalitätszustände der Baumindividuen. So wurden Borkeproben der weißblühenden Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*) genommen, die zum einen unter der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit litten (typisches Schadbild, Abb. 1) und zum anderen von der Miniermotte (*Cameraria ohridella*) befallen waren. Letztere Rosskastanien wiesen bis auf die Anwesenheit der Miniermotte einen guten Vitalitätszustand auf und standen am Rand eines Waldes in Oechtringen. Die Borkeproben der Sommerlinde *Tilia platyphyllos*, die am 12.08.2014 und 09.09.2014 genommen wurden, bezogen sich auf die Verschiedenartigkeit des Standortes (Park- und Straßenbäume). Beide zuletzt genannten Baumarten sind in Deutschland häufig als Park- und Alleebäume bekannt und dementsprechend viel in Städten und auf dem Land vertreten.



Abb. 1: Weißblühende Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*): Pfeil mit kreisrundem Ausschnitt zeigt typische Leckstellen der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit, einhergehend mit auffälligen Rindenrissen; Wulfsode (Niedersachsen).

Tab. 1: Probenherkünfte mit Angabe der Baumart, des Vitalitätszustandes, der vorherrschenden Wetterlage und der Probenanzahl.

Datum	Baumart(en)	Koordinaten in Grad, Minuten und Sekunden [GMS]	Zustand des Baumes gesund= [G], krank= [K]	Himmelsrichtung der Probenentnahme	Temperatur/Klima	Probenanzahl
15.05.2014	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°30'19.59", 10°11'58.88"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	3
	<i>Gingko biloba</i>	53°30'15.39", 10°12'2.93"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Juglans nigra</i>	53°30'17.86", 10°12'004"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Larix decidua</i>	53°30'12.90", 10°12'1.29"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Pinus nigra</i>	53°30'19.21", 10°11'5919"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Pinus sylvestris</i>	53°30'17.92", 10°11'56.39"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	53°30'10.67", 10°12'13.54"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	53°30'12.06", 10°12'2.10"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	3
	<i>Quercus petraea</i>	53°30'20.72", 10°11'56.62"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	2
	<i>Quercus robur</i>	53°30'13.69", 10°12'12.59"	G	Nord	13°C bewölkt, z.T. Schauer	3
	14.07.2014	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig
<i>Aesculus hippocastanum</i>		53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig	3
<i>Aesculus hippocastanum</i>		53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig	3
<i>Aesculus hippocastanum</i>		53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig	3
<i>Aesculus hippocastanum</i>		53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig	3
<i>Aesculus hippocastanum</i>		53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig	3
<i>Aesculus hippocastanum</i>		53°3'36", 10°13'48"	K *	Ost	ca. 20°C, sonnig	3
21.07.2014	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°04'68", 10°20'26.44"	G	Ost	20-27°C, zeitweise wolkig	3
	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°04'68", 10°20'26.44"	G	Ost	20-27°C, zeitweise wolkig	3
	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°04'68", 10°20'26.44"	G	Ost	20-27°C, zeitweise wolkig	3
	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°06'36.97", 10°20'15.83"	G	Ost	20-27°C, zeitweise wolkig	3
	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°06'36.97", 10°20'15.83"	G	Ost	20-27°C, zeitweise wolkig	3
	<i>Aesculus hippocastanum</i>	53°06'36.97", 10°20'15.83"	G	Ost	20-27°C, zeitweise wolkig	3
12.08.2014	<i>Tilia platyphyllos</i>	54°9'48.98", 10°1'20.94"	G	West	17-20°C, z.T. Schauer	3
	<i>Tilia platyphyllos</i>	54°9'48.98", 10°1'20.94"	G	West	17-20°C, z.T. Schauer	3
	<i>Tilia platyphyllos</i>	54°9'48.98", 10°1'20.94"	G	West	17-20°C, z.T. Schauer	3
09.09.2014	<i>Tilia platyphyllos</i>	54°10'5.26", 10°1'33.16"	G	Ost	19°C, vereinzelt Regen	3
	<i>Tilia platyphyllos</i>	54°10'7.29", 10°1'33.21"	G	Ost	19°C, vereinzelt Regen	3
	<i>Tilia platyphyllos</i>	54°10'8.65", 10°1'33.46"	G	Ost	19°C, vereinzelt Regen	3
12.12.2014	<i>Robinia pseudoacacia</i>	53°30'12.34", 10°12'1.68"	G	Nord	6-8°C, windig, Regen	3
	<i>Juglans regia</i>	53°30'11.58", 10°12'0.51"	G	Nord	6-8°C, windig, Regen	3
	<i>Quercus petraea</i>	53°30'15.68", 10°11'55.36"	G	Nord	6-8°C, windig, Regen	2
Anzahl	<b>32</b>					<b>88</b>

\*Neue Rosskastanien-Komplexkrankheit verursacht durch das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* und die Schadpilze *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus*

## 2.2 Holzerstörende Pilze

Die Auswahl der holzerstörenden Pilze für die Untersuchungen im Rahmen der Dualkultur-Testreihe fiel auf verschiedene Weiß- und Braunfäulepilze der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Magel der Universität Hamburg. Für die Abbauprobungen wurden sowohl die Normpilze *Trametes versicolor* (Linnaeus ex Fries) und *Coniophora puteana* (Linnaeus ex Fries) als auch der Norm- und Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* (de Bary) aus der Arbeitsgruppe von Dr. Melcher des Thünen-Instituts in Hamburg bezogen (Tab. 2). Für die Testreihe der Rosskastanien-Prüfkörper standen die Isolate aus den Untersuchungen von Müller-Navarra (2019) zur Verfügung.

Tab. 2: Weiß- und Braunfäulepilze, die für die Untersuchungen herangezogen wurden. Die lfd. Nr. 1-9 für die Dualkultur-Testreihe und lfd. Nr. 10-12 für die Abbauprobungen bzw. lfd. Nr. 12 für den Bläuetest.

Lfd. Nr.	Name des Schadpilzes	Verursachung im/am Holz	Verwendung im Test
1	<i>Stereum hirsutum</i>	Weißfäule	Dualkulturen
2	<i>Irpex lacteus</i>	Weißfäule	
3	<i>Trametes versicolor</i>	Weißfäule	
4	<i>Flammulina velutipes</i>	Weißfäule	
5	<i>Ganoderma adspersum</i>	Weißfäule	
6	<i>Trametes hirsuta</i>	Weißfäule	
7	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Weißfäule	
8	<i>Daedalea quercina</i>	Braunfäule	
9	<i>Fomitopsis pinicola</i>	Braunfäule	
10	<i>Coniophora puteana</i> (Linnaeus ex Fries)	Braunfäule	Abbauprobungen
11	<i>Trametes versicolor</i> (Linnaeus ex Fries)	Weißfäule	
12	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary)	Bläue	Bläuetest

## 2.3 Nährmedium

Je nach Anwendungsbereich wurden bestimmte Nährmedien ausgewählt und für die jeweiligen Untersuchungen herangezogen (Tab. 3). Dabei sind neben der Zusammensetzung der Medien auch deren spezifischer pH-Wert und das Anwendungsgebiet aufgeführt. Das Pepton-Flüssigmedium beinhaltete alle Bestandteile eines Pepton-Mediums, jedoch ohne Zugabe des Agars. Dieses diente als Nährlösung für die Bakterien zur Bestimmung der spezifischen Wachstumskurven (Kap. 3.8). Zudem wurde sowohl das Pepton- als auch das Hefeextrakt-Flüssigmedium zur Aufbewahrung der Bakterien verwendet (Kap. 3.7).

Tab. 3: Verwendete Nährmedien, deren Zusammensetzung mit Angabe des Herstellers, pH-Wertes und des Verwendungsbereichs.

Bez.	Typ	Bestandteile	[%]	Firma	pH- Wert	Verwendung
P	Pepton-Agar (Braun-Kiewnick & Sands, 2001)	Pepton	0,5	Oxoid Deutschland GmbH	7,2	Bakterienisolierung, Reinkulturen
		Fleischextrakt	0,3	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		Hefeextrakt	0,05	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		Agar	1,5	Oxoid Deutschland GmbH		
HA	Hefeextrakt-Agar	Malzextrakt	1	Merck KGaA	6,8 (+/- 0,2)	Pilz- und Bakterienkultivierung, Dual- und Multiplexkulturen, Abbauversuche
		Hefeextrakt	0,4	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		Glukose x H <sub>2</sub> O	0,4	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,8	Merck KGaA		
		Agar	1,5	Oxoid Deutschland GmbH		
M	Malz-Agar	Malzextrakt	2	Merck KGaA		Pilzkultivierung
		Agar	1,5	Oxoid Deutschland GmbH		
	Pepton- Flüssigmedium	Pepton	0,5	Oxoid Deutschland GmbH	7,2	Vermehrung/ Aufbewahrung von Bakterien
		Fleischextrakt	0,3	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		Hefeextrakt	0,05	Carl Roth GmbH+Co. KG		
	Hefeextrakt- Flüssigmedium	Malzextrakt	1	Merck KGaA	6,8 (+/- 0,2)	Vermehrung/ Aufbewahrung von Bakterien
		Hefeextrakt	0,4	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		Glukose x H <sub>2</sub> O	0,4	Carl Roth GmbH+Co. KG		
		CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,8	Merck KGaA		

## 2.4 Holzprüfkörper

Für die Testreihe der Abbauversuche in Anlehnung an die Norm DIN EN 113 (1996) wurden Holzprüfkörper der Gattungen *Pinus*, *Fagus* und *Aesculus* in den Maßen 30x30x5 mm<sup>3</sup> herangezogen (Tab. 4). Brischke et al. (2012) verwendeten Prüfkörper (Pk) gleicher Dimension für Holzabbauversuche an *Quercus robur* und *Fagus sylvatica* durch die Schadpilze *Donkioporia expansa*, *Coniophora puteana* und *Trametes versicolor*. Für die jeweilige Versuchsreihe wurden die Pk vor Versuchsbeginn in einem Trockenschrank für 18-22 h bei 103 °C darrgetrocknet (Modell 500, Memmert GmbH & Co KG), zur Abkühlung im Exsikkator für ca. 2 h belassen, anschließend gewogen und vermessen. So wurde die Anfangs-Darrdichte und im weiteren Versuchsablauf der Masseverlust bestimmt (s. Formel (iii), Kap. 3.10.2).

Tab. 4: Für die Testreihe verwendete Holzprüfkörper mit Angabe der Holzart, des verwendeten Abschnitts und der Maße der Prüfkörper (Pk).

Holzart	Deutsche Bezeichnung	Verwendeter Abschnitt	Maße der Pk
<i>Pinus sylvestris</i>	Gemeine Kiefer	Splint	30x30x5 mm <sup>3</sup>
<i>Fagus sylvatica</i>	Rotbuche	Splint	30x30x5 mm <sup>3</sup>
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Gewöhnliche Rosskastanie	Splint	30x30x5 mm <sup>3</sup>



## 2.5 Geräte und Dienstprogramme

Die verwendeten Geräte und Dienstprogramme sind folgend aufgeführt (Tab. 5).

Tab. 5: Verwendete Geräte und Dienstprogramme.

Geräte/ Dienstprogramme	Bezeichnung/ Quelle	Art der Verwendung
Autoklav	Systec GmbH Labor- und Systemtechnik, D-35435 Wetzlar; VE-150	Herstellung der Medien
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> von NCBI	Artbestimmung durch Sequenzvergleich
Darrofen	Memmert GmbH & Co KG, Modell 500	Darrtrocknen der Pk
Elektrophoresekammer	Firma Cosmobio Co., Ltd	Überprüfung der PCR-Produkte
Gel-Doc	BIORAD Universal Hood II - Biorad Laboratories Segrate (Milan, Italien)	Geldokumentation
ImageJ®	Version 1.52a	Bildbearbeitung; Einfügen e. Maßstabs
Mega5	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> – <a href="http://www.megasoftware.net">www.megasoftware.net</a>	Alignment der Sequenzen
MWG	Eurofins MWG GmbH – Anzinger Str. 7a, D-85560 Ebersberg	Sequenzierung
Nanodrop 2000	Spectrophotometer – Firma ThermoScientific	Ermittlung des DNA-Gehalts
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> – <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/">http://ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Artbestimmung durch Sequenzvergleich
Photospektrometer	Firma Spectronic Camspec Ltd, Modell M508	Bestimmung der Wachstumskurven der Bakterienarten
R Statistik	R Core Team (2019) <a href="https://www.R-project.org/">https://www.R-project.org/</a>	Auswertung der Ergebnisse
Thermocycler	Biometra T Gradient - Biometra GmbH, D-37079 Göttingen	Vervielfältigung der spez. DNA-Abschnitte
Thermoschüttler	HLC BioTech., D-37120 Bovenden	Zellyse (DNA-Extraktion)
Zentrifuge	Heraus Centrifuge PICO 17 – Thermo Scientific	Separation von Bestandteilen (DNA-Extraktion)

## 3 Methoden

### 3.1 Überblick Methoden

Ein Überblick über die angewandten Methoden dieser Arbeit ist in Form eines Flussdiagramms dargestellt (Abb. 2). Die Bakterienkolonien wurden von Borke ausgewählter Baumindividuen isoliert und standen über den Versuchszeitraum in Form von Reinkulturen zur Verfügung. Eine Auswahl an Bakterienarten wurde sowohl morphologisch charakterisiert und biochemisch untersucht als auch molekularbiologisch identifiziert. Weiter fand eine Zusammenstellung der stärksten Antagonisten für die Bakterien-Gemische A und B statt, die im Rahmen der Abbauersuche in Anlehnung an DIN EN 113 (1996-11) bzw. DIN EN 152 (2011) als biologische Holzschutzmittellösungen eingesetzt wurden.

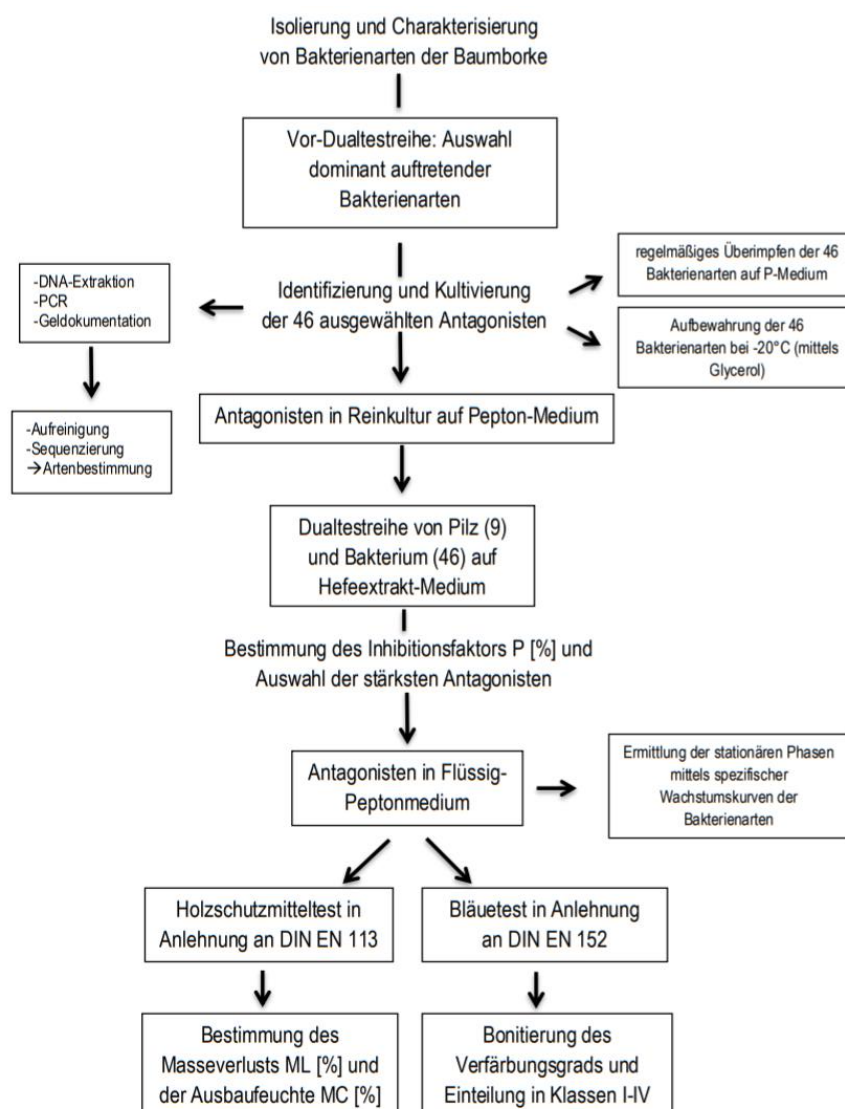


Abb. 2: Überblick über die Arbeitsschritte in Form eines Flussdiagramms.

### 3.2 Isolierung der Bakterien

Zur Isolierung der Bakterien wurden die mittels sterilem Holzbeitels entnommenen 1 cm<sup>2</sup> großen Borkeproben in Reagenzgläser mit sterilem Wasser gewaschen, anschließend für 5 min. geschüttelt und unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10 bzw. 1:100 auf Pepton-Medium (Rezept s. Kap. 2.3) mithilfe eines sterilen Drigalskispatels ausplattiert (Abb. 3).

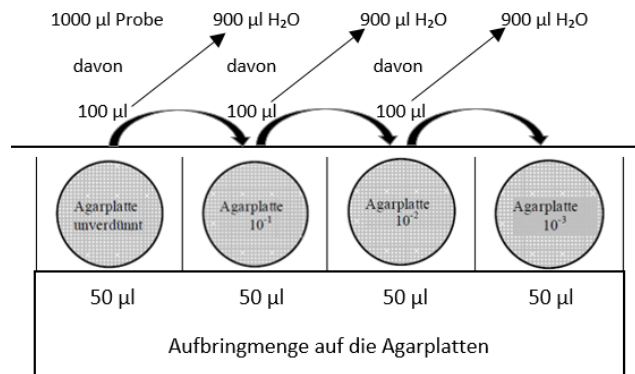


Abb. 3: Verdünnungsreihen der Borkeproben mit 1000 µl Probe (unverdünnt), wovon für die jeweils nächste Verdünnung 100 µl zu 900 µl sterilem H<sub>2</sub>O überführt wurde; 50 µl Aufbringmenge auf die Agarplatte.

Nach 5 Tagen fand die Auswertung der Agarplatten statt. Kolonien wurden numerisch erhoben und bestimmte Bakterienarten u.a. anhand der Kolonief orm, des Aussehens und der Struktur morphologisch charakterisiert (s. Kap. 3.4). Bei der Bakterienauswahl wurde darauf geachtet, wie stark das Konkurrenzverhalten der jeweiligen Bakterienart gegenüber anderen Mikroorganismen (Bakterien und auch Pilzen) ausgeprägt war. Ein exemplarisches Beispiel einer Bakterienauswahl ist in der folgenden Abbildung dargestellt (s. Pfeil, Abb. 4). Die gelbliche Bakterienkolonie wuchs rasch und konnte sich gegenüber anderen Mikroorganismen behaupten.

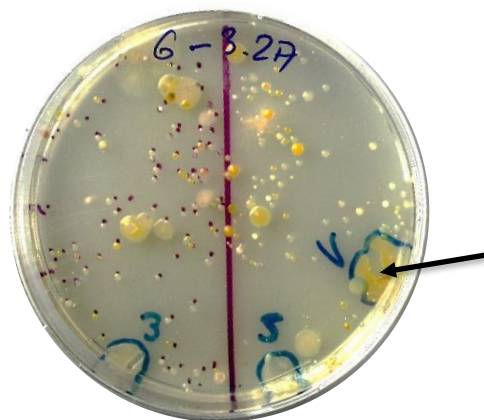


Abb. 4: Exemplarisches Beispiel einer mit Mikroorganismen bewachsenen Agarplatte nach 5 Tagen, hier: Borkeprobe 6-3-2A (6=Sammelzeitpunkt, 3=Probenbaum *Quercus petraea*; 2=Probenentnahme BHD; A=Verdünnungsreihe 1:10); Pfeil zeigt eine gelbliche und großflächige Bakterienkolonie.

### 3.3 Numerische Erhebung der Bakterien

Die numerische Erhebung der mit Bakterien bewachsenen Agarplatten wurde nach 5 Tagen durchgeführt. Bei einer zu hohen Kolonieanzahl wurde die Agarplatte in gleichmäßige Abschnitte unterteilt (schematisches Beispiel s. Abb. 5), die Kolonien eines Abschnitts gezählt und auf die Gesamtheit der Agarplatte bezogen.

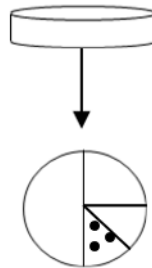


Abb. 5: Schematisches Beispiel einer Einteilung der Agarplatte in acht gleich große Abschnitte, mit Darstellung der Agarplatte im Seitenprofil (oben) und der Draufsicht (unten); Anwendung bei zu hoher Kolonieanzahl.

### 3.4 Charakterisierung der Bakterien

Zur Charakterisierung der Bakterienkolonien wurden diese in Reinkultur gebracht, sodass für die Untersuchungen zu den morphologischen und biochemischen Eigenschaften ausschließlich eine Bakterienart auf einer Agarplatte vorhanden war.

#### 3.4.1 Morphologische Untersuchung

Bei den ausgewählten Bakterien wurde die morphologische Untersuchung makroskopisch durchgeführt. Es fand eine Differenzierung hinsichtlich der Pigmentierung der Bakterienkolonien statt (weiß, bräunlich, cremefarben, orange, rot, purpurfarben oder gelb). Außerdem wurde die Kolonieform bestimmt, welche sich in rund, wurzelartig, unregelmäßig, filamentös oder spindelförmig unterscheiden ließ. Der Rand der Kolonien wurde mit ganzrandig, gewellt, gelappt, gekerbt, wurzelartig oder filamentös beschrieben. Auch in Bezug auf die Höhe wurde differenziert in: flach, erhaben, polsterförmig oder gebuckelt. Neben der Größe der Kolonien, von winzig, klein, bis mittelgroß oder groß, wurde auch die Struktur (glatt oder rau), das Aussehen (glänzend oder matt) und die Lichtabsorption bestimmt. Letzteres unterschied sich in opak, durchscheinend oder transparent.

#### 3.4.2 Biochemische Untersuchung - Gramfärbung

Die Zellform der Bakterien wurde im Rahmen der Gramfärbung bestimmt. Dabei wurde nach einem laborinternen Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Magel vorgegangen (Ablauf s. Tab. 6). Das in Reinkultur vorliegende Bakterienmaterial wurde mit einer sterilen Impföse auf einen Objektträger

gebracht und hitzefixiert. Nach den Färbeschritten wurden diese unter dem Mikroskop betrachtet und nach grampositiven und gramnegativen Bakterien differenziert.

Tab. 6: Laborinternes Protokoll der AG Magel (Universität Hamburg) zur Gramfärbung von Bakterien.

Schritt	Anleitung
1	Bakterienkolonien als dünnen Film auf Objektträger aufstreichen
2	Objektträger 2-3 Mal durch die Bunsenbrennerflamme zur Hitzefixierung ziehen
3	1 min. mit 0,5 % Kristallviolett (in H <sub>2</sub> O) färben; mit Wasser spülen
4	1 min. mit Lugolsche Lösung (1 %) einwirken lassen; mit Wasser spülen
5	Objektträger mit 95 % Ethanol waschen; mit Wasser spülen
6	1 min. mit 0,5 % Safraninlösung (in H <sub>2</sub> O) gegenfärben; mit Wasser spülen
7	Trocknung bei Raumtemperatur

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

Zur molekularbiologischen Bestimmung der ausgewählten antagonistischen Bakterienarten wurde nach Anleitung des DNA-Extraktionkits von Qiagen die DNA des jeweiligen Bakteriums extrahiert (Kap. 3.5.1). Anschließend wurde unter Verwendung spezifischer Primer (Kap. 3.5.2) der DNA-Abschnitt mittels Polymerasekettenreaktion (PCR - *polymerase chain reaction*) vervielfältigt (Kap. 3.5.3 u. Kap. 3.5.4) und das erhaltene PCR-Produkt mithilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen (Kap. 3.5.5). Bei erfolgreicher DNA-Extraktion wurden ausgewählte PCR-Produkte nach dem DNA-Aufreinigungskit von Qiagen aufgereinigt (Kap. 3.5.6) und zur Durchführung der Sequenzierung an die Firma MWG (Eurofins MWG GmbH) gesandt. Mit dem Dienstleistungsprogramm BLAST (Altschul et al., 1990) der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) konnten die erhaltenen Sequenzen mit den in deren Datenbanken hinterlegten Sequenzen verglichen und identifiziert werden.

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Kits von Qiagen mit Angabe der Bezeichnung und deren spezifischer Verwendung.

Bezeichnung	Firma	Verwendung
DNeasy Plant Extraction Kit	Qiagen	DNA-Extraktion
Taq PCR Core Kit	Qiagen	PCR
PCR Purification Kit	Qiagen	Aufreinigung der PCR-Produkte

#### 3.5.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der Bakterien-DNA erfolgte mithilfe des DNeasy Plant Extraktion Kits von Qiagen und ist mit Ausnahme des ersten Schritts, bei dem die Extraktion von Bakterien-DNA angepasst wurde, nach Herstellerangaben durchgeführt worden (Tab. 8). Hierfür wurden ausschließlich Bakterienkolonien genommen, die in Reinkultur vorlagen.

Bis zur Verwendung für die PCR wurde die extrahierte DNA bei 4 °C gelagert. Der DNA-Gehalt in der Extraktionslösung wurde mithilfe des Spectrophotometers Nanodrop 2000 bestimmt und sollte zwischen 1 und 50 ng liegen. Für die PCR wurden 0,5 µl Extrakt eingesetzt.

Tab. 8: Anleitung zur Extraktion der DNA mittels DNeasy Plant Extraction Kit (Qiagen), angepasst an die Extraktion von Bakterien-DNA.

Schritte	Anleitung
1	Bakterien-Kolonie in einem mit 100 µl Wasser gefülltem 1,5 ml Eppendorfer überführen
2	Zugabe von 600 µl AP1, vortexen, 10 min. 65 °C im Thermoschüttler (Zellyse)
3	Zugabe von 200 µl P3, vortexen; 5 min. -20 °C im Gefrierschrank (Ausfällung von Proteinen und Zuckern)
4	Überführung auf QiaSchredder-Säulen und Zentrifugation 2 min. bei 13000 rpm (Entfernung von Zelltrümmern)
5	500 µl Überstand (ohne Pellet) in 2 ml Eppendorfer überführen
6	Zugabe von 750 µl AW1 (mit Ethanol), sehr vorsichtig durch Drehen und Rollen mischen (DNA-Fällung)
7	650 µl der DNA-Lösung auf DNeasy-MiniSpinsäulen überführen und bei 8000 rpm 1 min. zentrifugieren (Bindung der DNA an die Säule)
8	Filtrat verwerfen; restliche DNA-Lösung auf die Säule geben und 1 min. bei 8000 rpm zentrifugieren
9	Filtrat verwerfen; Zugabe von 500 µl AW2, 30 sek. bei 8000 rpm zentrifugieren
10	Filtrat verwerfen; Zugabe von 500 µl AW2, 30 sek. bei 8000 rpm zentrifugieren (Waschen der DNA)
11	Filtrat verwerfen und Säule bei 13000 rpm 1 min. trocken zentrifugieren
12	Säule auf ein neuen 1,5 ml Eppendorfer setzen und 30-50 µl AE auf die Mitte der Säule geben, Inkubation 5 min. bei Raumtemperatur
13	Zentrifugation 1 min. bei 10000 rpm (Elution der DNA von der Säule)
14	Säule auf ein neuen 1,5 ml Eppendorfer setzen und 30-50 µl AE auf die Mitte der Säule geben; Inkubation 5 min. bei Raumtemperatur
15	Zentrifugation 1 min. bei 10000 rpm (Elution der DNA von der Säule)
16	Das erste und zweite DNA- Eluat bei 4 °C aufbewahren

### 3.5.2 Verwendete Primer

Der 16S-Bereich weist eine Gesamtlänge von ca. 1500 bp auf. Der Bereich, an dem der jeweilige Primer greift, ist in Abb. 6 dargestellt. Die Pfeile geben dabei die Amplifikationsrichtung an. Neben dem Primer-Paar B27f/805r (rote Pfeile), welches für die Identifizierung der Bakterienarten dieser Forschungsarbeit verwendet wurde, sind weitere Primer dargestellt, die für eine Amplifikation herangezogen werden können.

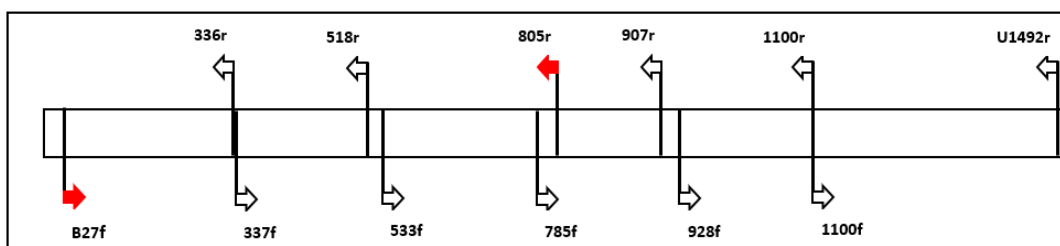


Abb. 6: Schematische Darstellung des 16S rRNA-Bereichs (Länge ca. 1500 bp), Markierungen der Primer und der Amplifikationsrichtung (Pfeile); rote Pfeile zeigen den Bereich, der vom Primer-Paar B27f/805r amplifiziert wird.

Zur Identifizierung der antagonistischen Bakterien wurden die Primer B27f (Heuer et al., 1997; James, 2010; Lagacé et al., 2004; Orphan et al., 2001; Weisburg et al., 1991) und 805r (Baker et al., 2003; James, 2010; Jaric et al., 2013) ausgewählt, die einen spezifischen Bereich des 16S rRNA-Gens mit einer Länge von ca. 750 Basenpaaren (bp) amplifizieren (Tab. 9).

Tab. 9: Primer zur Amplifikation eines spezifischen Bereichs des 16S rRNA-Gens von Bakterien mit Angabe der Sequenzlänge [bp], weiterer Informationen zur Primersequenz (GC=Guanin/Cytosin-Anteil; MW=Molekulargewicht (*molecular weight*); Tm=Schmelztemperatur (*melting temperature*)) und Referenzen.

Name	Primersequenz (5' → 3')	Sequenzlänge [bp]	Informationen	Referenz
B27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ca. 750	GC: 50 %; MW [g/mol]: 6148,0; Tm [°C]: 57,3	(Heuer et al., 1997; James, 2010; Lagacé et al., 2004; Orphan et al., 2001; Weisburg et al., 1991)
805r	GACTACCAGGGTATCTAATC		GC: 45 %; MW [g/mol]: 6101,0; Tm [°C]: 55,3	(Baker et al., 2003; James, 2010; Jaric et al., 2013)

### 3.5.3 Polymerasekettenreaktion

Mithilfe der PCR und unter Verwendung des Primer-Paares B27f/805r konnten die spezifischen DNA-Abschnitte der Bakterien vervielfältigt werden. Hierfür wurde das PCR-Kit von Qiagen (s. Tab. 7) eingesetzt. Als Grundlage für die PCR diente der Mastermix, dessen Zusammensetzung im Verhältnis gleich blieb, jedoch die Menge an die jeweilige Probenanzahl angepasst wurde (Grundrezept, Tab. 10).

Tab. 10: Zusammensetzung PCR-Mastermix für eine Probe 1x12 µl.

Bezeichnung des Bestandteils	Endkonzentration	Menge/Probe [µl]
Wasser, autoklaviert		7,775
Q- Solution	einfach	2,5
10x	einfach; beinhaltet 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1,25
dNTP	200 mM/ dNTP	0,25
Primer forward (f)	0,6 µM	0,075
Primer reverse (r)	0,6 µM	0,075
Taq ( <i>Thermus aquaticus</i> )	2,5 Einheiten/ Reaktion	0,075
Template	5-20 ng DNA/ µl	0,5-1

### 3.5.4 PCR-Bedingungen

Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des spezifischen DNA-Abschnitts wurden anhand der Eigenschaften des Primer-Paares und des zu vervielfältigen Bereichs (ca. 750 bp) festgelegt (s. auch Tab. 9). Die Zykluszahl im Thermocycler (Firma Biometra) variierte zwischen 36 und 39, wobei die Reaktionsschritte zwei bis vier dementsprechend wiederholt wurden (Tab. 11).

Tab. 11: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des 16S rDNA-Bereichs der Bakterienarten mittels Primer-Paar B27f/805r; zur Erhöhung der Zyklenzahl werden die Schritte zwei bis vier wiederholt (bis zu 39 Wiederholungen).

Reaktionsschritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	Anfangsdenaturierung	94	240
2	Denaturierung	94	30
3	Annealing	54	30
4	Elongation	72	35
5	Endelongation	72	420
6	Zyklusende	4	∞

### 3.5.5 Nachweis der DNA-Abschnitte mithilfe von Gel-Elektrophorese

Um die jeweilige PCR überprüfen zu können, wurden entsprechend konzentrierte Agarose-Gele (1,5-2,5 %) angefertigt (Tab. 12). Das Gel wurde mithilfe einer handelsüblichen Mikrowelle erwärmt und in eine Kammer mit entsprechendem Kamm für die Bildung der Pipettiertaschen gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde das Amplifikationsprodukt mit einer Menge von 2,5 µl aufgetragen. In einem vorherigen Schritt wurde dem PCR-Produkt ein geringer Anteil an Trägerpuffer (Loadingbuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin) beigefügt. Zur Ermittlung der Fragmentlänge wurde zusätzlich ein Marker aufgetragen (100 bp; 0,4 µl). Die Laufzeiten der Elektrophorese betragen 30 min. bei 2,5 % Agarose-Konzentration und einer Spannung von 135 V.

Tab. 12: Zusammensetzung des Agarose-Gels (1,5-2,5 %) für die Elektrophorese als Grundlage zur Darstellung des PCR-Produkts.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Konzentration	Firma
Agarose-Gel	Agarose	1,5 bzw. 2,5 %	Oxoid Deutschland GmbH
	TAE-0,5-Puffer	100 ml	Carl Roth GmbH+Co. KG
Marker		0,1 µg/µl	Fermentas O'Generuler™

Nach der Gel-Elektrophorese wurde dieses in ein 0,00015 %-iges Ethidiumbromid-Bad ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) gelegt, sodass sich das vorhandene PCR-Produkt einfärbte. Mittels UV-Licht (BIORAD Universal Hood II) konnten diese dokumentiert werden.

### 3.5.6 Aufreinigung und Sequenzierung

Bevor die DNA-Abschnitte der Bakterienarten sequenziert werden konnten, wurden diese aufgereinigt (Tab. 13). Beim Extraktionsverfahren auftretende Inhibitoren (z.B. Proteine oder Phenole), die eine Sequenzierung erschweren können, wurden auf diese Weise entfernt.

Nach dem Aufreinigen wurden die PCR-Produkte im Kühlschrank bei 4 °C verwahrt, bevor diese zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG versendet wurden. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde mithilfe des Programms BLAST der Datenbank NCBI durchgeführt.



Tab. 13: Anleitung zur Aufreinigung der DNA-Abschnitte mittels PCR-Purification Kit (Qiagen).

Schritte	Anleitung
1	PCR-Produkt und das fünffache Volumen PB zusammenmischen
2	Probe auf die Säule geben
3	30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren
4	Filtrat erneut auf die Säule geben
5	30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren
6	Filtrat verwerfen
7	600 µl PE mit Ethanol (Waschpuffer) dazugeben
8	30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren
9	Filtrat verwerfen
10	Erneuter Waschschrift mit 600 µl PE
11	30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren
12	Filtrat verwerfen
13	Die Säule 1 min bei 13000 rpm trocken zentrifugieren
14	Die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfer setzen
15	Zugabe von 20-35 µl EB (je nach Stärke der Ausgangsbande)
16	2 min Inkubation bei Raumtemperatur
17	1 min bei 10000 rpm zentrifugieren
18	Aufbewahrung bei 4 °C

### 3.6 Herstellung der Medien

Das Pepton-Medium wurde für die Kultivierung von Bakterien-Kolonien und das Hefeextrakt-Medium (Rezepturen der AG Magel, Universität Hamburg) für das Anlegen der Dualkulturen und den Holzschutzmitteltest herangezogen (Zusammensetzung s. Tab. 3). Die Medien wurden mit destilliertem Wasser und einer Menge von 750-1000 ml in Glasflaschen angesetzt und anschließend für 20 min. bei 121 °C mittels Autoklav (Systec 3870 ELV) sterilisiert. Nach Abkühlen der Flüssigkeiten auf ca. 60 °C wurden diese unter sterilen Bedingungen in 9 cm breite Einweg-Petrischalen gegossen (Menge ca. 20-30 ml). Die entsprechende Anzahl von Agarplatten wurde für jede Testreihe wenige Tage vor Versuchsbeginn vorbereitet, sodass stets gleiche Voraussetzungen für jeden Versuch gegeben waren. Für die jeweiligen Flüssigmedien wurde bis auf die Zugabe des Agars in gleicher Weise vorgegangen. Die Flüssigmedien verblieben in den Glasflaschen und kühlten unter sterilen Bedingungen auf Raumtemperatur (RT) ab, bevor diese verwendet wurden.

### 3.7 Aufbewahrung der Bakterien

Die Aufbewahrung der Bakterienkolonien erfolgte in Anlehnung an Schreiner (2008). Das in Reinkultur vorliegende Bakterium wurde mithilfe eines sterilen Zahnstochers in 2 ml Pepton-Flüssigmedium (Zusammensetzung s. Tab. 3) überführt und für ca. 24 h bei 28 °C im Schüttler bei 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden 700 µl dieser Lösung in ein 2 ml Eppendorfer Tube überführt und 300 µl steriles Glycerol (30 %) hinzugefügt. Die Tubes wurden verschlossen und bei -20 °C verwahrt.

Zudem wurden die Bakterien-Kulturen alle drei Monate auf frische Pepton-Agarplatten überführt und im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Hierfür wurden die jeweiligen Bakterienkolonien unter der Impfbank mittels steriler Impföse auf einer Pepton-Agarplatte ausgestrichen. Durch das Verschließen der Petrischalen mit einem Parafilmstreifen (BEMIS) konnte ein guter Sauerstoffaustausch gewährleistet und Kontamination durch andere Mikroorganismen verhindert werden.

### **3.8 Wachstumskurven**

Für die ausgewählten antagonistischen Bakterienarten wurden mithilfe von photometrischen Messungen Wachstumskurven erstellt. Die Wachstumskurven können in folgende Phasen unterteilt werden und charakterisieren das Kolonie-Wachstum bis zum Erreichen der stationären Phase:

- Lag-Phase: sogenannte "Anlaufphase", in der sich das Bakterium an das Nährmedium anpasst
- Log-Phase: das Bakterium hat sich optimal an das Nährmedium angepasst; es kommt zur exponentiellen Vermehrung
- Stationäre Phase: neue und absterbende Bakterien sind in einem Gleichgewicht
- Absterbephase: Nährstoffe im Medium sind nahezu aufgebraucht, sodass die Bakterien verhungern oder an den Ausscheidungsprodukten ihres eigenen Stoffwechsels sterben.

#### **3.8.1 Photometrische Messungen**

Für die photometrischen Messungen wurden die ausgewählten Bakterienarten aus dem gefrorenen Zustand (Aufbewahrung in Pepton-Flüssigmedium bei -20 °C) herangezogen. Unter der Impfbank wurden diese aufgetaut, um anschließend 20 µl mittels Pipette in die autoklavierten Bechergläser mit je 250 ml Pepton-Flüssigmedium Inhalt zu überführen. Dabei wurde ein Becherglas ohne Zugabe von Bakterienkolonien für die Kontrollmessungen belassen. Die mit und ohne Bakterienlösung beimpften Bechergläser wurden mit herkömmlicher Alufolie verschlossen und in einen Schüttler (Firma Edmund Bühler) bei 100 rpm und 27 °C unter Lichtausschluss gestellt. Für die täglichen Messungen am Photospektrometer (Firma Spectronic Camspec Ltd) wurden 1000 µl Probe mittels Pipette entnommen und in Einmalküvetten überführt. Alle Messungen konnten mit einer optischen Dichte (OD) von 600 durchgeführt werden (Hoster, 2003).

### 3.9 Dualkulturtestreihe

#### 3.9.1 Vordualtests

Um die Vielzahl der in Reinkultur vorgelegenen Bakterienkolonien auf ihre antagonistischen Eigenschaften hin zu untersuchen, wurden in Anlehnung an Oppermann (1951) erste Dualkulturtests durchgeführt. Dabei wurden die Schadpilze *Trametes versicolor* und *Daedalea quercina* als Gegenspieler ausgewählt. In einer Petrischale waren Schadpilz und zu testendes Bakterium auf HA-Medium konfrontiert worden, um das Wachstumsverhalten des jeweiligen Mikroorganismus beobachten zu können. Nach Vorlage wurde der Bakterium-Streifen mittels steriler Impföse auf das Medium aufgetragen. Das Pilzmycel-Inokulum wurde mit der Rückseite einer sterilen Glaspipette möglichst vom Rand der vorkultivierten Pilz-Agarplatte ausgestanzt und auf dem Medium positioniert (Abb. 7).

Anhand der Vordualtestreihe konnte eine Auswahl antagonistischer Bakterienkolonien getroffen werden, die sich im Rahmen der Dualtestreihe gegenüber weiteren sieben Schadpilzen behaupten mussten.

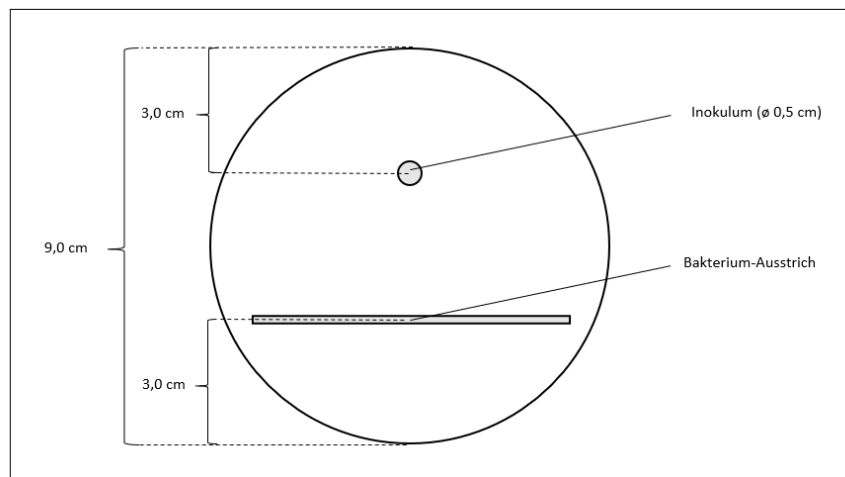


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Dualkultur; Draufsicht einer Petrischale im Konfrontationstest mit Pilzinokulum ( $\varnothing$  0,5 cm) und Bakterium in Form eines Streifens.

#### 3.9.2 Dualtests

Die Prüfpilze und die ausgewählten Bakterienkolonien wurden 10-14 Tage im Dunkeln bei RT kultiviert, sodass diese zu Versuchsbeginn in Reinkultur vorlagen. Das zu testende Bakterium wurde mittels steriler Impföse in Form eines Streifens auf die Agarplatte aufgebracht und dem jeweiligen Prüfpilz in Form eines Pilzmycel-Inokulums ( $\varnothing=5$  mm) gegenübergestellt (Abb. 7). Dabei wurde die gleiche Vorgehensweise wie bei den Vordualtests gewählt. Je Bakterium und Prüfpilz fanden drei Wiederholungen statt. Zu jedem Bakterium und Prüfpilz wurden Kontrollen (ohne den jeweiligen Gegenspieler) mit einbezogen, um die Dualkulturen zu jedem Zeitpunkt der Versuchsreihe mit diesen vergleichen zu können. Die Prüfplatten wurden während des Testzeitraums im Dunkeln bei RT belassen. Eine tägliche Kontrolle fand in Form von Markierungen auf der Unterseite der Petrischale statt, indem die Mycelausbreitung seitens des

Prüfpilzes umrandet wurde. Diese Markierungen wurden von Hand durchgeführt. Das Ende der Versuchsreihe wurde durch das Bewachsen des Prüfpilzes an den äußeren Rand der Petrischale beschrieben (gegenüberliegende Seite des Bakterienstreifens).

### Auswertung Dualtestreihe

Die Dualkulturen wurden durchgeführt, um herauszufinden, wie sich der jeweilige Schadpilz in Konfrontation mit verschiedenen Bakterienkolonien verhält. Dabei wurde das tägliche Mycelwachstum „hin“ (in Richtung des Bakteriums) und „weg“ (entgegengesetzte Richtung) in [mm] gemessen. Ausschließlich die „hin“-Richtung wurde mit dem Mycelzuwachs der jeweiligen Pilzkontrolle in gleicher Wachstumsrichtung verglichen und für die Ermittlung des Inhibitionsfaktors  $P$  [%] mit der Formel (i) benötigt (Jeyaseelan & Jashothan, 2012). Hierbei wurde das Wachstum in [mm] des Prüfpilzes der Dualtest-Petrischale ( $R2$ ) mit dem Prüfpilz ohne Gegenspieler ( $R1$ ) zum Ende der jeweiligen Testreihe herangezogen und ins Verhältnis gebracht, ausgedrückt in Prozent (s. Grafik Abb. 8).

$$P \text{ [%]} = \frac{(R1 - R2)}{R1} * 100 \quad (i.)$$

Der Inhibitionsfaktor gibt den Zusammenhang zwischen dem ungestörten Wachstum des Prüfpilzes (Kontrolle) mit dem durch das Bakterium verursachte veränderte Wachstum des Prüfpilzes wider.

Je höher  $P$  [%] desto stärker die hemmende Wirkung der jeweiligen Bakterienart bzw. je niedriger  $P$  [%] desto fördernder wirkte das Bakterium auf das Wachstum des Prüfpilzes.

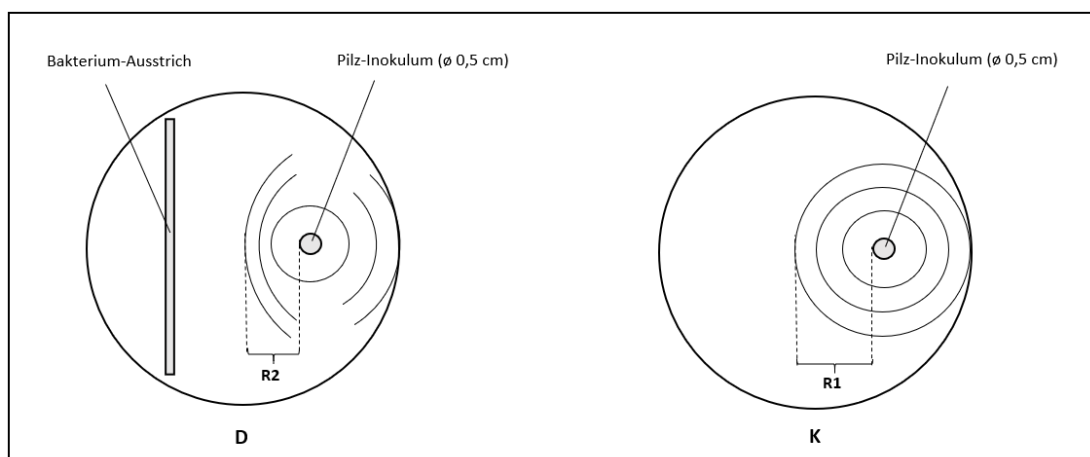
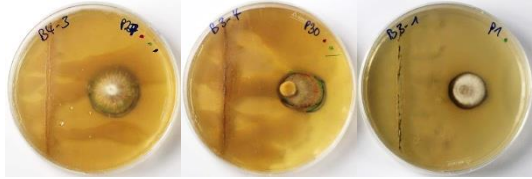
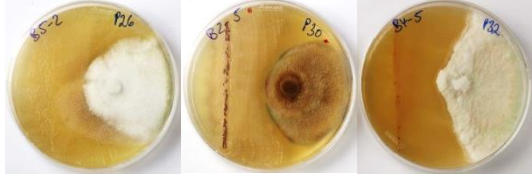
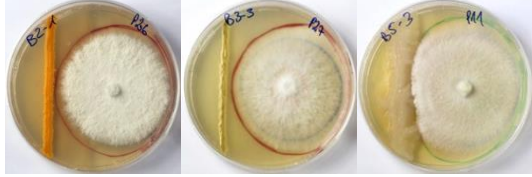



Abb. 8: Schematische Darstellung einer Dualkultur (D) mit dem Mycelwachstum  $R2$  [mm] (hier Beispiel einer Hemmung durch das Bakterium) und der Kontrolle (K) mit dem Mycelwachstum  $R1$  [mm], zur Ermittlung des Inhibitionsfaktors  $P$  [%], s. Formel (i).

Zudem wurde eine optische Einteilung der Dualkulturen in Inhibitionsklassen (Klasse I-IV) nach Versuchsende vorgenommen (Tab. 14). Zur Klasse I wurden Bakterien-Isolate gezählt, die sich rasch auf der Agarplatte vermehrten und den Schadpilz in ihrem Wachstum stark hemmten. Die Klasse II implizierte Antagonisten, die das Wachstum des Schadpilzes beeinflussten und diesen zurückdrängten. Der Klasse III wurden Bakterien-Kulturen zugeteilt, die sich zu Beginn gut behaupten, jedoch im Laufe des Versuchszeitraums vom Schadpilz zum Teil überwachsen ließen. Bakterienarten, die langsam wuchsen und keine Inhibition gegenüber des Schadpilzes aufwiesen, wurden der Klasse IV zugeordnet.

Tab. 14: Darstellung der Inhibitionsklassen I-IV mit Dualkulturen als exemplarische Beispiele und Beschreibung der Klassen.

Dualkulturen	Klasse	
	I (++) starke Inhibition	Antagonist verbreitet sich rasch; Schadpilz stellt Wachstum ein
	II (+) gute Inhibition	Annäherung der Konkurrenten, aber ohne Überwachsen des Antagonisten durch den Schadpilz
	III (-) schwache Inhibition	Antagonist wird mit der Zeit nur zum Teil vom Schadpilz überwachsen
	IV (--) keine Inhibition	Antagonist wächst langsam und wird vom konkurrierenden Schadpilz überwachsen

### 3.10 Abbauversuche

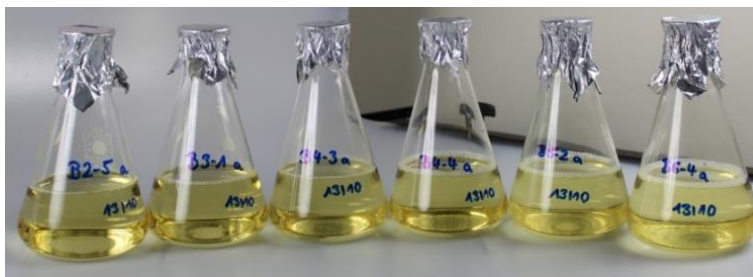
Für die Testreihe in Anlehnung an die DIN EN 113 (1996-11) und DIN EN 152 (2011) wurden Versuche mit zwei Bakterien-Lösungen „Gemisch A und B“ durchgeführt. Die Prüfkörper der Holzarten *Pinus sylvestris* und *Fagus sylvatica* wurden zum einen mittels Bakterien-Gemisch A gegenüber den Prüfpilzen *Trametes versicolor* und *Coniophora puteana* und zum anderen mittels Bakterien-Gemisch B gegenüber des Bläuepilzes *Aureobasidium pullulans* getestet. Letzteres Bakterien-Gemisch wurde außerdem für die Testreihe mit den Prüfkörpern der weißblühenden Rosskastanie *Aesculus hippocastanum* herangezogen. Dabei wurde das Gemisch gegenüber den zum typischen Schadkomplex gehörenden

Pathogenen *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus* einhergehend mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* getestet.

Nebst vorkultivierter HA-Prüfplatten (mit den Prüfpilzen bewachsen), ist als Versuchsstart der Testreihe das Erreichen der stationären Phase, an dem das jeweilige Bakterium einen vitalen Zustand im Flüssigmedium erreicht hatte, gewählt worden.

### 3.10.1 Gewinnung der Bakterienlösung

Die für Bakteriengemisch A und B ausgewählten Antagonisten wurden jeweils, d.h. getrennt voneinander, in Pepton-Flüssigmedium kultiviert (Abb. 9) und täglich photospektrometrisch bei einer OD 600 bis zum Erreichen der stationären Phase (Plateau der Messkurve) gemessen (s. auch Kap.3.8).



#### Gemisch A

- B2-5 *Pseudomonas moraviensis*
- B3-1 *Viridibacillus arenosi*
- B4-3 *Bacillus pumilus*
- B4-4 *Bacillus subtilis*
- B5-2 *Bacillus mycoides*
- B6-4 *Stenotrophomonas rhizophila*



#### Gemisch B

- B2-5 *Pseudomonas moraviensis*
- B4-3 *Bacillus pumilus*
- B4-4 *Bacillus subtilis*
- B4-9 *Pseudomonas fluorescens*
- B6-4 *Stenotrophomonas rhizophila*

Abb. 9: Für das Bakteriengemisch A und B präparierte Erlenmeyerkolben mit Pepton-Flüssigmedium und dem jeweiligen Bakterium.

Unter der Impfbank wurden die einzelnen Bakterien-Flüssigkulturen zu dem jeweiligen Gemisch A bzw. B zusammengefügt und standen für die Versuchsreihe als biologische Holzschutzmittellösungen zur Verfügung.

### 3.10.2 Abbauversuche in Anlehnung an DIN EN 113

Für die biologische Holzschutzmitteltestreihe wurden die Pk, wie in Kap. 2.4 beschrieben, vorbereitet. Um die Sterilität der Pk gewährleisten zu können, wurden diese nach Beschriftung in Einweggläsern bei 121 °C für 30 min. autoklaviert (VE-150, Systec GmbH) und anschließend für 18-22 h im Autoklav belassen, um einer Kondensation am Glasrand bei zu rascher Abkühlung vorzubeugen. Unter der

Impfbank wurden die sterilen Pk für 5 min. in das jeweilige Bakterien-Gemisch getaucht und anschließend mit einem Metallring auf die vorbereiteten HA-Platten gebracht. Durch den Metallring konnte eine direkte Berührung der Prüfkörper mit dem Nährmedium bzw. Pilzmycelrasen verhindert werden.

Zur Ermittlung der Lösungsaufnahmen wurden zusätzlich acht Pk der jeweiligen Holzart für 5 min. in die biologische Lösung gebracht, danach gewogen und schließlich für 18-22 h im Trockenschrank bei 103 °C darrgetrocknet. Mithilfe des Pk-Gewichts nach Tränkung und Darrtrocknung konnte die Ausbaufeuchte (s. Formel (ii.)) und mittlere Lösungsaufnahme (s. Formel (iv)) bestimmt werden.

Je zu untersuchendem Element wurden vier Wiederholungen gewählt, wobei stets zwei Pk auf eine Agarplatte aufgebracht wurden (Bsp. s. Abb. 10). Die präparierten Agarplatten wurden mittels Parafilmstreifen so verschlossen, dass ein Sauerstoffaustausch während der Prüfungsdauer von 16 Wochen gewährleistet werden konnte. Anschließend wurden die Agarplatten in einer Klimakammer bei einer relativen Luftfeuchte von 70 +/- 5 % und einer Temperatur von 22 +/- 2 °C im Dunkeln inkubiert. In Abständen von vier Wochen wurden die jeweiligen Pk ausgebaut und beurteilt (Übersicht s. Tab. 15).

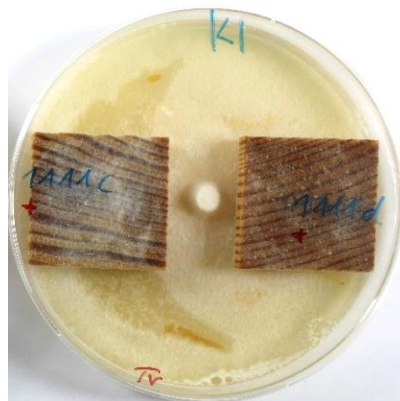


Abb. 10: Exemplarische Darstellung von zwei Pk der Holzart *Pinus sylvestris* (Kiefer) auf einer mit dem Prüfpilz *Trametes versicolor* bewachsenen Agarplatte, behandelt mit dem Bakterien-Gemisch A; 1. Versuchsausbau (nach 4 Wochen).

### Roskastanien-Komplexkrankheit

Aufgrund der neuen Roskastanien-Komplexkrankheit, die von Müller-Navarra (2019) untersucht worden ist, wurden die Schadpilze *Pleurotus ostreatus* und *Flammulina velutipes* gemeinsam mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* für eine Testreihe mit dem Bakteriengemisch B herangezogen. In Form einer Multiplexkultur wurde das Bakterien-Pathogen in der Mitte der Petrischale (Streifen) und die Schadpilz-Inokula jeweils mit gleichem Abstand zum Bakterium an den Seiten aufgebracht (Abb. 11).

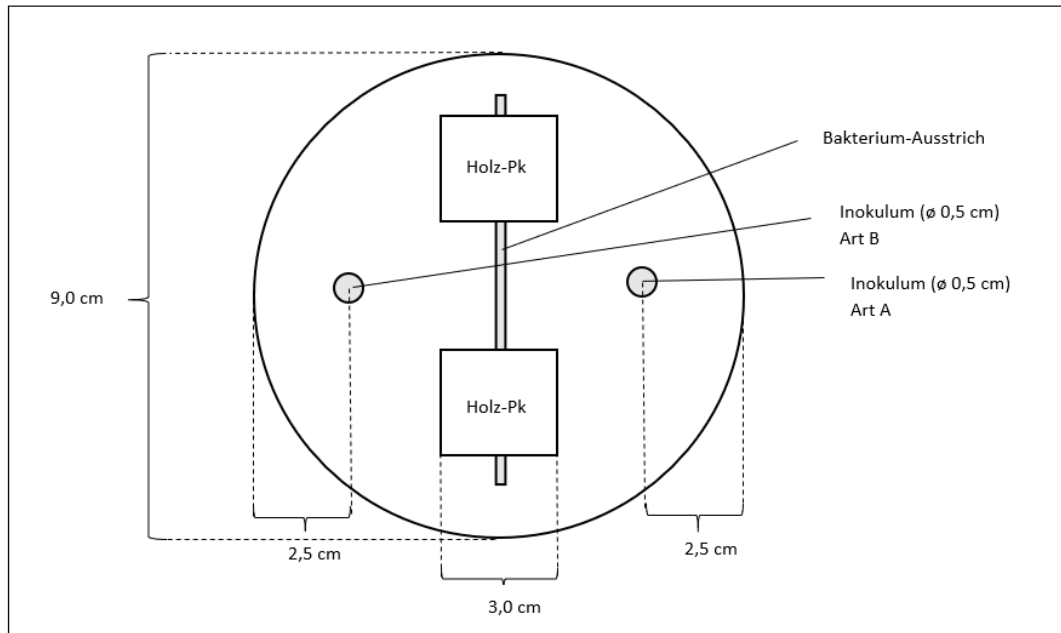


Abb. 11: Schematische Darstellung einer Multiplexkultur; Testreihe mit Pilzinokula ( $\varnothing$  0,5 cm) Art A=*Pleurotus ostreatus* und B=*Flammulina velutipes*, dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Streifen) und den Holz-Prüfkörpern (Pk).

Nach Vorkultivierung der Multiplexkultur (Schadpilze und Bakterium) wurden die Holz-Pk, wie bei der Testreihe mit Bakterien-Gemisch A, auf die Agarplatte gebracht. Die Prüfdauer belief sich auf zwölf Wochen und beinhaltete drei Ausbauzeitpunkte (Tab. 15).

Tab. 15: Übersicht über die verwendeten Prüfkörper (Pk), deren Anzahl, den Einsatz des jeweiligen Bakterien-Gemischs und der Angabe der Testdauer und Ausbau-Zeitpunkte.

Holzart	Anzahl der Pk	Bakterien-Gemisch	Prüfpilz bzw. Prüfbakterium	Ausbau	Testdauer gesamt
<i>Pinus sylvestris</i>	128	Gemisch A	<i>Trametes versicolor</i>	alle 4 Wochen	16 Wochen
			<i>Coniophora puteana</i>		
			ohne Pilz (Kontrolle)		
<i>Fagus sylvatica</i>	128	Gemisch A	<i>Trametes versicolor</i>	alle 4 Wochen	16 Wochen
			<i>Coniophora puteana</i>		
			ohne Pilz (Kontrolle)		
<i>Aesculus hippocastanum</i>	96	Gemisch B	<i>Pleurotus ostreatus</i> / <i>Flammulina velutipes</i> / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	alle 4 Wochen	12 Wochen



Auswertung Abbauversuche

Zu jedem Ausbaupunkt wurden Kontroll-Pk mit einbezogen, um einen Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Pk anstellen zu können. Nach dem Ausbau der Pk, wurden diese sofort gewogen (Ermittlung der Holzfeuchte MC, s. Formel (ii)) und anschließend für 18-22 h im Trockenschrank bei 103 °C darrgetrocknet.

$$MC [\%] = \left( \frac{m3 - m1}{m1} \right) * 100 \quad (\text{ii.})$$

Nach Abkühlen der Pk für ca. 2 h im Exsikkator wurden diese gewogen, um mithilfe des Anfangsdarrgewichts und des Darrgewichts nach jeweiliger Versuchszeit (Enddarrgewicht) den Masseverlust ML (Formel (iii)) ermitteln zu können.

$$ML [\%] = \frac{(m1 - m2)}{m1} * 100 \quad (\text{iii.})$$

MC	Holzfeuchte	[%]
ML	Masseverlust	[%]
m1	Darrgewicht (Versuchsstart)	[g]
m2	Enddarrgewicht (Versuchsende)	[g]
m3	Prüfkörpergewicht nach Versuchsausbau	[g]
m4	Prüfkörpergewicht nach Eintauchen	[g]

Zusätzliche Pk der Holzarten Buche, Kiefer und Rosskastanie (je n=8) wurden mit der biologischen Holzschutzlösung getränkt und die Lösungsaufnahmen in [kg/m<sup>3</sup>] ermittelt (Formel (iv)).

$$Retention [kg/m^3] = \frac{(m1 - m4)}{V} * 100 \quad (\text{iv.})$$

Zur Kontrolle, ob die Bakterienkolonien nach dem Einsatz mit der Holzschutzmittellösung noch auf den Pk vorhanden waren, wurden diese stichprobenartig nach dem Ausbau und Wiegen auf eine frische Agarplatte gelegt und nach 2-3 Tagen auf ein Wachstum von Mikroorganismen hin überprüft.

### Statistische Untersuchung des Masseverlustes

Die biologischen Holzschutzmittellösungen ließen sich in ihrer Wirksamkeit zumindest in bestimmten Dimensionen auch statistisch untersuchen. Dafür wurde ein Tukey-Test angewendet (Tukey, 1949), der alle möglichen Faktorkombinationen vergleicht. Damit waren Aussagen über die Unterschiede in den Mittelwerten der Faktorkombinationen möglich. Die Funktion TukeyHSD, implementiert in dem stats Paket in „R“, erlaubte eine korrekte Berechnung der Konfidenzintervalle und der p-Werte.

### 3.10.3 Abbauversuche in Anlehnung an DIN EN 152

Für die Testreihe in Anlehnung an die Norm DIN EN 152 (2011) stand der Bläue- und Normpilz *Aureobasidium pullulans* der Arbeitsgruppe von Dr. Melcher des Thünen-Instituts in Hamburg als frisch überimpfte Kultur zur Verfügung.

Tab. 16: Übersicht über die verwendeten Prüfkörper (Pk), die Anzahl und der Testdauer mit den Ausbau-Zeitpunkten.



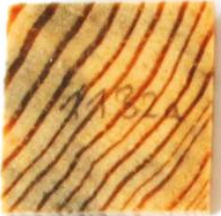

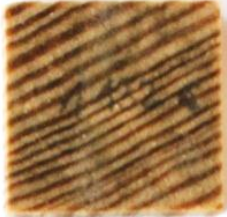

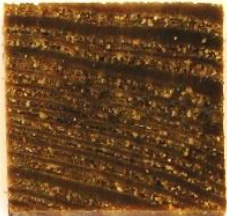
Holzart	Anzahl der Pk	Bakterien-Gemisch	Prüfpilz	Ausbau	Testdauer gesamt
<i>Pinus sylvestris</i>	32	Gemisch B	<i>Aureobasidium pullulans</i>	alle 4 Wochen	12 Wochen
<i>Fagus sylvatica</i>	32	Gemisch B	<i>Aureobasidium pullulans</i>	alle 4 Wochen	12 Wochen

Im Rahmen des Bläuetests wurde gleichermaßen wie bei der Testreihe in Anlehnung an DIN EN 113 (1996-11) vorgegangen. Auf die mit dem Bläuepilz *A. pullulans* vorkultivierten Petrischalen wurden die mit dem Bakteriengemisch B beimpften Pk (mit Ausnahme der Kontrollen) über 12 Wochen getestet (Tab. 16). Auch bei dieser Testreihe wurden 4 Wiederholungen angesetzt. Dabei fand nach vier, acht und zwölf Wochen eine Bewertung der Pk-Oberfläche statt.

Auswertung Bläuetest

Die Beurteilung der Pk wurde mithilfe eines Bonitierschemas vorgenommen (Tab. 17). Zudem wurde der Masseverlust [%] über den Versuchszeitraum mitbestimmt (s. Formel (ii)).

Tab. 17: Bonitierschema der durch den Prüf- und Bläuepilz *A. pullulans* verursachten Verfärbungen an Prüfkörpern (Pk)

Buche Pk	Kiefer Pk	Bonitierung
	-	1=gar nicht bis wenig verfärbt
		2=wenig verfärbt, an vereinzelten Bereichen mehr
		3=Verfärbung fast über den kompletten Pk
		4=deutlich dunkle Verfärbung des kompletten Pk

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung der Bakterien

Um Isolate von Mikroorganismen zu erhalten, wurden in Form von Freilandversuchen stets auf gleiche Weise und unter sterilen Bedingungen Proben der Borke unterschiedlicher Laub- und Nadelbäume genommen. Dies geschah über das Jahr 2014 zu sechs verschiedenen Sammelzeitpunkten (Tab. 18).

Tab. 18: Sammelzeitpunkte 1-6 mit Angabe des Probenursprungs und der Anzahl der sich ergebenden Borkeproben.

Sammelzeitpunkt	Datum	Baumarten	Anzahl der Borkeproben
1	01.05.2014	verschiedene	23
2	14.07.2014	<i>Aesculus hippocastanum</i>	21
3	21.07.2014	<i>Aesculus hippocastanum</i>	18
4	12.08.2014	<i>Tilia platyphyllos</i>	9
5	09.09.2014	<i>Tilia platyphyllos</i>	9
6	12.12.2014	verschiedene	8
Gesamt			88

### 4.2 Numerische Erhebung

Die Proben der Borke wurden nach einem bestimmten Verfahren behandelt (Kap. 3.1), um anschließend eine numerische Erhebung durchführen zu können. Dabei wurde die Probe auf Pepton-Agarplatten mit und ohne Verdünnungen aufgebracht (Kap. 3.2), nach 5 Tagen ausgewertet (Kap. 3.3) und zusammengefasst (Tab. 19).

Die Kolonienanzahl fiel bei den verschiedenen Baumindividuen und Probennahmen (1=Stammfuß; 2=BHD; 3=junger Ast) sehr unterschiedlich aus. Bei den Verdünnungen 1:100 war die Anzahl an Kolonien auf den Agarplatten gering, insbesondere zum Sammelzeitpunkt 3 (21.07.2014). Die Proben von den Borken der unter der Rosskastanien-Komplexkrankheit leidenden Baumindividuen wiesen hingegen eine hohe Anzahl von Bakterienkolonien auf (Sammelzeitpunkt 2; 14.07.2014). Innerhalb der einzelnen Probenentnahmen eines Baumindividuums (X.1- X.3) konnten größtenteils keine wiederkehrenden Koloniezahlen ermittelt werden. Diese wiesen stets Unterschiede in der Anzahl der Kolonien auf. Anhand z.B. der Koloniefarbe und -größe konnte eine hohe Vielfalt an Bakterienkolonien auf den Agarplatten festgestellt werden. Es gab Proben, die auf der Agarplatte sehr ähnlich aussehende Bakterienkolonien aufwiesen, z.B. cremefarbende Kolonien (s. Abb. 12).

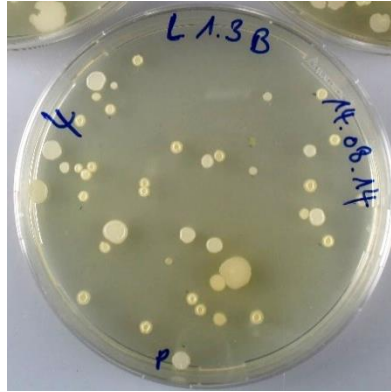


Abb. 12: Pepton-Agarplatte (P) mit ähnlich auftretenden Bakterienkolonien der Astprobe (1.3) einer Sommerlinde (*Tilia platyphyllos*) zum Sammelzeitpunkt 4 (14.08.2014).

Auf den Pepton-Agarplatten der Borke-Extrakte der Sommerlinde (Lfd.Nr.63-80; Tab. 19) war eine gleichmäßige Anzahl von Mikroorganismen zu erkennen. Im Vergleich dazu kam es bei den Proben der Gattung *Aesculus* untereinander zu großen Schwankungen der Mikroorganismen-Anzahl (Lfd.Nr.24-62).

Die Borke-Extrakte der Nadelbäume wiesen ein geringes Mikroorganismen-Vorkommen auf, bis auf die Proben von *Juglans nigra* (Lfd.Nr.4 u.5) und die Probe im Bereich des Stammfußes der Europäischen Lärche *Larix decidua* (Lfd.Nr.6), außerdem die Proben von *Gingko biloba* (Lfd.Nr.22 u.23). Das zahlenmäßige Vorkommen der Mikroorganismen auf den Pepton-Agarplatten der *Robinia pseudoacacia* war sehr hoch und spiegelte sich auch in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 wider (Lfd.Nr.81-83).

Die Koloniezahl auf 1 cm<sup>2</sup> Borke wurde am Beispiel der 1:10-Verdünnung berechnet (bezogen auf 1000 µl Probe: Koloniezahl\*20\*10) und verdeutlicht noch einmal die Unterschiede der Mikroorganismen-Anzahl innerhalb der Borke-Isolate.

Tab. 19: Ergebnisse der numerischen Erhebung der Borkeproben auf Pepton-Agarplatten mit Angabe des Sammelzeitpunktes (Datum), den jeweiligen Verdünnungen (bzw. ohne Verdünnung) und der Probennahme mit Herkunft: 1.1= im Bereich des Stammfußes, 1.2= im Brusthöhenbereich (BHD) und 1.3= Rinde 1-2-jähriger Äste; Koloniezahlberechnung auf 1 cm<sup>2</sup> Borke der 1:10-Verdünnung.

Datum	Lfd. Nr.	Probename/ Herkunft	Ohne Verdünnung	Verdünnung 1:10 / Koloniezahl auf 1cm <sup>2</sup> Borke		Verdünnung 1:100
15.05.2014	1	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.1	53	3	600	0
	2	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.2	19	2	400	1
	3	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.3	130	24	4800	52
	4	<i>Juglans nigra</i> 1.1	113	35	7000	12
	5	<i>Juglans nigra</i> 1.2	600	114	22800	13
	6	<i>Larix decidua</i> 1.1	260	156	31200	38
	7	<i>Larix decidua</i> 1.2	1	1	200	0
	8	<i>Pinus nigra</i> 1.1	36	14	2800	0
	9	<i>Pinus nigra</i> 1.2	5	1	200	0
	10	<i>Pinus sylvestris</i> 1.1	38	0	0	0
	11	<i>Pinus sylvestris</i> 1.2	0	0	0	0

	12	<i>Robinia pseudoacacia</i> 1.1	109	12	2400	1
	13	<i>Robinia pseudoacacia</i> 1.2	380	70	14000	3
	14	<i>Robinia pseudoacacia</i> 1.3	156	93	18600	5
	15	<i>Pseudotsuga menziesii</i> 1.1	85	9	1800	0
	16	<i>Pseudotsuga menziesii</i> 1.2	14	1	200	0
	17	<i>Quercus petraea</i> 1.1	19	13	2600	4
	18	<i>Quercus petraea</i> 1.2	0	0	0	0
	19	<i>Quercus robur</i> 1.1	10	2	400	0
	20	<i>Quercus robur</i> 1.2	28	3	600	0
	21	<i>Quercus robur</i> 1.3	96	6	1200	0
	22	<i>Ginkgo biloba</i> 1.1	362	47	9400	6
	23	<i>Ginkgo biloba</i> 1.2	280	38	7600	4
14.07.2014	24	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.1	240	51	10200	18
	25	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.2	75	7	1400	1
	26	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.3	1040	37	7400	4
	27	<i>Aesculus hippocastanum</i> 2.1	2400	380	76000	15
	28	<i>Aesculus hippocastanum</i> 2.2	10	0	0	0
	29	<i>Aesculus hippocastanum</i> 2.3	1200	124	24800	11
	30	<i>Aesculus hippocastanum</i> 3.1	5600	960	192000	157
	31	<i>Aesculus hippocastanum</i> 3.2	50	80	16000	5
	32	<i>Aesculus hippocastanum</i> 3.3	13	0	0	0
	33	<i>Aesculus hippocastanum</i> 4.1	220	24	4800	0
	34	<i>Aesculus hippocastanum</i> 4.2	120	17	3400	0
	35	<i>Aesculus hippocastanum</i> 4.3	800	92	18400	10
	36	<i>Aesculus hippocastanum</i> 5.1	Ca. 50000	5000	1000000	520
	37	<i>Aesculus hippocastanum</i> 5.2	35	0	0	0
	38	<i>Aesculus hippocastanum</i> 5.3	1680	220	44000	31
	39	<i>Aesculus hippocastanum</i> 6.1	400	33	6600	3
	40	<i>Aesculus hippocastanum</i> 6.2	30	3	600	13
	41	<i>Aesculus hippocastanum</i> 6.3	170	8	1600	0
	42	<i>Aesculus hippocastanum</i> 7.1	640	50	10000	3
	43	<i>Aesculus hippocastanum</i> 7.2	38	0	0	0
	44	<i>Aesculus hippocastanum</i> 7.3	400	28	5600	2
21.07.2014	45	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.1	35	1	200	0
	46	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.2	3	0	0	0
	47	<i>Aesculus hippocastanum</i> 1.3	25	1	200	0
	48	<i>Aesculus hippocastanum</i> 2.1	27	3	600	0
	49	<i>Aesculus hippocastanum</i> 2.2	8	0	0	0
	50	<i>Aesculus hippocastanum</i> 2.3	280	20	4000	0
	51	<i>Aesculus hippocastanum</i> 3.1	146	1	200	0
	52	<i>Aesculus hippocastanum</i> 3.2	17	2	400	0
	53	<i>Aesculus hippocastanum</i> 3.3	216	5	1000	2
	54	<i>Aesculus hippocastanum</i> 4.1	56	3	600	0
	55	<i>Aesculus hippocastanum</i> 4.2	0	0	0	0
	56	<i>Aesculus hippocastanum</i> 4.3	2	0	0	0
	57	<i>Aesculus hippocastanum</i> 5.1	1	1	200	0
	58	<i>Aesculus hippocastanum</i> 5.2	50	4	800	0
	59	<i>Aesculus hippocastanum</i> 5.3	200	8	1600	0

	60	<i>Aesculus hippocastanum</i> 6.1	56	0	0	0
	61	<i>Aesculus hippocastanum</i> 6.2	1	0	0	0
	62	<i>Aesculus hippocastanum</i> 6.3	100	7	1400	1
12.08.2014	63	<i>Tilia platyphyllos</i> 1.1	180	19	3800	1
	64	<i>Tilia platyphyllos</i> 1.2	120	11	2200	0
	65	<i>Tilia platyphyllos</i> 1.3	160	32	6400	44
	66	<i>Tilia platyphyllos</i> 2.1	128	60	12000	16
	67	<i>Tilia platyphyllos</i> 2.2	5	4	800	7
	68	<i>Tilia platyphyllos</i> 2.3	296	30	6000	1
	69	<i>Tilia platyphyllos</i> 3.1	200	22	4400	12
	70	<i>Tilia platyphyllos</i> 3.2	35	2	400	4
	71	<i>Tilia platyphyllos</i> 3.3	880	85	17000	15
09.09.2014	72	<i>Tilia platyphyllos</i> 1.1	127	100	20000	13
	73	<i>Tilia platyphyllos</i> 1.2	104	12	2400	2
	74	<i>Tilia platyphyllos</i> 1.3	850	143	28600	12
	75	<i>Tilia platyphyllos</i> 2.1	480	110	22000	20
	76	<i>Tilia platyphyllos</i> 2.2	144	11	2200	0
	77	<i>Tilia platyphyllos</i> 2.3	4	1	200	0
	78	<i>Tilia platyphyllos</i> 3.1	300	39	7800	1
	79	<i>Tilia platyphyllos</i> 3.2	220	48	9600	5
	80	<i>Tilia platyphyllos</i> 3.3	528	53	10600	3
12.12.2014	81	<i>Robinia pseudoacacia</i> 1.1	2000	1200	240000	243
	82	<i>Robinia pseudoacacia</i> 1.2	1600	720	144000	70
	83	<i>Robinia pseudoacacia</i> 1.3	12800	2080	416000	200
	84	<i>Juglans regia</i> 1.1	220	26	5200	2
	85	<i>Juglans regia</i> 1.2	1520	260	52000	30
	86	<i>Juglans regia</i> 1.3	140	11	2200	0
	87	<i>Quercus petraea</i> 1.1	90	81	16200	4
	88	<i>Quercus petraea</i> 1.2	250	166	33200	15

Nach der numerischen Erhebung aller Agarplatten wurden gezielt verschiedenartige und dominant gegenüber anderen Mikroorganismen auftretende Bakterienkolonien ausgewählt. Unter der Impfbank konnten diese Kolonien mithilfe steriler Zahnstocher der jeweiligen Agarplatte entnommen und auf eine frische Pepton-Agarplatte übertragen werden. Nach wenigen Tagen konnte festgestellt werden, ob eine Reinkultur der gewünschten Bakterienart vorlag.

Von den insgesamt 88 Borke-Bakterien-Eluaten wurden 345 Bakterienkolonien morphologisch beschrieben und in Reinkultur gebracht (Tab. 20). Mithilfe der Vordualtests konnten die Bakterienisolate in Hinblick auf die Ausprägung antagonistischer Fähigkeiten differenziert werden. Die schließlich 46 ausgewählten Antagonisten wurden für die Dualtestreihe (Konfrontation mit neun verschiedenen Schadpilzen) herangezogen, biochemisch untersucht und mittels molekularbiologischer Methoden identifiziert.

Tab. 20: Sammelzeitpunkte 1-6 mit Angabe der erhaltenen Reinkulturen, der Bakterien für Dualtests und der molekularbiologisch identifizierten Bakterien.

Sammelzeitpunkt	Datum	Anzahl der in Reinkultur vorliegenden Bakterienarten	Anzahl der Bakterienarten für die Dualkulturesreihe	Anzahl identifizierter Bakterienarten
1	01.05.2014	63	14	6
2	14.07.2014	108	66	10
3	21.07.2014	48	42	7
4	12.08.2014	35	27	10
5	09.09.2014	46	19	6
6	12.12.2014	45	26	7
Gesamt		345	194	46

### 4.3 Morphologische Charakterisierung

Von den insgesamt 345 morphologisch charakterisierten Bakterien-Kolonien sind ausschließlich die ausgewählten 46 Bakterienarten dargestellt (Tab. 21). Dabei hatten 29 der Antagonisten ihren Ursprung am Stammfuß des jeweiligen Probenbaumes und waren wenig pigmentiert (weiß, cremefarben). Bei der Kolonieforn überwog der Anteil der unregelmäßig aussehenden Bakterienkolonien, hingegen der Rand von ganzrandig bis gelappt unterschiedliche Formen aufwies. Die meisten ausgewählten Kolonien waren von der Höhe flach und mit einer Größe von 0,5-10 mm als groß einzustufen. Bei der Struktur und dem Aussehen überwog der Anteil der glatten bzw. glänzenden Bakterienkolonien. Borke-Extrakte der Sommerlinde *Tilia platyphyllos* wiesen größtenteils weiße und kleine Kolonien auf (s. Abb. 12).

Als zu nennendes Beispiel wurde die Kolonie 7.1 der Borkeprobe 7 (*Aesculus hippocastanum*; erkrankt an der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit) als cremefarben, ganzrandig, glatt, glänzend und durchscheinend beschrieben (s. Kennzeichnung mittels Pfeil auf der Pepton-Agarplatte, Abb. 13; Sammelzeitpunkt 2, 14.07.2014; Probe B2-5).



Abb. 13: Borkeprobe des Sammelzeitpunktes 2 (14.07.2014) mit Umrandungen der ausgewählten Bakterienkolonien; Pfeil zeigt die Probe 7.1, welche für den weiteren Verlauf als B2-5 (Labor-Bez.) angegeben wurde.





#### 4.4 Biochemische Untersuchungen - Gramfärbung

Bei den biochemischen Untersuchungen der 46 Antagonisten wiesen die meisten Proben eine zylinderförmige Zellform auf (Stäbchen), wenige waren kugelförmig (Kokken; Tab. 22). Die Bakterienprobe B3-1 zeigte sowohl Kokken als auch Stäbchen. Die Gramfärbung fiel bei den meisten untersuchten Bakterienkolonien positiv aus, bis auf B1-1, B2-5, B4-9 und B6-1 bis B6-6.

Tab. 22: Biochemische Untersuchungen der 46 Bakterienarten mit Angabe der Zellform und der Ergebnisse der Gramfärbung.

Sammelzeitpunkt	Bakterien-Probe	Ursprung der Probe		Zellform	Gramfärbung
1 15.05.2014	B 1-1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Ast	Stäbchen	-
	B 1-2	<i>Larix decidua</i>	Stammfuß	Kokken	+
	B 1-3	<i>Quercus petraea</i>	Stammfuß	Kokken	+
	B 1-4	<i>Quercus petraea</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 1-5	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
2 14.07.2014	B 1-6	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 2-1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 2-2	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Kokken	+
	B 2-3	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Kokken	+
	B 2-4	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Kokken	+
	B 2-5	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Kokken	-
	B 2-6	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 2-7	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Kokken	+
	B 2-8	<i>Aesculus hippocastanum</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 2-9	<i>Aesculus hippocastanum</i>	BHD	Kokken	+
3 21.07.2014	B 2-10	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 3-1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Ast	Kokken/ Stäbchen	+
	B 3-2	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 3-3	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 3-4	<i>Aesculus hippocastanum</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 3-5	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Ast	Stäbchen	+
	B 3-6	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Kokken	+
4 12.08.2014	B 3-7	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 4-1	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 4-2	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 4-3	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 4-4	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 4-5	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 4-6	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 4-7	<i>Tilia platyphyllos</i>	Ast	Stäbchen	+
	B 4-8	<i>Tilia platyphyllos</i>	Ast	Stäbchen	+
	B 4-9	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	Stäbchen	-
5 09.09.2014	B 4-10	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 5-1	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 5-2	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 5-3	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	Stäbchen	+
	B 5-4	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 5-5	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
6 12.12.2014	B 5-6	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	Stäbchen	+
	B 6-1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	Stäbchen	-
	B 6-2	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	Stäbchen	-
	B 6-3	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	Stäbchen	-
	B 6-4	<i>Robinia pseudoacacia</i>	BHD	Stäbchen	-
	B 6-5	<i>Robinia pseudoacacia</i>	BHD	Stäbchen	-
	B 6-6	<i>Quercus petraea</i>	Stammfuß	Stäbchen	-
B 6-7	<i>Quercus petraea</i>	BHD	Stäbchen	+	

## 4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

### 4.5.1 DNA-Extraktion

Nach Anleitung des Extraktionskits von QIAGEN konnte aus allen 46 antagonistischen Bakterienarten DNA extrahiert werden.

### 4.5.2 Identifizierung über die Sequenz-Abschnitte

Aus der von den 46 Bakterienarten extrahierten DNA wurde mithilfe des Primer-Paares B27f/805r ein spezifischer Bereich des 16S rRNA-Gens amplifiziert und von der Firma Biomers sequenziert. Ein Sequenzabgleich dieser Abschnitte mit denen in der NCBI Datenbank hinterlegten Sequenzen wurde durchgeführt und die Übereinstimmungen in Prozent [%] angegeben (Tab. 23). Bis auf das Bakterium *Pedobacter nyackensis* (B1-2), wiesen die Sequenz-Abschnitte eine Übereinstimmung von über 90 % auf. 32 der Bakterienarten stimmten mit über 99 % mit denen in der Datenbank hinterlegten Sequenzen überein.

Tab. 23: Übersicht identifizierter Bakterienarten (über das 16S rRNA-Gen) mit Angabe des Sammelzeitpunktes, dem Ursprung der Borkeprobe (k=krank; g=gesund), der Übereinstimmung [%] und Nummer der NCBI Referenzsequenz.

Sammelzeitpunkt	Bakterienprobe	Ursprung der Borkeprobe		Bakterienart	Übereinstimmung [%]	Nummer der NCBI Referenzsequenz
1	B 1-1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Ast	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97	LT907842.1
15.05.2014	B 1-2	<i>Larix decidua</i>	Stammfuß	<i>Pedobacter nyackensis</i>	68	NR_044380.1
	B 1-3	<i>Quercus petraea</i>	Stammfuß	<i>Bacillus subtilis</i>	95	KY435711.1
	B 1-4	<i>Quercus petraea</i>	Stammfuß	<i>Bacillus altitudinis</i>	96	KX965631.1
	B 1-5	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	<i>Bacillus simplex</i>	96	MG905633
	B 1-6	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	<i>Bacillus megaterium</i>	94	CP018874.1
2	B 2-1	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99	MG819274.1
14.07.2014	B 2-2	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Arthrobacter rhombi</i>	99	NR_026448.1
	B 2-3	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	99	KF055023.1
	B 2-4	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	99	KF554147.1
	B 2-5	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	MF943225.1
	B 2-6	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Sodalis praecaptivus</i>	99	CP006569.1
	B 2-7	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	99	KF554147.1
	B 2-8	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	BHD	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99	MG819274.1
	B 2-9	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	BHD	<i>Pseudorhododerax soli</i>	99	NR_044574.1
	B 2-10	<i>Aesculus hippocastanum</i> (k)*	Stammfuß	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99	MG819274.1
3	B 3-1	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	Ast	<i>Viridibacillus arenosi</i>	99	KJ671468.1
21.07.2014	B 3-2	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	Stammfuß	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	100	MF502891.1
	B 3-3	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	Stammfuß	<i>Variovorax ginsengisoli</i>	99	MG576021.1
	B 3-4	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	BHD	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KX670428
	B 3-5	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	Ast	<i>Rhodococcus fascians</i>	99	MF524017.1
	B 3-6	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	Stammfuß	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	99	KY783360.1
	B 3-7	<i>Aesculus hippocastanum</i> (g)	Stammfuß	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	99	KC443088.1
4	B 4-1	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KY622506.1
12.08.2014	B 4-2	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus pumilus</i>	100	KC596005.1
	B 4-3	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus pumilus</i>	99	KP992919.1

	B 4-4	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KY622820.1
	B 4-5	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KU862326.1
	B 4-6	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	<i>Bacillus megaterium</i>	99	KT998829.1
	B 4-7	<i>Tilia platyphyllos</i>	Ast	<i>Bacillus subtilis</i>	99	MG273750.1
	B 4-8	<i>Tilia platyphyllos</i>	Ast	<i>Bacillus megaterium</i>	99	MG011557.1
	B 4-9	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	MF838680.1
	B 4-10	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX530950.1
5	B 5-1	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus cereus</i>	99	HM769816.1
09.09.2014	B 5-2	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus mycoides</i>	98	MG905903.1
	B 5-3	<i>Tilia platyphyllos</i>	BHD	<i>Bacillus mycoides</i>	99	MG905873.1
	B 5-4	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus mycoides</i>	99	MG905873.1
	B 5-5	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus mycoides</i>	98	MG786402.1
	B 5-6	<i>Tilia platyphyllos</i>	Stammfuß	<i>Bacillus pumilus</i>	99	KU236473.1
6	B 6-1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	<i>Luteimonas aestuarii</i>	99	KF876901.1
12.12.2014	B 6-2	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99	MG819274.1
	B 6-3	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stammfuß	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	KR259223.1
	B 6-4	<i>Robinia pseudoacacia</i>	BHD	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	98	MG819274.1
	B 6-5	<i>Robinia pseudoacacia</i>	BHD	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	99	NR_148818.1
	B 6-6	<i>Quercus petraea</i>	Stammfuß	<i>Pseudomonas sp.</i>	99	JX067722.1
	B 6-7	<i>Quercus petraea</i>	BHD	<i>Bacillus mycoides</i>	100	KP866903.1

\*Neue Rosskastanien-Komplexkrankheit verursacht durch das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* und die Schadpilze *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus*

Im Rahmen der Untersuchungen kamen manche Bakteriengattungen häufiger vor als andere, insbesondere die Gattung *Bacillus* mit  $n=21$ . Bakterienarten der Gattungen *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas* wiesen  $n=7$  bzw.  $n=5$  auf. Weniger häufig waren die Gattungen *Luteimonas*, *Pedobacter*, *Pseudorhodofera*, *Rummeliibacillus*, *Sodalis*, *Variovorax* und *Viridibacillus* mit  $n=1$  vertreten (Abb. 14).

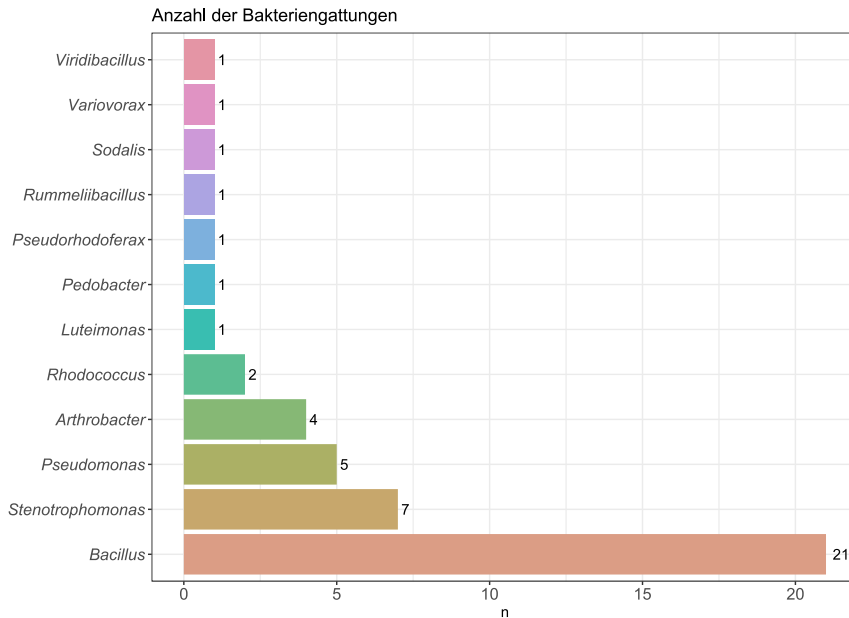


Abb. 14: Darstellung der identifizierten Bakteriengattungen; Anzahl insgesamt  $n=46$ .

Die Gattung *Bacillus* untergliederte sich weiter in sieben unterschiedliche Bakterienarten, die identifiziert wurden (Abb. 15).

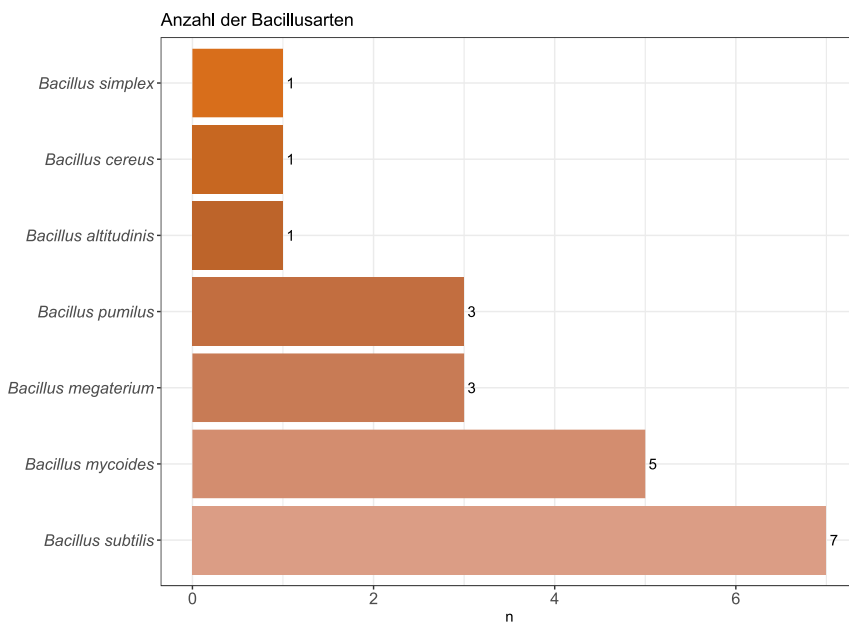


Abb. 15: Darstellung der identifizierten Bakterienarten der Gattung *Bacillus*; Anzahl insgesamt  $n=21$ .

*Bacillus subtilis* mit n=7 und *Bacillus mycoides* mit n=5 kamen am häufigsten vor im Vergleich zu den Arten *B. megaterium*, *B. pumilus* mit n=3 und *B. altitudinis*, *B. cereus* und *B. simplex* mit n=1.

Das Vorkommen der Bakteriengattungen an der Borke bestimmter Baumarten ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 24). Dabei konnte insbesondere das Auftreten der Gattung *Bacillus* mit n=15 bei der Baumart *Tilia platyphyllos* beobachtet werden (Lfd.Nr.16). Verschiedenartige Gattungen sind bei gesunden (g) und kranken (k) Rosskastanien festzustellen gewesen. Bei den an der neuen Komplexkrankheit befallenen Rosskastanienbäumen konnten häufiger Bakterienarten der Gattungen *Arthrobacter* mit n=4 und *Stenotrophomonas* mit n=3 verzeichnet werden. Letztere Gattung war ebenfalls häufig an der Borke von *Robinia pseudoacacia* nachzuweisen (n=4, Lfd.Nr.19).

Tab. 24: Vorkommen der Bakteriengattungen an bestimmten Baumarten; *Aesculus hippocastanum*: gesund (g), krank (k).

Lfd. Nr.	Ursprung Borkeprobe	Bakteriengattung	Anzahl n
1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Pseudomonas</i>	1
2	<i>Larix decidua</i>	<i>Pedobacter</i>	1
3	<i>Quercus petraea</i>	<i>Bacillus</i>	3
4	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Bacillus</i>	2
5	(k) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	3
6	(k) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Arthrobacter</i>	4
7	(k) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Pseudomonas</i>	1
8	(k) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Sodalis</i>	1
9	(k) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Pseudorhodoferax</i>	1
10	(g) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Viridibacillus</i>	1
11	(g) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Pseudomonas</i>	1
12	(g) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Variovorax</i>	1
13	(g) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Bacillus</i>	1
14	(g) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Rhodococcus</i>	2
15	(g) <i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Rummeliibacillus</i>	1
16	<i>Tilia platyphyllos</i>	<i>Bacillus</i>	15
17	<i>Tilia platyphyllos</i>	<i>Pseudomonas</i>	1
18	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Luteimonas</i>	1
19	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	4
20	<i>Quercus petraea</i>	<i>Pseudomonas</i>	1

## 4.6 Dualkulturtestreihe

### 4.6.1 Wachstum der Schadpilze in Reinkultur

Für die Reinkulturen der Schadpilze wurden frische Pilzinokula mithilfe der auch für die Dualkulturen verwendeten Vorlage auf dieselbe pilzspezifische Position gesetzt, um die Wachstumsgeschwindigkeit der Schadpilze ohne Gegenspieler (Kontrollen) anhand des täglich zunehmenden Mycels beschreiben zu können. Auf diese Weise konnte ein direkter Vergleich des

Mycelwachstums der Kontrollen zu den Dualkulturen angestellt werden. Das Mycel wurde händisch umrandet und die Messung mithilfe des Programms ImageJ® digital vorgenommen. Das jeweilige Wachstumsende wurde mit dem Heranwachsen an den Petrischalenrand definiert. Die Schadpilze wiesen unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf und sind von rasch bis langsam wachsend dokumentiert worden (Tab. 25-Tab. 27).

Tab. 25: Wachstum der Prüfpilze (Kontrollen, jeweils Vorder- und Rückseite) mit Angabe der Tage des Wachstums hin zum weiter entfernten Petrischalenrand (Vorderseite: links) und weg in [mm]; letzteres definiert das Wachstumsende (Erreichen des naheliegenderen Petrischalenrandes); Angabe der Mittelwerte aus drei Wiederholungen; hier dargestellt die rasch wachsenden Prüfpilze P9 (*Irpex lacteus*), P1 (*Stereum hirsutum*) und P11 (*Trametes versicolor*).

<i>Irpex lacteus</i>			<i>Stereum hirsutum</i>		<i>Trametes versicolor</i>	
Tage	hin [mm]	weg [mm]	hin [mm]	weg [mm]	hin [mm]	weg [mm]
1	4,61	5,20	2,39	3,18	3,38	3,81
2	15,63	15,51	10,85	10,50	12,19	11,52
3	29,23	28,43	21,03	20,62	23,60	22,57
4	38,88	30,41	30,11	27,42	32,43	28,34
5			42,40	30,71	38,73	30,35

Die Weißfäulepilze *Irpex lacteus* (P9), *Stereum hirsutum* (P1) und *Trametes versicolor* (P11) wuchsen innerhalb von 4 bzw. 5 Tagen an den näher gelegenen Petrischalenrand, welches als „weg“ bezeichnet wurde (Tab. 25). Für die Dualkulturen mit Gegenspieler ist das Wachstum „hin“ im Vergleich zu den Kontrollen als Merkmal für eine mögliche Hemmung durch den Antagonisten gewählt worden (Ermittlung des Inhibitionsfaktors P [%], s. Formel (i) u. Abb. 8; Kap. 3.9.2).

Tab. 26: Wachstum der Prüfpilze (Kontrollen, jeweils Vorder- und Rückseite) mit Angabe der Tage des Wachstums hin zum weiter entfernten Petrischalenrand (Vorderseite: links) und weg in [mm]; letzteres definiert das Wachstumsende (Erreichen des naheliegenderen Petrischalenrandes); Angabe der Mittelwerte aus drei Wiederholungen; hier dargestellt die mittel wachsenden Prüfpilze P27 (*Pleurotus ostreatus*), P26 (*Trametes hirsuta*) und P32 (*Fomitopsis pinicola*).

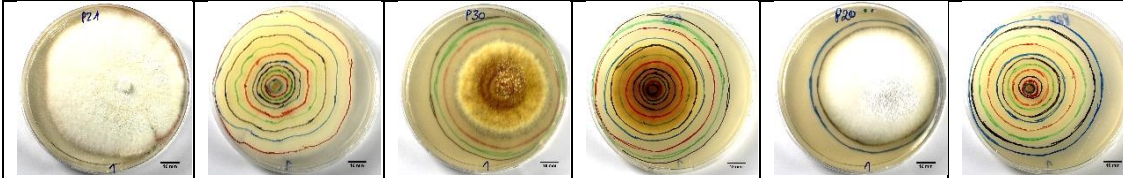
<i>Pleurotus ostreatus</i>			<i>Trametes hirsuta</i>		<i>Fomitopsis pinicola</i>	
Tage	hin [mm]	weg [mm]	hin [mm]	weg [mm]	hin [mm]	weg [mm]
1	1,50	1,62	1,13	1,54	1,52	1,53
2	6,77	6,43	8,95	8,26	5,55	4,86
3	13,83	13,35	16,66	16,02	12,85	12,73
4	21,43	20,59	23,59	22,85	19,53	19,22
5	32,66	29,34	31,48	28,47	28,27	27,16
6	40,17	31,21	35,41	30,43	35,27	30,71
7			41,04	30,37	40,45	31,64



Sowohl die Weißfäulepilze *Trametes hirsuta* (P26) und *Pleurotus ostreatus* (P27) als auch der Braunfäulepilz *Fomitopsis pinicola* (P32) verhielten sich in ihrem Wachstum untereinander recht ähnlich und wuchsen innerhalb von 6-7 Tagen an den Rand der Petrischale.

Zu den langsam wachsenden Schadpilzen zählten die Weißfäulepilze *Ganoderma adspersum* (P21; 10 Tage) und *Flammulina velutipes* (P20), welcher 12 Tage zum Erreichen des Petrischalenrandes benötigte. Der Braunfäulepilz *Daedalea quercina* (P30) wuchs sehr gleichmäßig und benötigte 11 Tage, um den Petrischalenrand zu erreichen (Tab. 27).

Tab. 27: Wachstum der Prüfpilze (Kontrollen, jeweils Vorder- und Rückseite) mit Angabe der Tage des Wachstums hin zum weiter entfernten Petrischalenrand (Vorderseite: links) und weg in [mm]; letzteres definiert das Wachstumsende (Erreichen des naheliegenderen Petrischalenrandes); Angabe der Mittelwerte aus drei Wiederholungen; hier dargestellt die langsam wachsenden Prüfpilze P21 (*Ganoderma adspersum*), P30 (*Daedalea quercina*) und P20 (*Flammulina velutipes*).



<i>Ganoderma adspersum</i>			<i>Daedalea quercina</i>		<i>Flammulina velutipes</i>	
Tage	hin [mm]	weg [mm]	hin [mm]	weg [mm]	hin [mm]	weg [mm]
1	1,21	1,45	0,47	0,55	0,64	0,65
2	3,34	3,36	2,56	1,95	1,75	2,18
3	5,97	5,85	5,58	4,37	4,15	3,72
4	8,29	8,14	8,52	6,87	6,86	6,33
5	12,17	11,45	12,23	10,58	8,50	8,21
6	16,39	15,46	16,00	14,62	12,19	11,27
7	21,78	21,38	20,19	19,16	15,71	15,68
8	28,39	27,51	25,53	23,97	19,02	19,28
9	33,48	31,49	30,03	27,78	22,30	21,16
10	43,44	33,79	35,06	31,23	26,28	25,05
11			37,90	32,76	25,94	26,60
12					30,31	31,67

Der tägliche Mycelzuwachs ermittelte sich durch den Abzug des Mycelwachstums vom jeweiligen Vortag und zeigte bei allen Prüfpilzen geringere Zuwächse zu Beginn der Mycelausbreitung als im weiteren Wachstumsverlauf.

#### 4.6.2 Dualkulturen

##### 4.6.2.1 Vordualtests

Im Rahmen der Vordualtestreihe wurden 194 Bakterienarten getestet. Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Kontrollgruppe durchgeführt, in der das Bakterium bzw. der Pilz ohne Gegenspieler auf die Agar-Platte aufgebracht wurde. Auf diese Weise konnte das Wachstum des jeweiligen Individuums in Dualkultur mit der Kontrolle verglichen werden. Als Beispiel ist das auf HA-Platten

in einem Streifen aufgebraute Bakterium *Bacillus subtilis* (Borkeprobe B1-3 der Traubeneiche *Quercus petraea*, s. Tab. 23) der Reihe des ersten Sammelzeitpunktes (15.05.2014) und die Pilzmycel-Inokula ( $\phi=5$  mm) *Trametes versicolor* (P11) und *Daedalea quercina* (P30) aufgeführt (Abb. 16).

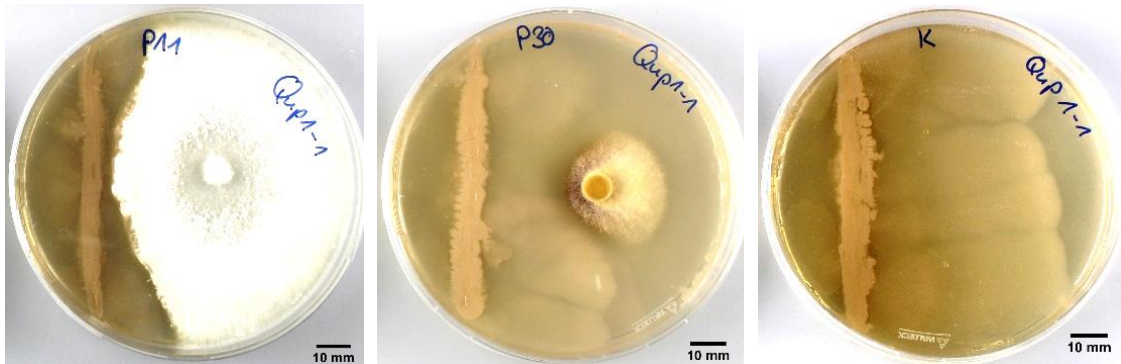


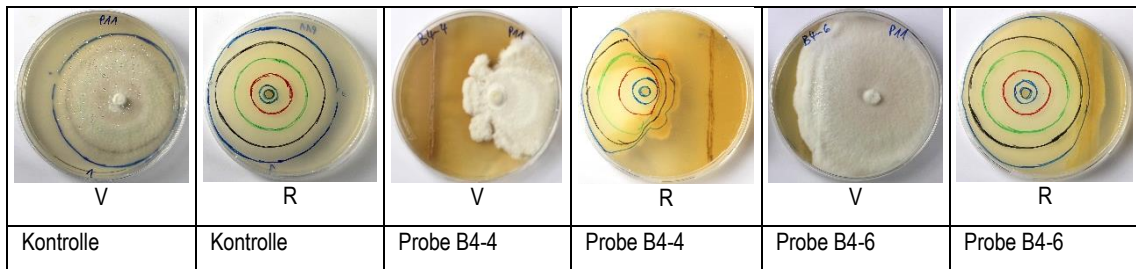
Abb. 16: Wachstumshemmungen der Schadpilze *Trametes versicolor* (P11, links) und *Daedalea quercina* (P30, mitte) durch das Bakterium *Bacillus subtilis* (Borkeprobe B1-3 der Traubeneiche *Quercus petraea*, s. Tab. 23) auf HA-Medium; Kontrolle mit dem Streifen des Bakteriums ohne Pilzmycel (K, rechts).

Die Vordualtestreihe diente der ersten Differenzierung der Bakterienkolonien. Das veränderte Wachstum der Schadpilze durch die Konfrontation mit den Bakterien ließ erste Schlußfolgerungen auf die Dominanz der jeweiligen Bakterienarten zu. Im Rahmen der Dualtestreihe konnten weitere Erkenntnisse in Bezug auf das Hemmvermögen der ausgewählten Bakterienarten gewonnen werden, da zusätzliche Schadpilze herangezogen wurden.

#### 4.6.2.2 Dualtestreihe

Für die Dualtestreihe wurden die ausgewählten 46 Bakterienarten gegenüber 9 unterschiedlichen Schadpilzen getestet (s. Kap. 4.6.1). Ein exemplarisches Beispiel ist mithilfe des Schadpilzes P11 (*Trametes versicolor*) dargestellt (Tab. 28). Dieser wuchs rasch und gleichmäßig auf den Kontrollplatten und benötigte 5 Tage, um den Rand der Petrischale zu erreichen (s. auch Tab. 25). In Gegenüberstellung mit der Bakterienprobe B4-4 ist eine deutliche Hemmung des Pilzwachstums zu verzeichnen gewesen, welches bei der Probe B4-6 nicht zu erkennen war. In beiden genannten Beispielen war das Heranwachsen des Prüfpilzes an den Petrischalenrand (gegenüber dem Bakterium) am fünften Tag zu erkennen (blaue Markierung, Tab. 28).

Tab. 28: Exemplarische Darstellung von Dualkulturen bzw. der Kontrolle des Prüfpilzes P11 (*Trametes versicolor*), in Konfrontation mit der Probe B4-4 (*Bacillus subtilis*) als hemmendes Bakterium und Probe B4-6 (*Bacillus megaterium*) als weniger stark hemmendes Bakterium, jeweils dargestellt die Vorder (V)- und Rückseite (R); mit Markierung des täglichen Pilzmycelzuwachses.



### Auswertung der Dualkulturen

Mithilfe der Schadpilz-Kontrollen in Reinkultur, bei denen das Mycelwachstum ohne Gegenspieler gemessen wurde, konnte ein direkter Vergleich mit den Dualkulturen über die Prüfdauer angestellt werden. In der folgenden Grafik (Abb. 17) sind in der Legende die Bakteriengattungen in ihrer Häufigkeit von oben nach unten aufgeführt. So sind Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Stenotrophomonas* am häufigsten vertreten im Vergleich zu den Gattungen *Variovorax* und *Viridibacillus* (s. auch Kap.4.5.2). Neben den beiden Braunfäulepilzen folgen die sieben Weißfäulepilze. Die Bakterienarten sind den jeweiligen Gattungen untergeordnet. Dabei stellen die Punkte die spezifischen Mittelwerte der Wachstumsrichtung „hin“ dar (mit Angabe von n=Anzahl der Einzelwerte). Die Mittelwerte der jeweiligen Pilz-Kontrollen sind mithilfe von Linien aufgeführt.

### Mycelausbreitung über die Zeit - Gattungen

Beim Braunfäulepilz *Daedalea quercina* ist eine Wachstumshemmung durch alle Bakterienarten zu erkennen gewesen. Am stärksten ließ sich dieser von Bakterienkolonien der Gattung *Bacillus* beeinträchtigen, bei denen das Mycelwachstum an Tag 12 im Mittel auf ca. 15 mm „hin“ zum Bakterienstreifen zu verzeichnen gewesen ist (mit n=63; vgl. Kontrolle ca. 37 mm). Auch die Bakterienart *Luteimonas aestuarii* (n=3) beeinflusste mit einem Mycelwachstum von ca. 20 mm den Schadpilz im Wachstum (Tag 12). Den gleichen Tag betreffend wurde *Daedalea quercina* von den Gattungen *Stenotrophomonas* (ca. 25,54 mm mit n=21), *Sodalis* (26,24 mm mit n=3) und *Pedobacter* (ca. 26,50 mm mit n=3) weniger stark im Wachstum beeinflusst.

*Fomitopsis pinicola* ließ sich von allen Bakterienarten mehr oder weniger stark hemmen (Mittelwert an Tag 7 ca. 40 mm). *Viridibacillus* und *Bacillus* wiesen an Tag 7 Mittelwerte von 13,19 mm (n=3) bzw. 18,56 mm (n= 63) auf und zeigten damit eine größere Hemmwirkung gegenüber des Schadpilzes als die Gattungen *Arthrobacter* mit ca. 29,74 mm (n=12) und *Pseudomonas* mit ca. 30,78 mm (n=15).

Der Weißfäulepilz *Flammulina velutipes* erfuhr durch die Anwesenheit der Bakterienarten der Gattungen *Pseudorhodoferax* (n=3) und *Rhodococcus* (n=6) mit einer Mycelausbreitung von 30,57 mm bzw. 31,67 mm an Tag 11 eine Wachstumsförderung (vgl. Kontrolle ca. 26,00 mm). *Sodalis praecaptivus* (n=3) hemmte den Schadpilz bis Tag 10 sehr gut (9,90 mm), bis das Wachstum von *Flammulina velutipes* ab Tag 11 rasch zunahm und ca. 16,62 mm betrug. Über den Prüfungszeitraum gleichbleibend hemmend wirkten die Bakterienkolonien der Gattung *Bacillus* (15,15 mm an Tag 13). Diese konnten sich mit einem Mittelwert von ca. 20,76 mm (n=63) an Tag 8 auch gegenüber des Weißfäuleerregers *Ganoderma adspersum* behaupten (vgl. Kontrolle mit einem Mittelwert von ca. 28 mm). Bakterienarten der Gattung *Rhodococcus* vermochten ebenfalls das Wachstum des Schadpilzes mit 17,77 mm (Tag 8; n=6) zu beeinflussen. Bei den Bakterienkolonien der Arten *Pseudorhodoferax soli* und *Pedobacter nyackensis* konnte eine Förderung der Mycelausbreitung gegenüber des Schadpilzes festgestellt werden (Tag 8 mit Mittelwerten von 35,91 mm bzw. 41,96 mm; n=3).

Trotz der raschen Mycelausbreitung des Weißfäulepilzes *Irpex lacteus*, schaffte es die Bakterienart *Viridibacillus arenosi* (n=3) diesen mit einem Mittelwert von 18,72 mm an Tag 4 deutlich im Wachstum zu hemmen (vgl. Kontrolle ca. 39 mm).

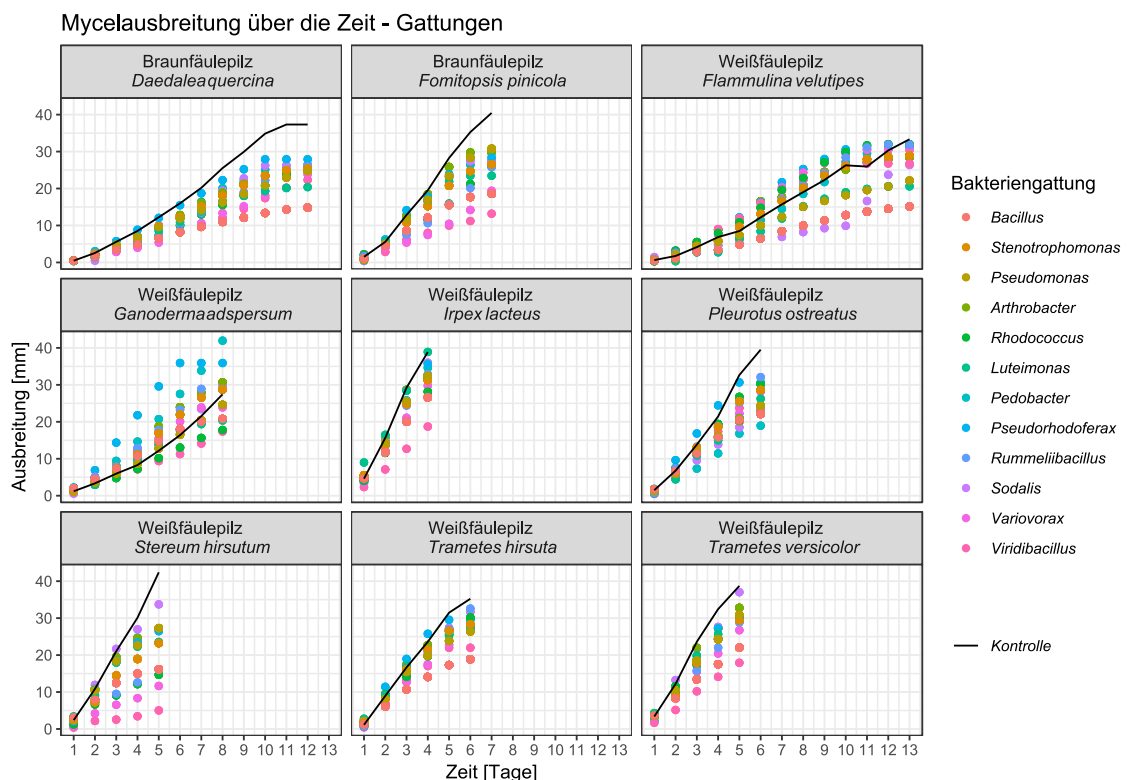


Abb. 17: Darstellung der Bakteriengattungen; Ausbreitung [mm] über die Zeit [Tage] in Dualkultur mit den Prüfpilzen; Punkte: Mittelwerte; Linie: Kontrollwerte der Reinkulturen (ohne Gegenspieler).

Der ebenfalls rasch wachsende Schadpilz *Pleurotus ostreatus* wurde durch das Bakterium *Pedobacter nyackensis* (n=3) an Tag 6 mit einem Mittelwert von 18,95 mm in der Mycelausbreitung gehemmt, gefolgt von Bakterienarten der Gattung *Bacillus* (Mittelwert ca. 22,11 mm; n=63). Im Wachstum unbeeinflusst zeigte sich der Schadpilz durch *Rhodococcus* und *Pseudorhodofera* (Mittelwerte ca. 30,16 mm bzw. 30,66 mm).

In der Anfangsphase breitete sich das Mycel des Weißfäuleerregers *Stereum hirsutum* rasch aus. Durch Bakterienkolonien der Gattung *Viridibacillus* konnte das Wachstum in der Ausbreitung sehr gut eingedämmt werden (Mittelwert an Tag 5 ca. 5,03 mm; vgl. Kontrolle ca. 42 mm), gefolgt von den Gattungen *Variovorax* (n=3; Mittelwert: 11,64 mm) und *Rhodococcus* (n=6; Mittelwert: 14,68 mm). Die Bakterienart *Sodalis praecaptivus* (n=3) wies einen Mittelwert von ca. 33,72 mm an Tag 5 auf.

Die Weißfäulepilze *Trametes hirsuta* und *Trametes versicolor* wiesen eine ähnliche Mycelausbreitung auf. Sie ließen sich in ihrem Wachstum von den Gattungen *Bacillus* und *Viridibacillus* hemmen. Erst genannte Gattung vermochte *T. hirsuta* an Tag 6 mit ca. 18,87 mm und *T. versicolor* an Tag 5 mit 22,02 mm in der Ausbreitung zu beeinflussen (vgl. Kontrollen *T. hirsuta* mit ca. 35 mm bzw. *T. versicolor* mit ca. 38 mm). Die Bakterienart *Viridibacillus arenosi* beeinträchtigte das Mycelwachstum mit einem Mittelwert von 21,99 mm (*T. hirsuta*; Tag 6) und 17,92 mm (*T. versicolor*; Tag 5). Bakterienkolonien der Gattung *Rummeliibacillus* beeinflussten das Wachstum von *T. hirsuta* nicht (32,58 mm; Tag 6), auch behinderte die Bakterienart *Sodalis praecaptivus* die Mycelausbreitung beider Schadpilze kaum.

#### Mycelausbreitung über die Zeit - Bacillusarten

Weiterführend sind in der Grafik der Abb. 18 die sieben Bakterienarten der Gattung *Bacillus* aufgezeigt. Die Punkte stellen die Mittelwerte dar und die senkrechten Linien die min- und max- Werte aller jeweiligen Dualkulturen. Bei allen Braun- und Weißfäulepilzen war eine starke Hemmung des Mycelwachstums durch das Bakterium *Bacillus subtilis* zu erkennen, insbesondere beim Braunfäuleerreger *Daedalea quercina* mit einem Mittelwert von 3,50 mm an Tag 12 (n=21 Einzelwerte). Dieser ließ sich generell von allen *Bacillus*-Arten im Wachstum beeinflussen, wobei *B. pumilus* (n=9) mit einem Mittelwert von ca. 16,96 mm und *B. mycooides* (n=15) mit 18,96 mm nur mittelmäßig, und *B. cereus* (n=3) mit ca. 23,11 mm und *B. altitudinis* (n=3) mit 21,96 mm am wenigsten hemmten (Tag 12; vgl. Kontrolle ca. 37,32 mm). Von den Werten ähnlich verhielten sich die beiden zuletzt genannten Bakterienarten gegenüber *Fomitopsis pinicola*. Auch hier war die Streuung der Werte um den Mittelpunkt gering. Die Bakterienarten *B. simplex* (n=3)

und *B. megaterium* (n=9) mit den Mittelwerten 27,94 mm bzw. 27,65 mm vermochten den Braunfäulepilz in seinem Wachstum wenig zu beeinträchtigen. Gegenüber des Bakteriums *B. mycooides* (n=15) streuten die Werte der Mycelzunahme von 5,57 mm und bis 38,91 mm, wobei der Mittelwert bei 23,36 mm lag (Tag 7; vgl. Kontrolle ca. 40,45 mm).

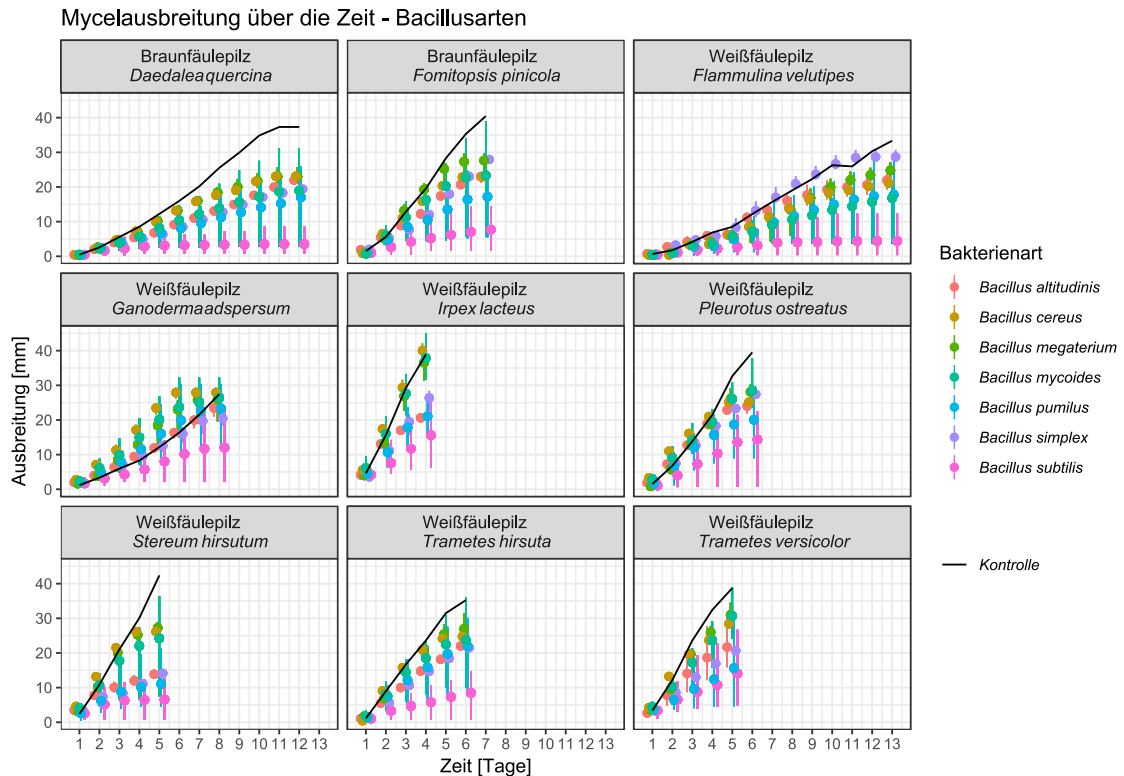


Abb. 18: Darstellung der Bakterienarten der Gattung *Bacillus*; Ausbreitung [mm] über die Zeit [Tage] in Dualkultur mit den Prüfpilzen; Punkte: Mittelwert; senkrechte Linien: um den jeweiligen Mittelwert streuende min- und max-Werte; Linie: Kontrollwerte Reinkulturen (ohne Gegenspieler).

Gegenüber des Weißfäulepilzes *Flammulina velutipes* konnte die Bakterienart *B. simplex* (n=3) mit einem Mittelwert von 28,68 mm an Tag 13 kein gutes Hemmvermögen aufweisen. Anders verhielt es sich mit den Kolonien der Bakterienarten *B. mycooides* und *B. pumilus*, die eine konstante Hemmung des Mycelwachstums über die Prüfungsdauer aufwiesen (16,82 mm bzw. 17,76 mm Mycelwachstum in „hin“- Richtung an Tag 13; vgl. Kontrolle mit 33,34 mm). *B. subtilis* vermochte den Schadpilz mit einem Wachstum von 4,41 mm im Mittel sehr stark zu hemmen.

Der Weißfäulepilz *Ganoderma adspersum* ließ sich in seiner Mycelausbreitung von wenigen Bakterienarten beeinflussen (s. auch Abb. 17). Die Bakterienarten *B. cereus*, *B. megaterium* und *B. mycooides* zeigten eine wachstumsfördernde Wirkung auf den Schadpilz. Ähnlich verhielt es sich gegenüber des Weißfäulepilzes *Irpex lacteus*. Beide Schadpilze wurden am stärksten durch

*B. subtilis* in der Mycelausbreitung gehindert (*G. adspersum* mit 11,99 mm an Tag 8, min=2,1 mm u. max=23,48 mm, vgl. Kontrolle ca. 27,44 mm; *I. lacteus* mit ca. 15,60 mm an Tag 4, min=6,31 mm u. max=25,98 mm, vgl. Kontrolle 38,88 mm).

Der Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* wurde von allen *Bacillus*-Arten im Wachstum gehemmt, insbesondere von *B. subtilis* mit einem Mittelwert von ca. 14,35 mm an Tag 6, gefolgt von *B. pumilus* mit 20,06 mm (vgl. Kontrolle 39,52 mm). Die Werte um den Mittelpunkt streuten sehr stark, was auch bei der Bakterienart *B. mycoides* zu erkennen gewesen ist (Mittelwert ca. 28,53 mm mit min=23,66 mm u. max=37,74 mm).

Gegenüber des Schadpilzes *Stereum hirsutum* hemmten *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. altitudinis* und *B. simplex* sehr stark, wobei die Streuung bei den beiden zuerst genannten Bakterienarten recht hoch gewesen ist (*B. subtilis* mit ca. 6,60 mm im Mittel, min=6,57 mm u. max=12,69 mm; *B. pumilus* mit 11,09 mm, min=4,61 mm u. max=21,20 mm; vgl. Kontrolle 42,40 mm). Trotz des raschen Mycelwachstums von *Stereum hirsutum*, riefen alle *Bacillus*-Arten eine mehr oder weniger starke Hemmung hervor.

Die Weißfäulepilze *T. hirsuta* und *T. versicolor* wurden ebenfalls von allen *Bacillus*-Arten in ihrem Wachstum gehemmt, insbesondere von *B. subtilis* mit den Mittelwerten von ca. 8,48 mm bzw. 14,05 mm (vgl. Kontrolle ca. 38,73 mm). *T. versicolor* ließ sich von *B. pumilus* in der Ausbreitung des Mycels stoppen, wobei die Streuung der Werte sehr groß war (Mittelwert ca. 15,63 mm mit min=4,60 u. max=29,66 mm).

#### Mycelausbreitung über die Zeit - weitere Bakterienarten

In der folgenden Grafik (Abb. 19) sind Bakterienarten aufgezeigt, die ebenfalls neben den *Bacillus*-Arten in Konfrontation mit bestimmten Schadpilzen mehr oder weniger stark hemmten. Dabei sind die Mittelwerte mithilfe der Punkte und die Streuung der Werte mit senkrechten Linien dargestellt. Innerhalb der Bakterienart *Stenotrophomonas rhizophila* (Vorkommen=6 mit n=18 Einzelwerten) streuten die Werte der Mycelausbreitung gegenüber allen Braun- und Weißfäulepilzen sehr stark. Der Braunfäulepilz *Daedalea quercina* wurde vom Antagonisten *Pseudomonas moraviensis* (n=3) konstant gut über die Prüfungsdauer gehemmt (Mittelwert ca. 9,06 mm an Tag 12; vgl. Kontrolle ca. 37,32 mm), einhergehend mit einer geringen Streuung (min=7,38 mm; max=10,79 mm).

Der Braunfäulepilz *Fomitopsis pinicola* ließ sich von den aufgeführten Bakterienarten wenig im Wachstum beeinflussen, am stärksten von den Pseudomonaden: *P. moraviensis* mit ca. 24,30 mm und *P. helmanticensis* mit 25,69 mm im Mittel an Tag 7 (vgl. Kontrolle ca. 40,45 mm). *P. fluorescens* (n=6) hingegen hemmte den Schadpilz im Wachstum mit dem Mittelwert von

35,01 mm wenig, wobei die Werte eine hohe Streuung aufwiesen (min=26,57 mm; max=43,07 mm).

*Flammulina velutipes* erfuhr die stärkste Hemmwirkung durch alle Pseudomonaden, insbesondere durch *P. moraviensis* (n=3) mit 8,38 mm im Mittel. Die Bakterienarten *Arthrobacter nitroguaiacolicus* (n=6) und *Stenotrophomonas tumulicola* (n=3) vermochten den Weißfäulepilz in der Ausbreitung des Mycels mit den Mittelwerten 28,56 mm bzw. 28,45 mm nicht zu stoppen (vgl. Kontrolle 33,34 mm).

Gegenüber des Schadpilzes *Ganoderma adpersum* wirkten viele Bakterienarten wachstumsfördernd (s. auch Abb. 17 u. Abb. 18). *P. helmanticensis* (n=3) vermochte im Mittel mit ca. 22,87 mm den Weißfäuleerreger zu hemmen (vgl. Kontrolle mit ca. 28 mm an Tag 8).

Das Wachstum des Schadpilzes *Irpex lacteus* wurde von den Pseudomonaden unterschiedlich beeinflusst: *P. moraviensis* (n=3) mit ca. 28,41 mm und *P. fluorescens* (n=6) mit 32,42 mm im Mittel (vgl. Kontrolle 38,88 mm an Tag 4). Mit dem Mittelwert von 30,45 mm lag die Bakterienart *Arthrobacter nicotianae* (n=3) mit der Hemmleistung zwischen den beiden genannten Pseudomonas-Arten.

Der Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* wurde im Wachstum am stärksten von den Kolonien der Bakterienart *Arthrobacter nitroguaiacolicus* beeinflusst (Mycelausbreitung ca. 18,35 mm an Tag 6; vgl. Kontrolle ca. 39,52 mm). Weniger antagonistisch wirkten die beiden Arten der Gattung *Stenotrophomonas* auf den Schadpilz, einhergehend mit einer großen Streuung, z.B. bei *S. rhizophila* mit einem Mittelwert von ca. 28,19 mm und den Werten min=5,70 mm und max=33,26 mm (Tag 6).

Anders verhielt sich *S. rhizophila* gegenüber des Weißfäuleerregers *Stereum hirsutum*. Dort wirkte der Antagonist mit ca. 22,22 mm (min=3,50 mm, max=30,10 mm) wachstumshemmend, ebenso die Bakterienarten *P. helmanticensis* mit ca. 20,19 mm und *P. moraviensis* mit 21,12 mm im Mittel (vgl. Kontrolle 42,40 mm).

In Konfrontation mit *T. hirsuta* hemmte *P. moraviensis* (n=3) mit einem Mittelwert von 19,29 mm (vgl. Kontrolle 35,24 mm an Tag 6). *P. helmanticensis* (n=3) vermochte den Weißfäulepilz *T. versicolor* im Mittel mit 25,20 mm mittelmäßig im Wachstum zu beeinträchtigen (vgl. Kontrolle 38,73 mm an Tag 5).



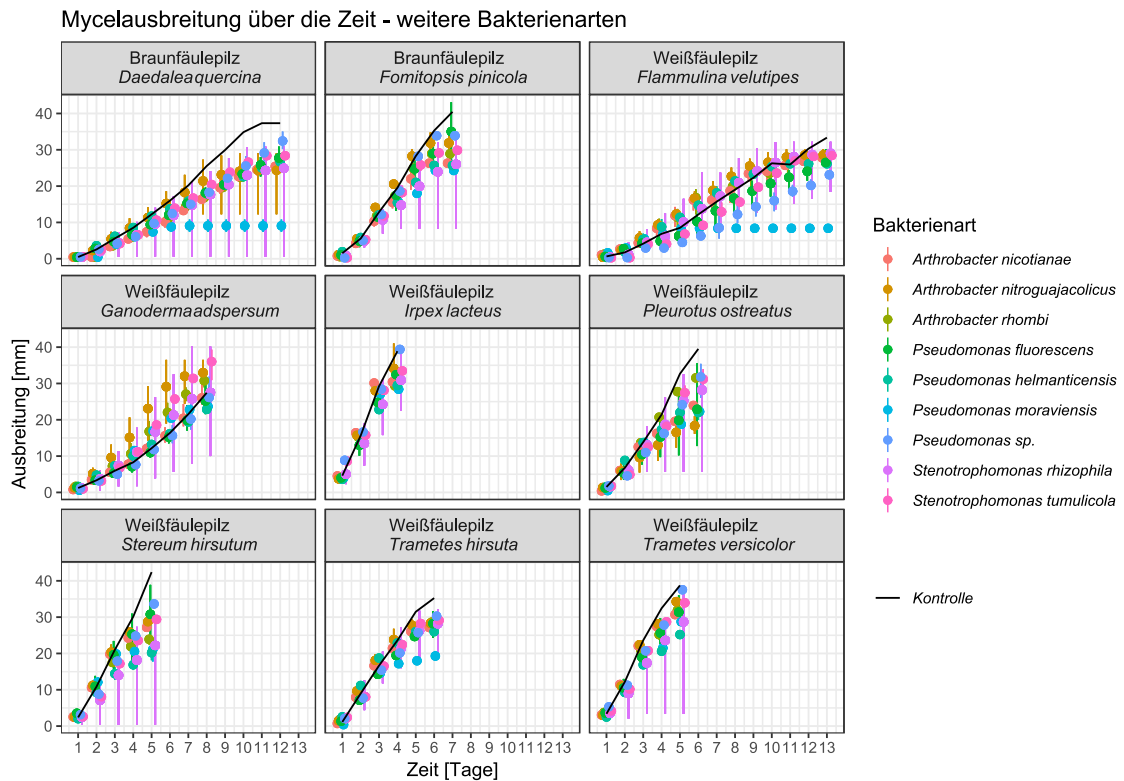


Abb. 19: Darstellung der Bakterienarten weiterer Gattungen (Auflistung s. Legende); Ausbreitung [mm] über die Zeit [Tage] in Dualkultur mit den Prüfpilzen; Punkte: Mittelwerte; senkrechte Linien: um den jeweiligen Mittelwert streuende min- und max-Werte; Linie: Kontrollwerte Reinkulturen (ohne Gegenspieler).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Bakterienarten sowohl gegenüber mehreren Schadpilzen wachstumshemmend wirkten als auch vereinzelt gegenüber spezifischen Weiß- oder Braunfäulepilzen:

- Durch *Bacillus subtilis* (n=21) wurde die Mycelausbreitung gegenüber allen Schadpilzen stark gehemmt, insbesondere das von *Daedalea quercina* (im Mittel 3,50 mm, Tag 12), *Flammulina velutipes* (4,41 mm, Tag 13) und *Stereum hirsutum* (6,60 mm, Tag 5).
- *Bacillus pumilus* (n=9) schwächte das Wachstum von *Stereum hirsutum* (im Mittel 11,09 mm, Tag 5) und *Trametes versicolor* (15,63 mm, Tag 5).
- *Viridibacillus arenosi* (n=3) wirkte hemmend gegenüber *Stereum hirsutum* (im Mittel 5,03 mm, Tag 5), *Fomitopsis pinicola* (13,19 mm, Tag 7), *Trametes versicolor* (17,92 mm, Tag 5) und *Irpex lacteus* (18,72 mm, Tag 4).
- *Pseudomonas moraviensis* (n=3) beeinflusste das Wachstumsverhalten der Schadpilze *Flammulina velutipes* (im Mittel 8,38, Tag 13), *Daedalea quercina* (9,06 mm, Tag 12) und *Trametes hirsuta* (19,29 mm, Tag 6).

- Die Bakterienart *Pedobacter nyackensis* (n=3) trat ausschließlich gegenüber *Pleurotus ostreatus* (18,95 mm, Tag 6) antagonistisch auf.
- Mittelmäßige Mycelhemmung wurde durch die Bakterienart *Pseudomonas helmanticensis* (n=3) gegenüber des Schaderregers *Stereum hirsutum* (im Mittel 20,19 mm, Tag 5), *Trametes versicolor* (25,20 mm, Tag 5) und *Fomitopsis pinicola* (25,69 mm, Tag 7) verursacht.
- Die Bakterienart *Arthrobacter nitroguajacolicus* (n=6) wirkte zum einen wachstumshemmend gegenüber *Pleurotus ostreatus* (im Mittel 18,35 mm, Tag 6), zum anderen wachstumsfördernd in Konfrontation mit *Ganoderma adspersum* (32,95 mm, Tag 8).
- Eine Förderung des Pilzmycelwachstums verursachten die Bakterienarten *Arthrobacter rhombi* (n=3) und *Stenotrophomonas tumulicola* (n=3) gegenüber *Ganoderma adspersum* (im Mittel 30,76 mm bzw. 36,02 mm, Tag 8).

#### Inhibitionsfaktor P [%]

Für einen Überblick über die Hemmwirkung aller 46 Bakterienarten ist die folgende Tab. 29 dargestellt. Dabei ist der Inhibitionsfaktor P [%] für den letzten Tag der Prüfungsdauer aufgeführt (letzter Tag in Klammern gezeigt; Berechnung s. Formel (i), Kap. 3.9.2). Die Werte implizieren den Vergleich der Mittelwerte der Dualkulturen mit den Mittelwerten der jeweiligen Kontrollen. Hinführend auf die Zusammenstellung der beiden biologischen Holzschutzmittellösungen, sind die ausgewählten Bakterienarten hervorgehoben (Aufstellung s. Kap. 4.7).

Die Bakterienart *Arthrobacter nitroguajacolicus* (zweimal vorkommend) unterschied sich untereinander in der Hemmwirkung gegenüber der neun Schadpilze wenig. Eine mäßige Hemmung ist gegenüber des Weißfäuleerregers *Pleurotus ostreatus* (P27) mit 39,83 % bzw. 57,53 % zu verzeichnen gewesen. *Bacillus altitudinis* wies eine gleichbleibend konstante Hemmung gegenüber allen Schadpilzen auf, mit Ausnahme von *Ganoderma adspersum* (P21) mit 17,59 %. Die Bakterienart *Bacillus megaterium* wirkte gegenüber allen Schadpilzen konstant mäßig gut hemmend. Innerhalb der Bakterienart *Bacillus mycoides* kam es zu deutlichen Unterschieden. Die für das Bakterien-Gemisch A ausgewählte Art *Bacillus mycoides* (B5-2) wirkte antagonistischer als die weiteren vier Vertreter. *Bacillus pumilus* vermochte die Braunfäulepilze *Daedalea quercina* (P30) und *Fomitopsis pinicola* (P32), aber auch die Weißfäulepilze *Stereum hirsutum* (P1) und *Flammulina velutipes* (P20) stark im Wachstum zu beeinflussen. Die insgesamt sieben mal vorkommende Bakterienart *Bacillus subtilis* wirkte gegenüber allen Fäuleerregern stark hemmend,

indem eine rasche Ausbreitung auf der Agarplatte wahrzunehmen gewesen ist. Die einzeln vorkommende Art *Luteimonas aestuarii* hemmte die beiden Braunfäulepilze P30 mit 46,22 % und P32 mit 41,98 % und ausschließlich den Weißfäulepilz P1 mit 44,46 % im mäßigen Bereich. *Pedobacter nyackensis* und die für Gemisch B ausgewählte Art *Pseudomonas fluorescens* (B4-9) vermochten *Pleurotus ostreatus* (P27) mit 52,81 % bzw. 66,09 % gut in der Mycelausbreitung zu beeinflussen. Sehr stark hemmend wirkte die für beide Gemische ausgewählte Bakterienart *Pseudomonas moraviensis* (B2-5) gegenüber *Daedalea quercina* (P30) mit 76,09 % und *Flammulina velutipes* (P20) mit 74,97 %.

Die beiden *Rhodococcus*-Arten unterschieden sich in ihrer Wirkung in Konfrontation mit den Schadpilzen kaum, hemmten insbesondere gegenüber *Stereum hirsutum* (P1) mit 62,14 % bzw. 68,60 % recht stark. *Stereum hirsutum* (P1) wurde ebenfalls von *Rummeliibacillus stabekisii* mit 62,34 % im Wachstum beeinflusst. Innerhalb der Bakterienart *Stenotrophomonas rhizophila* (6 Arten) kam es in Bezug auf die Hemmwirkung gegenüber der Schadpilze *Irpex lacteus* (P9), *Ganoderma adspersum* (P21) und *Pleurotus ostreatus* (P27) zu großen Unterschieden. Die für beide Bakterien-Gemische ausgewählte Art (B6-4) wirkte gegenüber *Stereum hirsutum* (P1) mit 82,44 % und *Daedalea quercina* (P30) mit 72,56 % sehr stark antagonistisch. Die Bakterienart *Variovorax ginsengisoli* war nur einmal vertreten und vermochte die meisten Schadpilze in ihrem Wachstum mäßig zu beeinflussen, mit Ausnahme von *Stereum hirsutum* (P1) mit einem Inhibitionsfaktor von 72,54 %. Auch *Viridibacillus arenosi* beeinflusste die Mycelausbreitung von P1 sehr stark mit 88,14 %. Weiter hemmte diese Bakterienart den Braunfäulepilz *Fomitopsis pinicola* (P32) mit 67,39 % und die Weißfäulepilze *Trametes versicolor* (P11) mit 53,74 % und *Irpex lacteus* (P9) mit 51,85 %.

Tab. 29: Darstellung des Inhibitionsfaktors [%] der jeweiligen Dualkulturen.

Lfd. Nr.	Bez.	Bakterienart	Inhibitionsfaktor P [%] zum jeweiligen Ende des Wachstums im Rahmen der Dualkulturstreife (Tage Wachstum)								
			P30 <i>Daedalea quercina</i> (11)	P32 <i>Fomitopsis pinicola</i> (7)	P1 <i>Stereum hirsutum</i> (5)	P9 <i>Irpex lacteus</i> (4)	P11 <i>Trametes versicolor</i> (5)	P20 <i>Flammulina velutipes</i> (12)	P21 <i>Ganoderma adspersum</i> (10)	P26 <i>Trametes hirsuta</i> (7)	P27 <i>Pleurotus ostreatus</i> (6)
9	B2-3	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	32,87	34,96	35,88	21,69	20,75	16,93	8,36	23,35	40,42
10	B2-4	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	45,69	24,66	31,83	26,59	11,00	19,18	-12,16	22,16	57,53
13	B2-7	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	19,69	17,79	32,62	-2,19	12,04	10,23	-107,80	18,20	39,83
8	B2-2	<i>Arthrobacter rhombi</i>	32,84	28,53	43,62	24,58	17,66	14,64	-8,33	19,20	21,50
4	B1-4	<i>Bacillus altitudinis</i>	42,06	43,13	67,32	46,99	44,00	34,38	17,59	37,82	40,28
34	B5-1	<i>Bacillus cereus</i>	39,04	43,44	38,28	-2,96	26,64	36,85	1,77	30,13	37,40
6	B1-6	<i>Bacillus megaterium</i>	43,29	34,96	39,38	16,00	26,13	30,78	16,35	33,31	28,35
29	B4-6	<i>Bacillus megaterium</i>	38,72	31,27	34,05	2,53	19,99	22,09	3,51	20,39	31,49
31	B4-8	<i>Bacillus megaterium</i>	36,06	28,67	33,96	-0,58	13,78	24,45	5,41	18,08	29,97
<b>35</b>	<b>B5-2</b>	<b><i>Bacillus mycoides</i></b>	<b>88,12</b>	<b>67,38</b>	<b>79,76</b>	<b>4,83</b>	<b>34,29</b>	<b>85,69</b>	<b>11,67</b>	<b>65,66</b>	<b>12,81</b>
36	B5-3	<i>Bacillus mycoides</i>	47,09	36,93	36,85	-1,39	23,82	45,90	1,02	30,41	34,57
37	B5-4	<i>Bacillus mycoides</i>	42,13	35,64	39,64	5,03	22,19	40,42	9,77	34,67	39,31
38	B5-5	<i>Bacillus mycoides</i>	43,20	35,89	38,48	1,77	22,54	36,56	2,84	27,71	38,78
46	B6-7	<i>Bacillus mycoides</i>	29,27	35,38	19,50	2,68	1,10	40,14	8,76	6,49	19,35
25	B4-2	<i>Bacillus pumilus</i>	43,41	48,68	80,77	47,13	85,94	33,22	7,55	19,65	41,65
<b>26</b>	<b>B4-3</b>	<b><i>Bacillus pumilus</i></b>	<b>89,64</b>	<b>81,10</b>	<b>87,44</b>	<b>57,81</b>	<b>65,32</b>	<b>87,34</b>	<b>48,26</b>	<b>73,63</b>	<b>73,92</b>
45	B5-6	<i>Bacillus pumilus</i>	32,72	42,68	53,33	32,41	27,70	20,27	-2,54	20,86	34,61
5	B1-5	<i>Bacillus simplex</i>	48,77	30,93	66,73	32,13	46,62	14,31	27,84	39,20	31,78
3	B1-3	<i>Bacillus subtilis</i>	88,50	68,10	81,03	36,34	57,57	72,16	25,42	82,70	50,82
20	B3-4	<i>Bacillus subtilis</i>	90,17	98,34	85,63	81,25	83,56	98,34	88,03	68,17	70,90
24	B4-1	<i>Bacillus subtilis</i>	98,19	93,80	95,44	76,81	36,94	98,93	85,11	93,86	94,51
<b>27</b>	<b>B4-4</b>	<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>94,53</b>	<b>84,26</b>	<b>87,63</b>	<b>68,97</b>	<b>78,76</b>	<b>92,18</b>	<b>63,96</b>	<b>80,83</b>	<b>67,69</b>
28	B4-5	<i>Bacillus subtilis</i>	89,82	82,00	85,02	49,42	58,85	79,28	47,34	70,44	53,16
30	B4-7	<i>Bacillus subtilis</i>	82,61	74,38	81,72	43,96	52,14	75,84	39,85	64,72	51,78

## 4 Ergebnisse

33	B4-10	<i>Bacillus subtilis</i>	94,43	85,22	80,23	62,44	78,28	95,54	54,61	79,71	61,09
40	B6-1	<i>Luteimonas aestuarii</i>	46,22	41,98	44,46	-0,07	23,71	38,51	28,31	23,17	34,64
2	B1-2	<i>Pedobacter nyackensis</i>	30,13	31,71	35,63	10,98	21,22	6,53	-47,79	22,25	52,81
1	B1-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19,83	-4,51	10,53	10,62	10,85	18,62	1,25	11,65	19,98
<b>32</b>	<b>B4-9</b>	<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b>	<b>33,83</b>	<b>31,39</b>	<b>44,28</b>	<b>22,59</b>	<b>27,14</b>	<b>23,06</b>	<b>21,46</b>	<b>28,94</b>	<b>66,09</b>
18	B3-2	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	29,53	36,50	52,36	24,23	34,94	21,91	19,46	17,40	45,21
<b>11</b>	<b>B2-5</b>	<b><i>Pseudomonas moraviensis</i></b>	<b>76,09</b>	<b>39,91</b>	<b>50,18</b>	<b>26,94</b>	<b>25,73</b>	<b>74,97</b>	<b>16,64</b>	<b>45,51</b>	<b>44,61</b>
45	B6-6	<i>Pseudomonas sp.</i>	14,46	16,24	20,67	-1,26	3,06	30,92	7,90	14,55	20,85
15	B2-9	<i>Pseudorhodofera soli</i>	20,39	29,77	37,57	8,25	21,59	8,68	-119,10	16,57	6,10
21	B3-5	<i>Rhodococcus fascians</i>	33,58	33,39	62,14	28,49	21,88	5,82	52,33	11,53	19,69
22	B3-6	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	32,57	37,76	68,60	26,75	20,13	3,02	22,50	18,02	30,14
23	B3-7	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	31,58	36,28	62,34	15,49	25,56	4,64	-32,75	8,00	20,10
12	B2-6	<i>Sodalis praecaptivus</i>	25,16	32,21	20,46	7,40	4,45	21,26	-5,12	10,55	41,86
7	B2-1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	33,30	37,30	60,16	26,39	32,10	7,08	57,65	24,46	23,87
14	B2-8	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	14,51	26,64	35,50	12,60	19,08	6,52	-77,95	11,76	2,70
16	B2-10	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	15,73	25,56	29,41	8,35	17,61	6,50	-46,09	15,15	6,94
41	B6-2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	37,50	72,03	47,68	35,96	26,71	37,41	40,21	40,32	39,55
42	B6-3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	19,40	20,34	30,39	3,55	11,98	-3,98	-30,36	12,55	18,68
<b>43</b>	<b>B6-4</b>	<b><i>Stenotrophomonas rhizophila</i></b>	<b>72,56</b>	<b>32,39</b>	<b>82,44</b>	<b>36,53</b>	<b>48,07</b>	<b>7,73</b>	<b>-0,70</b>	<b>18,38</b>	<b>51,54</b>
44	B6-5	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	25,14	26,16	30,71	13,94	12,35	15,03	-26,86	17,82	22,32
19	B3-3	<i>Variovorax ginsengisoli</i>	36,92	52,06	72,54	23,45	30,98	8,73	15,86	24,43	29,76
<b>17</b>	<b>B3-1</b>	<b><i>Viridibacillus arenosi</i></b>	<b>41,04</b>	<b>67,39</b>	<b>88,14</b>	<b>51,85</b>	<b>53,74</b>	<b>20,07</b>	<b>38,83</b>	<b>30,15</b>	<b>40,94</b>

### Inhibitionsklassen I-IV

Die 411 Dualkulturen (46 Bakterienarten x 9 Schadpilze) aus den Biokotrollversuchen sind der beschriebenen Definition der Inhibitionsklassen (s. Kap 3.9.2) zugeordnet worden (Abb. 20). Bakterienarten, die die Schadpilze nicht zu hemmen vermochten und eher fördernd wirkten, wurden der Klasse IV zugewiesen und beliefen sich auf ca. 22 %. Die der Klasse III zugeordneten Bakterienarten machten mit 44 % den größten Anteil aus. Die Antagonisten, die die Schadpilze gut und stark hemmten, wurden den Inhibitionsklassen II und I zugeordnet und machten zusammen ein Drittel (ca. 33 %) der Gesamtheit aus.

Einteilung in Inhibitionsklassen

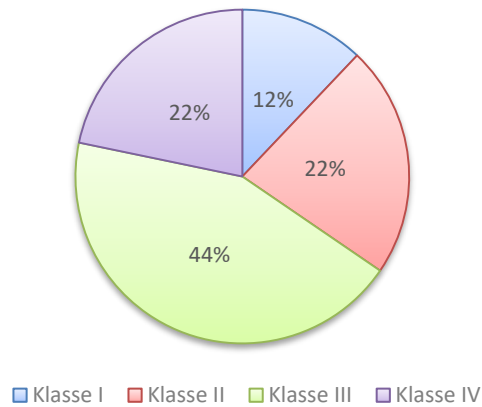


Abb. 20: Bewertung der Dualkulturen mit Einteilung in Inhibitionsklassen I-IV.

#### 4.7 Holzschutzmitteltest in Anlehnung an DIN EN 113 und DIN EN 152

Abgeleitet aus den Ergebnissen der Dualtestreihe wurden folgende Bakterienarten der Inhibitionsklassen I und II für die biologische Holzschutzmittellösung ausgewählt (Auswertung der Dualkulturen s. Kap. 4.6.2.2), kultiviert und in den Gemischen A und B verwendet:

- *Pseudomonas moraviensis* (B2-5) → Gemisch A und B
- *Viridibacillus arenosi* (B3-1) → Gemisch A
- *Bacillus pumilus* (B4-3) → Gemisch A und B
- *Bacillus subtilis* (B4-4) → Gemisch A und B
- *Pseudomonas fluorescens* (B4-9) → Gemisch B
- *Bacillus mycoides* (B5-2) → Gemisch A
- *Stenotrophomonas rhizophila* (B6-4) → Gemisch A und B

##### 4.7.1 Wachstumskurven der Bakterien

Mithilfe des Photospektrometers konnten Werte für die Erstellung spezifischer Wachstumskurven ermittelt werden (Abb. 21). Innerhalb von sieben Tagen hatten alle Bakterien die stationäre Phase erreicht. Bakterienspezifisch schwankten die Werte bei einer gewählten Optischen Dichte (OD) von 600 zwischen 0,910 (B4-4; Tag 7) und 1,621 (B4-9; Tag 5).

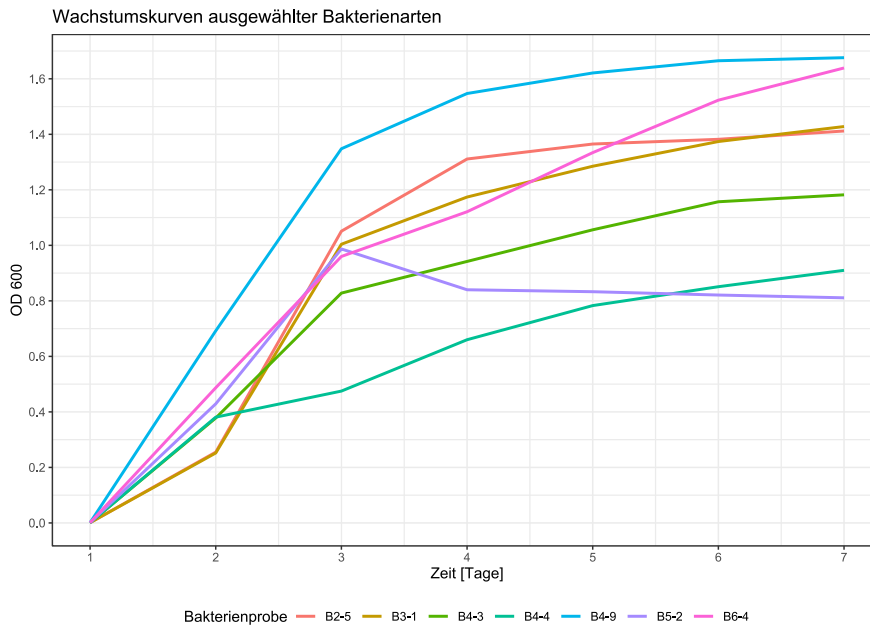


Abb. 21: Wachstumskurven der Bakterienarten B2-5 (*Pseudomonas moraviensis*), B3-1 (*Viridibacillus arenosi*), B4-3 (*Bacillus pumilus*), B4-4 (*Bacillus subtilis*), B4-9 (*Pseudomonas fluorescens*), B5-2 (*Bacillus mycoides*) und B6-4 (*Stenotrophomonas rhizophila*); Optische Dichte (OD): 600, Messzeitraum: sieben Tage.

Die Bakterienart *Bacillus mycoides* (B5-2) wies einen Maximalwert von 0,987 (OD 600) an Tag 3 auf, fiel anschließend auf einen Wert von 0,840 und verblieb schließlich auf diesem Niveau. Die Bakterienarten *Pseudomonas moraviensis* (B2-5), *Bacillus mycoides* (B5-2) und *Pseudomonas fluorescens* (B4-9) erreichten die stationäre Phase bereits am fünften Tag und verblieben auf diesem Stadium (Tab. 30). Für die Testreihe der Abbaueversuche wurden die Bakterien zum gleichen Zeitpunkt angesetzt und konnten an Tag sieben für das Gemisch A bzw. B zusammengefügt werden.

Tab. 30: Bakteriengemisch A und B als biologische Holzschutzmittellösung mit Angabe der jeweiligen Holz- und Bakterienart und der erreichten stationären Phase [Tage].

Bezeichnung/Holzarten im Test	Laborbez.	Zusammensetzung des Gemischs aus Bakterienarten	Erreichen der stationären Phase [Tage]
Bakterien-Gemisch A <i>Pinus sylvestris</i> / <i>Fagus sylvatica</i>	B2-5	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	5-7
	B3-1	<i>Viridibacillus arenosi</i>	6
	B4-3	<i>Bacillus pumilus</i>	7
	B4-4	<i>Bacillus subtilis</i>	7
	B5-2	<i>Bacillus mycoides</i>	5-7
	B6-4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	7
Bakterien-Gemisch B <i>Aesculus hippocastanum</i>	B2-5	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	5-7
	B4-3	<i>Bacillus pumilus</i>	7
	B4-4	<i>Bacillus subtilis</i>	7
	B4-9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5-7
	B6-4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	7

#### 4.7.2 Biologische Lösung Gemisch A und B im Test

Für die Sicherstellung, dass die Prüfkörper (Pk) während der Eintauchphase von 5 min. die biologische Holzschutzmittellösung aufgenommen haben, wurden zusätzlich zur Versuchsreihe die Lösungsaufnahmen je Holzart ermittelt (n=8; Beschreibung des Ablaufs s. Kap. 3.10.2, nach Formel (iv)):

- Kiefer (*Pinus sylvestris*) → 334,67 kg/m<sup>3</sup>
- Buche (*Fagus sylvatica*) → 151,53 kg/m<sup>3</sup>
- Kastanie (*Aesculus hippocastanum*) → 213,17 kg/m<sup>3</sup>

##### 4.7.2.1 Masseverlust über die Zeit

Im Rahmen der Holzschutzmittellösetreihe zeigen die folgenden Grafiken zuerst einen Überblick des Masseverlusts [%] der Pk der Holzarten Buche und Kiefer (Abb. 22). In Abb. 23 wird nach den Ausbauzeitpunkten differenziert. Weiterführend ist die Grafik unter Einbezug der jeweiligen Holzart, des Prüfpilzes und der Behandlung der Pk über die Zeit [Wochen] dargestellt (Abb. 24).



Die folgende Abbildung zeigt einen Box-Whisker-Plot des Masseverlustes und gibt bereits Hinweise auf einen Unterschied im zeitlichen Verlauf der Versuchsreihe (Abb. 22). Untersucht wurden hier die Holzarten Buche und Kiefer. Prüfkörper der Rosskastanie wurden in dieser Untersuchung nicht betrachtet, da andere Schadpilze präsent waren.

Hierbei wurde zwischen dem Auftragen einer Holzschutzlösung (mit Lösung) und unbehandelten Holz-Pk (ohne Lösung) unterschieden. Es wurden alle möglichen Einflussvariablen (Zeit, Pilz, Holzart) zusammengefasst. Betrachtet wurden die Verteilungen mit Lösung/ohne Lösung bezüglich des Masseverlustes. Der Median der behandelten Pk lag mit 7,89 % unter dem der unbehandelten Pk mit 18,3 %. Jede Gruppe umfasste jeweils 60 Messungen. Beide Gruppen zeigten im Sinne der Box-Whisker-Statistik keine Ausreißer ( $1,5 \cdot \text{IQR} - \text{Inter Quartile Range}$ ).

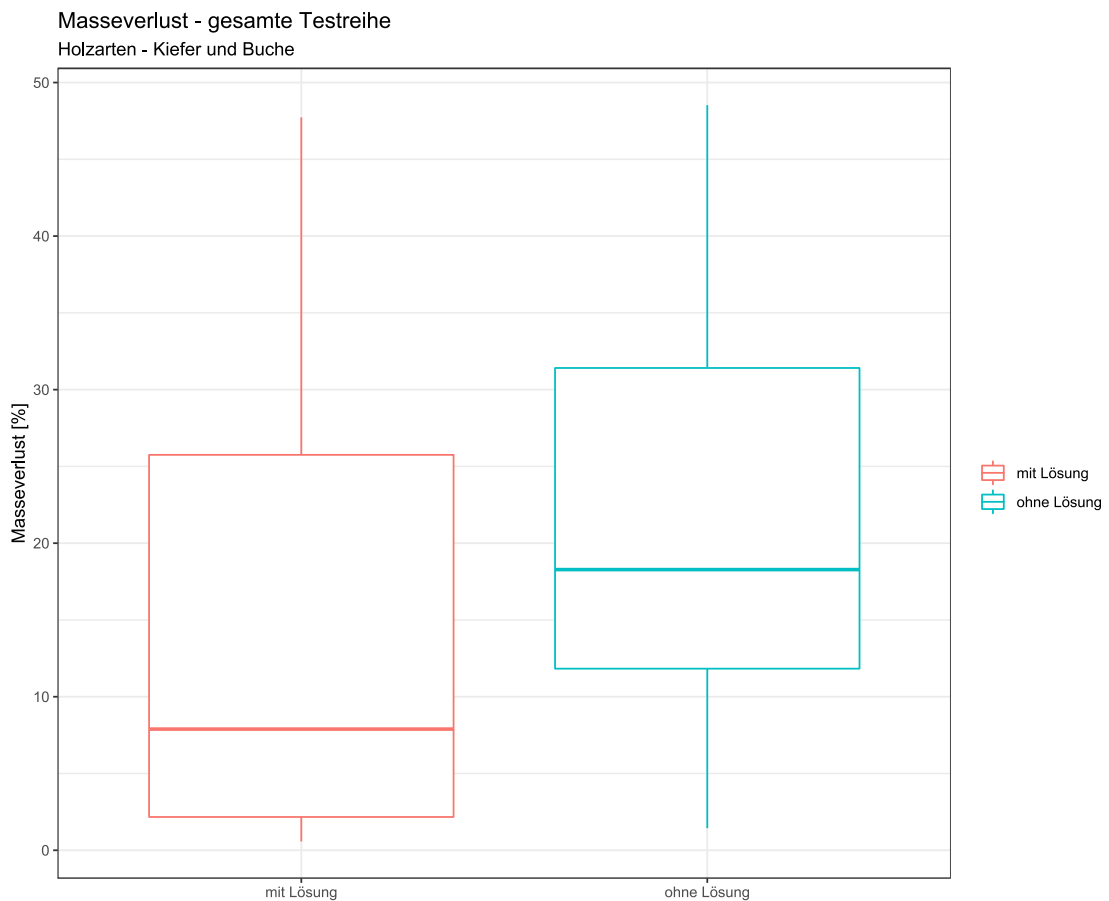


Abb. 22: Box-Whisker-Plot des Masseverlustes [%] der Pk der Holzarten Buche und Kiefer der gesamten Ausbauezeitpunkte, differenziert nach behandelten (mit Lösung) und unbehandelten Pk (ohne Lösung).

Die folgende Tabelle (Tab. 31) fasst die Werte für die Grafik (Abb. 22) zusammen. Dabei sind zusätzlich zum Median und Mittelwert, auch die Min.- und Max.-Werte und die Werte der ersten und dritten Quartile angegeben (1st Qu. bzw. 3rd Qu.).

Tab. 31: Statistische Auswertung mit Angabe der Werte Min. (Minimum) und Max. (Maximum), Median und Mittelwert und dem ersten und dritten Quartil (1st -first - Qu./3rd -third - Qu.), in Bezug auf den Masseverlust der gesamten Testreihe (s. Abb. 22).

Lösung	Min.	1st Qu.	Median	Mittelwert	3rd Qu.	Max.
mit Lösung	0,573	2,17	7,89	15,1	25,8	47,7
ohne Lösung	1,440	11,80	18,3	20,7	31,4	48,5

Die statistische Signifikanz der Unterschiede (genauer der Mittelwerte) ließ sich mit der Anova (R Funktion *aov*) testen. Außerdem bot sich ein Post-hoc-Test an, um die Unterschiede in den jeweiligen Faktorausprägungen zu untersuchen. Es wurde der Tukey-HSD-Test (Tukey, 1949) gewählt (R Funktion *TukeyHSD*), da dieser auch unterschiedliche Stichprobenumfänge erlaubt. Nun wurde simultan der Einfluss auf den Masseverlust in den Dimensionen Lösung, Zeit und Lösung:Zeit getestet<sup>4</sup>. Das Ergebnis der Anova ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 32).

Tab. 32: Anova-Test in Bezug auf den Masseverlust der gesamten Testreihe (s. Abb. 22).

Faktor	F-Wert	p-Wert
Lösung	5,22	0,0242
Zeit	6,6	0,000379
Lösung:Zeit	0,41	0,75

Die Faktoren Lösung und Zeit zeigten jeweils eine Signifikanz (p-Wert < 0,05). Die Faktorkombination Lösung:Zeit wies keine Signifikanz auf.

Der anschließend durchgeführte Tukey-Test (Tukey, 1949) lieferte folgendes Ergebnis (s. Tab. 33). Dabei zeigt die Spalte „diff“ die Differenz der Mittelwerte und „lwr“ und „upr“ definieren das 95 % Konfidenzintervall. „p adj“ ist der p-Wert, der mit 0,024 kleiner als 0,05 ausfiel, womit die Mittelwerte signifikant unterschiedlich sind.

Tab. 33: Tukey-Test in Bezug auf den Masseverlust der gesamten Testreihe (s. Abb. 22).

	diff	lwr	upr	p adj
ohne Lösung – mit Lösung	5,594333	0,7442584	10,44441	0,0241705

<sup>4</sup> Ein zuvor durchgeführter Test auf Normalverteilung des Masseverlustes führte zu einer Ablehnung der Nullhypothese. Dennoch wurde hier eine Anova und anschließend ein Post-hoc-Test durchgeführt.

In diesem Sinne ließ sich ein Unterschied zwischen dem Auftragen der Holzschutzlösung bezüglich des Masseverlustes zeigen. Allerdings war in dieser Betrachtung noch keine Aussage über den zeitlichen Verlauf möglich.

An diese Betrachtung schloss sich die Analyse der zeitlichen Entwicklung an. Zu erwarten war eine Zunahme der Mediane/Mittelwerte der zeitabhängigen Verteilungen. Dabei wurde der Einfluss der Holzschutzmittellösung erörtert. Hier wurden, nun zeitabhängige, Box-Whisker-Plots für die Analyse herangezogen. Die folgende Grafik (Abb. 23) verdeutlicht die Entwicklung des Masseverlustes. Die Statistiken sind in Tab. 34 zusammengefasst.

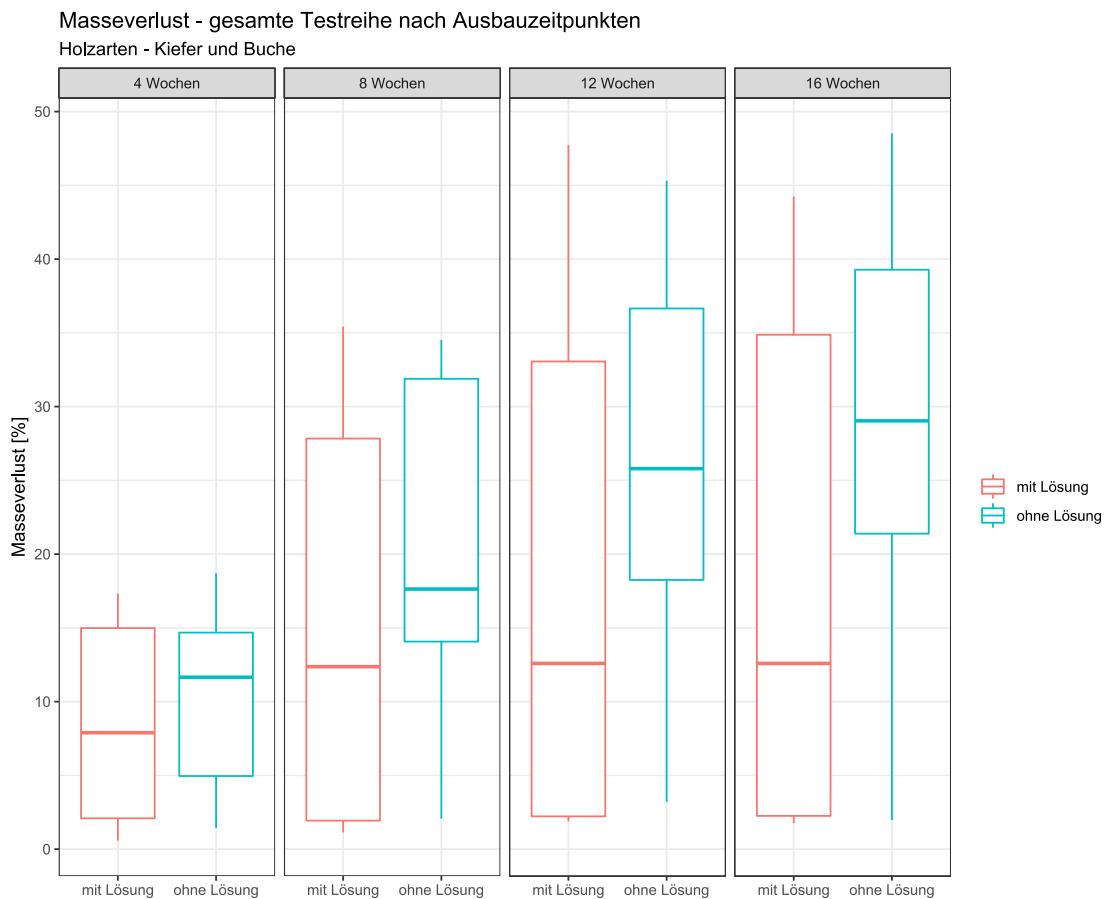


Abb. 23: Box-Whisker-Plot des Masseverlustes [%] der Pk der Holzarten Buche und Kiefer, differenziert nach behandelten (mit Lösung) und unbehandelten Pk (ohne Lösung) zu den jeweiligen Ausbauezeitpunkten nach 4, 8, 12 und 16 Wochen.

Die Ausbauezeitpunkte nach vier, acht und zwölf Wochen beinhalteten  $n=16$  Einzelmessungen, nach 16 Wochen  $n=12$ . Folgende Tabelle (Tab. 34) in Verbindung mit den obigen Boxplots lässt vermuten, dass der Masseverlust mit der Zeit stärker ansteigt, wenn keine Lösung aufgetragen wurde. Zumindest waren die Mediane beim Auftragen einer Lösung relativ zeitunabhängig.

Tab. 34: Statistische Auswertung mit Angabe der Werte Min. (Minimum) und Max. (Maximum), Median und Mittelwert und dem ersten und dritten Quartil (1st -first - Qu./3rd -third - Qu.), in Bezug auf den Masseverlust der gesamten Testreihe nach Ausbaugezeitpunkten (s. Abb. 23).

Nr.	Zeit [Wochen]	Lösung	Min.	1st Qu.	Median	Mittelwert	3rd Qu.	Max.
1	4	mit Lösung	0,573	2,09	7,89	8,59	15,0	17,3
2	4	ohne Lösung	1,440	4,96	11,70	10,30	14,7	18,7
3	8	mit Lösung	1,130	1,93	12,40	15,50	27,8	35,4
4	8	ohne Lösung	2,060	14,10	17,60	20,40	31,9	34,5
5	12	mit Lösung	1,880	2,22	12,60	18,30	33,1	47,7
6	12	ohne Lösung	3,210	18,20	25,80	26,30	36,7	45,3
7	16	mit Lösung	1,760	2,25	12,60	18,80	34,9	44,2
8	16	ohne Lösung	1,980	21,40	29,00	27,40	39,3	48,5

Die dargestellten Verteilungen konnten mit dem Tukey-Test (Tukey, 1949) untersucht werden (Tab. 35). Mithilfe des Tukey-Tests konnten keine Unterschiede in den Mittelwerten im zeitlichen Verlauf für die Holzarten Buche und Kiefer ermittelt werden. Die Werte „p adj“ zeigten keine Signifikanz ( $p > 0,05$ ).

Tab. 35: Tukey-Test in Bezug auf den Masseverlust der gesamten Testreihe nach Ausbaugezeitpunkten (s. Abb. 23).

Faktorausprägung	diff	lwr	upr	p adj
ohne Lösung 4 – mit Lösung 4	1,706437	-11,148455	14,56133	0,9988457
ohne Lösung 8 – mit Lösung 8	4,908125	-7,946768	17,76302	0,8752879
ohne Lösung 12 – mit Lösung 12	7,986062	-4,868830	20,84096	0,4652200
ohne Lösung 16 – mit Lösung 16	8,5	-8,4	25,41	0,78

#### Masseverlust – Testreihen der Buche-, Kiefer- und Roskastanien-Prüfkörper

Im folgenden Abschnitt sind alle Parameter der Testreihe mit einbezogen worden (Abb. 24). Die Pk der Buche, die dem Weißfäulepilz *Trametes versicolor* ausgesetzt waren, wiesen einen mit der Zeit ansteigenden Masseverlust auf, unabhängig von der Behandlung der Pk (Median von 43,98 % mit Lsg. u. 41,92 % ohne Lsg., nach 16 Wochen). Generell waren in Bezug auf den Masseverlust keine großen Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Pk festzustellen. Die einzelnen Werte streuten nicht sehr stark, mit Ausnahme der Pk nach zwölf Wochen. Dort lagen die Werte zwischen 39,70 % und 47,73 % (mit Lsg.) bzw. zwischen 35,51 % und 44,09 % (ohne Lsg.). Durch den Braunfäulepilz *Coniophora puteana* (Cp) konnte zu Beginn ein ähnlicher Masseverlust der Pk wie durch Tv festgestellt werden. Zum ersten Ausbaugezeitpunkt lagen die Mediane bei 14,62 % (mit Lsg.) und 15,98 % (ohne Lsg.) Im weiteren Prüfungsverlauf waren Unterschiede im Masseverlust der Pk zwischen den Prüfpilzen zu verzeichnen gewesen. Nach 16 Wochen wiesen die behandelten Buchen-Pk einen Masseverlust von 25,69 % bei Cp und 43,98 % bei Tv im Median auf.

Die Pk der Kiefer wurden mit dem gleichen Bakterien-Gemisch A getränkt wie die Pk der Buche, wiesen im Vergleich geringere Masseverluste über die Prüfungsdauer auf. Hier lag der Median bei 2,28 % für Tv und 2,17 % für Cp nach 16 Wochen. Nach dem gleichen Testzeitraum schwankten die Werte der unbehandelten Pk für Tv zwischen 24,26 % und 29,64 %. Beim Braunfäulepilz Cp gab es, neben ähnlich niedrigen Werten wie bei Tv, einen Ausreißer mit einem Masseverlust von 38,78 %. Generell fiel der Masseverlust der unbehandelten Pk (ohne Lösung) in Konfrontation mit Cp unterschiedlich aus. So streuten die Werte nach zwölf Wochen Prüfungsdauer zwischen 3,21 % und 45,31 %.

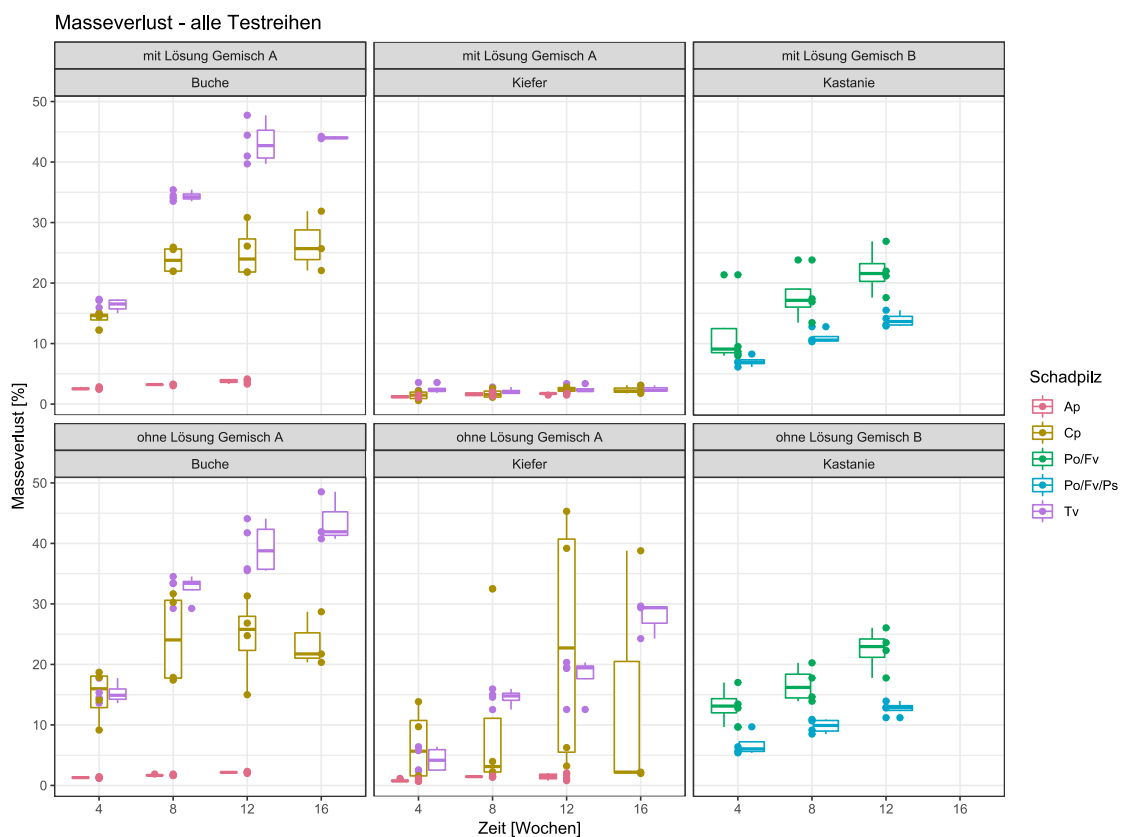


Abb. 24: Box-Whisker-Plot des Masseverlusts [%] der Pk über die Zeit [Wochen], differenziert nach behandelt (mit Lösung)/ unbehandelt (ohne Lösung) und den Holzarten Buche, Kiefer und Kastanie; Schadpilze: Ap=*Aureobasidium pullulans*, Cp=*Coniophora puteana*, Po/Fv/Ps=*Pleurotus ostreatus*/*Flammulina velutipes*/*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, Tv=*Trametes versicolor*; n=4.

### Bläuepilz *Aureobasidium pullulans*

Die dem Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* (Ap) ausgesetzten Pk der Holzarten Buche und Kiefer wurden mit dem Bakterien-Gemisch B behandelt. Neben der Bonitur der Pk-Oberfläche wurde auch der Masseverlust über den Prüfungszeitraum von zwölf Wochen ermittelt. Der Median der mit Lösung behandelten Pk stieg bei der Kiefer von 1,20 % (nach vier Wochen) über 1,61 % (nach

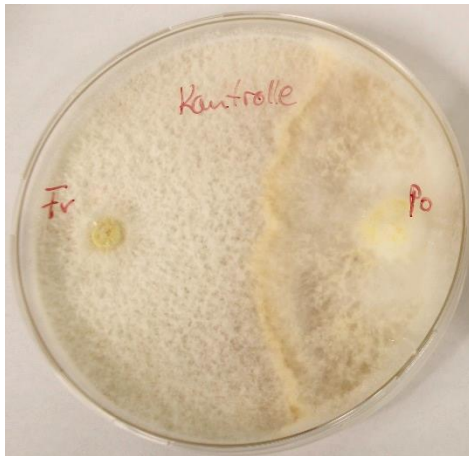
acht Wochen) auf 1,75 % (nach zwölf Wochen) an. Etwas darunter lagen jeweils die Werte für die unbehandelten Pk. Der Masseverlust bei den Pk der Buche wies mit der Zeit ansteigende Werte im Median auf: 2,51 % nach vier Wochen, 3,22 % nach acht Wochen u. 3,83 % nach zwölf Wochen.

#### Neue Rosskastanien-Komplexkrankheit

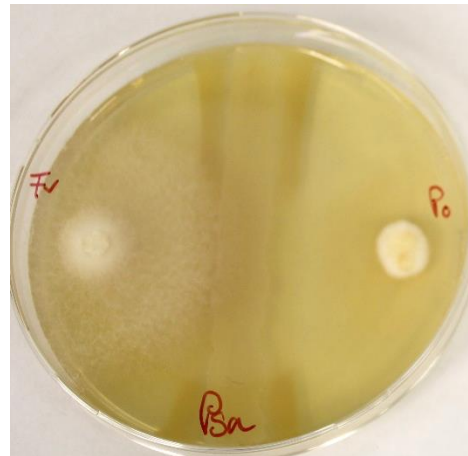
Im Rahmen der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit wurden Pk der weißblühenden Rosskastanie ebenfalls mit dem Bakterien-Gemisch B beimpft und der Masseverlust nach gleichen Ausbaupunkten ermittelt. Hierbei wurde nicht nur in behandelte und unbehandelte Pk unterschieden, sondern auch der Vergleich zwischen den Kulturplatten mit und ohne dem Schadbakterium *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) angestellt. Bei allen Pk war ein stetiger Anstieg des Masseverlusts über die Zeit erkennbar. Die mit Lösung behandelten Pk, die ausschließlich *Pleurotus ostreatus* und *Flammulina velutipes* ausgesetzt waren, wiesen einen Masseverlust von 9,09 % nach vier Wochen, 17,14 % nach acht Wochen und 21,57 % nach zwölf Wochen im Median auf. Nach zuletzt genannter Prüfungszeit lag der Median der unbehandelten Pk bei 22,95 %. Die mit Lösung behandelten Rosskastanien-Pk, die neben den beiden Weißfäulepilzen *P. ostreatus* und *F. velutipes* auch mit dem Bakterium Psa konfrontiert wurden, zeigten einen Masseverlust im Median von 6,94 %, 10,57 % und 13,64 % nach vier, acht bzw. zwölf Wochen. Bei den unbehandelten Pk konnte nach zwölf Wochen ein Masseverlust von 12,86 % ermittelt werden.

Anhand der Dual- und Multiplexkulturen war zu erkennen, dass *P. ostreatus* sich durch die Anwesenheit von Psa im Wachstum weniger stark ausbreitete im Vergleich zu den Kulturen, in denen Psa nicht aufgetragen wurde (Tab. 36). Die Dualkulturen von *P. ostreatus* und *F. velutipes* zeigten eine deutlich zu sehende Berührungszone beider Schadpilze (a). In der Multiplexkultur, in der die Schadorganismen der Rosskastanien-Komplexkrankheit zusammentrafen, war eine freibleibende Zone um Psa zu erkennen (b). Außerdem war eine leicht gelbliche Färbung des Mediums in den Petrischalen festzustellen (b, d und f).

Tab. 36: Dualkulturen Fv=*Flammulina velutipes*, Po=*Pleurotus ostreatus* ohne (a) und mit Psa=*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* in Form eines Streifens (b) und Multiplexkulturen der Holzschutzmitteltestreihe, mit und ohne Lösung (Bakterien-Gemisch B) bzw. Psa nach 12 Wochen (c-f), mit Angabe der Mittelwerte bzw. Mediane der Masseverluste in [%].



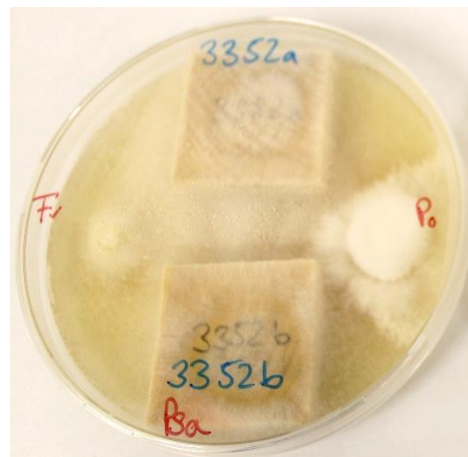
a: Dualkultur Kontrolle nach einer Woche



b: Multiplexkultur Kontrolle nach einer Woche



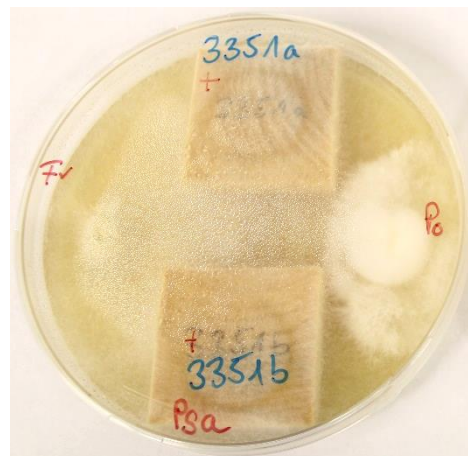
c: Mittelwert: 22,43 % Median: 22,95 %



d: Mittelwert: 12,72 % Median: 12,86 %



e: Mittelwert: 21,91 % Median: 21,57 %



f: Mittelwert: 13,92 % Median: 13,64 %

#### 4.7.2.2 Masseverlust und Ausbaufeuchte über die Zeit

In der Grafik der Abb. 25 ist zum Masseverlust [%] auf der y-Achse und den Ausbaupunkten [Wochen] auf der x-Achse zusätzlich die Ausbaufeuchte [%] mit aufgeführt. Neben der Unterteilung in die jeweilige Holzart und der Darstellung der Schadorganismen, ist die Kontrolle mit den Pk, die ausschließlich auf Agar ohne Schadpilz getestet wurden, mit dargestellt.

Bei den Pk der Buche waren die Kontroll-Werte sowohl vom Masseverlust als auch von der Ausbaufeuchte ähnlich den Werten der Pk, die mit dem Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* (Ap) in Kontakt gebracht wurden. Im Median lag die Ausbaufeuchte der Kontrolle mit Lösung zwischen 47,44 % (49,65 % ohne Lsg.) nach vier Wochen und 71,07 % (68,72 % ohne Lsg.) nach 16 Wochen.

Die Ausbaufeuchte der Buchen-Pk, die den Schadpilzen *Coniophora puteana* (Cp) und *Trametes versicolor* ausgesetzt waren, stieg mit der Zeit an. Die dem Schadpilz Tv ausgesetzten Pk zeigten eine höhere Ausbaufeuchte nach 16 Wochen (Median von 98,85 % mit Lsg., 113,37 % ohne Lsg.) als die Pk, die mit dem Braunfäulepilz Cp konfrontiert wurden (Median von 92,42 % mit Lsg., 87,79 % ohne Lsg.). Generell gab es in Bezug auf die Ausbaufeuchte der behandelten und unbehandelten Pk keine großen Unterschiede. Ein Anstieg des Masseverlusts der Pk über die Zeit ist zu verzeichnen gewesen, wobei dieser bei den Pk in Konfrontation mit dem Weißfäulepilz Tv höher war als mit dem Braunfäulepilz Cp (s. auch Abb. 24).

Der Masseverlust der behandelten Kiefer-Pk blieb über die Zeit konstant niedrig (s. dazu auch Abb. 24), wobei die Feuchtigkeit in den Prüfkörpern anstieg. In Konfrontation der Kiefer-Pk mit dem Schadpilz Tv lag die Ausbaufeuchte nach vier Wochen bei 103,75 % und nach 16 Wochen bei 136,29 % im Median. Die Ausbaufeuchte der unbehandelten Pk war deutlich unter den zuvor genannten Werten, bis auf den Ausbaupunkt nach 16 Wochen (Median von 140,06 %). Die Kiefer-Pk, die dem Schadpilz Cp ausgesetzt waren, wiesen eine weitaus höhere Ausbaufeuchte über die Zeit auf im Vergleich zu den Pk, die mit dem Weißfäulepilz Tv konfrontiert wurden. Hier stieg die Feuchtigkeit in den Pk im Median auf 175,44 % nach 16 Wochen Prüfungsdauer an, wobei diese bei den unbehandelten Pk 137,70 % (16 Wochen) im Median aufwies.

Der Masseverlust der behandelten bzw. unbehandelten Pk, die dem Bläuepilz Ap gegenüberstanden, blieb ähnlich niedrig wie der von den Kontroll-Pk. Ebenso verhielt es sich mit den Ausbaufeuchten. Unterschiede gab es bei den behandelten und unbehandelten Pk nach



zwölf Wochen. Dort lagen die Holzfeuchtwerte für Ap im Median bei 136,59 % (mit Lsg.) und 110,64 % (ohne Lsg.) und für die Kontroll-Pk bei 128,52 % (mit Lsg.) und 48,62 % (ohne Lsg.).

Die Rosskastanien-Pk, die in Konfrontation mit den Schadpilzen Po und Fv gebracht wurden, wiesen neben einem höheren Masseverlust auch eine Zunahme der Ausbaufeuchte über die Zeit auf (Median 156,20 % mit Lsg. u. 174,02 % ohne Lsg. nach zwölf Wochen). Im Vergleich dazu zeigten die Rosskastanien-Pk, die zusätzlich dem Bakterium Psa ausgesetzt waren, eine Ausbaufeuchte von 108,18 % mit Lsg. bzw. 100,44 % ohne Lsg. (zwölf Wochen).

Der Masseverlust der Kontroll-Pk blieb über die Prüfungsdauer gleichbleibend niedrig (< 5 %), bis auf einen Ausreißer, welcher einen Wert von 6,62 % aufwies. Die Ausbaufeuchten der behandelten Pk waren stets höher als die der unbehandelten Pk, im Median 79,72 %, 98,92 % und 109,09 % nach vier, acht und zwölf Wochen (ohne Lsg.: 70,42 %, 82,69 % und 97,18 %).

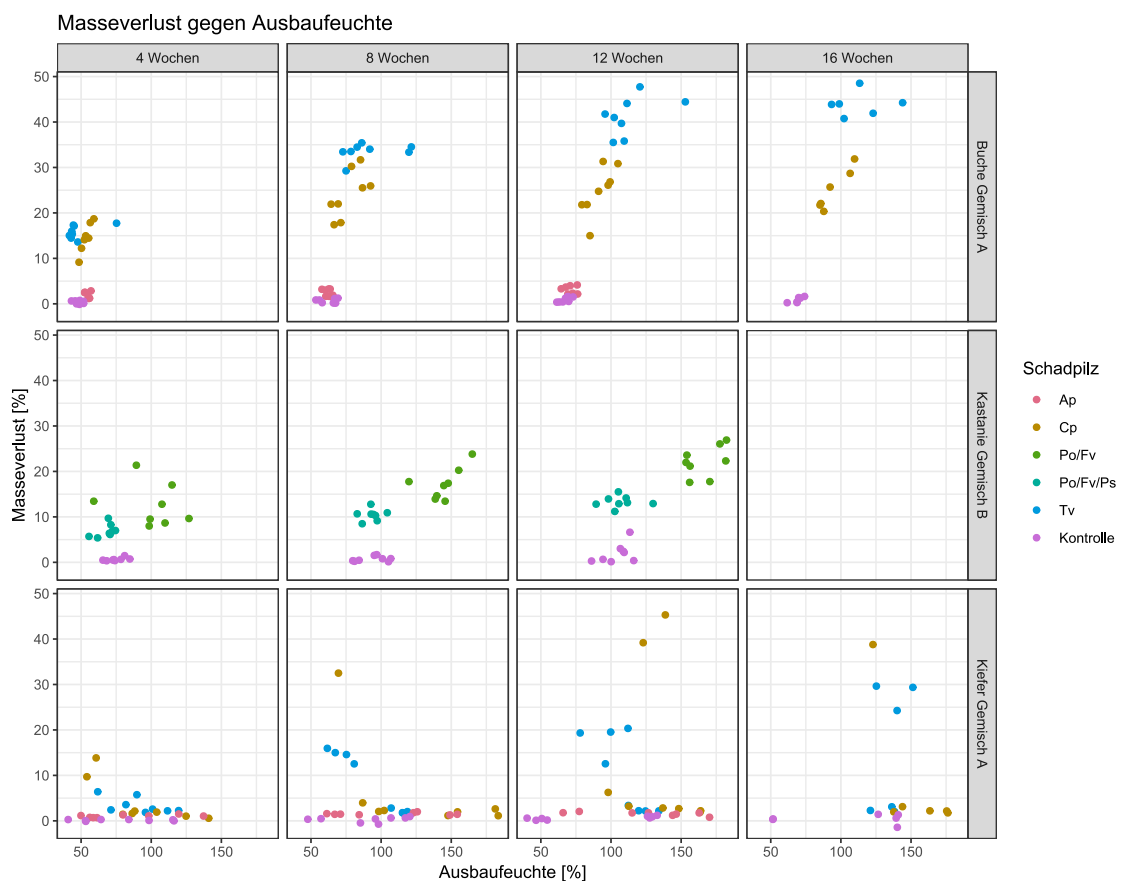


Abb. 25: Darstellung der Ausbaufeuchte [%] zusätzlich zum Masseverlust [%] über die Zeit [Wochen], nach der jeweiligen Holzart differenziert; Schadpilze: Ap=*Aureobasidium pullulans*, Cp=*Coniophora puteana*, Po/Fv/Ps=*Pleurotus ostreatus/Flammulina velutipes/Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, Tv=*Trametes versicolor*, Kontrolle; n=4.

#### 4.7.2.3 Bonitierung Bläuepilz *Aureobasidium pullulans*

Die mit Lösung behandelten Kiefer-Pk wiesen bereits nach vier Wochen eine starke Verblauung auf, sodass alle Pk mit einer 3 „Verfärbung fast über den kompletten Pk“ bonitiert wurden (Tab. 37). Auch nach acht bzw. zwölf Wochen blieb die Verfärbung der Pk auf einem gleichbleibenden Niveau. Die Pk, die ohne Lösung dem Prüfpilz gegenüberstanden, verblauten weniger stark mit Schwankungen zwischen 1 und 3 nach vier Wochen bzw. 1 und 2 nach acht Wochen. Nach zwölf Wochen lag die Bonitierung aller Pk bei 2. Im Vergleich zu den Kiefer-Pk war die Verfärbung der Buchen-Pk durch Ap nach vier Wochen geringer (Bonitierung aller Pk mit 2). Auch hier verblauten die mit Lösung versetzten Pk stärker als die unbehandelten Pk (Bonitierung aller Pk mit 1). Nach acht Wochen Prüfungsdauer waren die Werte der Bonitierung ähnlich denen der Kiefer-Pk. Erst nach zwölf Wochen zeigte sich eine sehr starke Verfärbung der Pk (Bonitierung aller Pk mit 4). Im Vergleich wiesen die unbehandelten Pk nach zwölf Wochen einen durchschnittlichen Wert von 1 auf.

Tab. 37: Bonitierung der mit dem Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* (Ap) konfrontierten Pk der Holzarten Kiefer und Buche über den Prüfungszeitraum von 12 Wochen.

Zeit [Wochen]	Bonitur Pk Kiefer		Bonitur Pk Buche	
	mit Lsg.	ohne Lsg.	mit Lsg.	ohne Lsg.
4	3	2	2	1
	3	1	2	1
	3	3	2	1
	3	2	2	1
8	4	2	4	2
	3	1	3	2
	4	1	3	2
	4	2	4	1
12	3	2	4	1
	3	2	4	1
	3	2	4	1
	3	2	4	1

## 5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit sollte der Anhaltspunkt, dass gewisse Baumarten über ein natürlich vorkommendes Abwehrsystem in Form von Mikroorganismen verfügen, bestätigt und weiterführend eine Auswahl antagonistischer Bakterienarten identifiziert und mithilfe von Dualkultur- und Holzprüfkörpertests näher untersucht werden. Eine erste antagonistische Wirksamkeit bestimmter Bakterienarten gegenüber Pilzkulturen konnte *in vitro* gezeigt werden. Weiterführend wurden die stärksten Antagonisten für die Entwicklung eines biologischen Holzschutzmittels ausgewählt und während ihrer vitalsten Wachstumsphase (stationäre Phase) auf Holzprüfkörper aufgebracht. Über eine Testdauer von 12 bzw. 16 Wochen wurden zwei Bakterien-Gemische gegenüber eines Braunfäule-, Weißfäule und Bläuepilzes getestet.

### 5.1 Material- und Methodendiskussion

#### 5.1.1 Probenherkunft

Die Beschaffung der Bakterienproben erfolgte an unterschiedlichen Standorten und zu verschiedenen Zeitpunkten über insgesamt ein Jahr. Die Wahl der Proben fiel auf drei verschiedene Bereiche an einem Baumindividuum, um mögliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Zusammensetzung der Mikroorganismen feststellen zu können. Hierzu zählten auch unterschiedliche Vitalitätszustände. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass morphologisch charakterisierte und identifizierte Bakterienarten sowohl auf gleichen als auch auf unterschiedlichen Baumarten vorkommen können. Manche Bakterienarten traten an der Borke spezifischer Baumarten öfter auf als andere, z.B. *Bacillus subtilis* bei der Baumart *Tilia platyphyllos*. Dies konnte auch beim Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Baumindividuen festgestellt werden. Viele der im weiteren Verlauf als Antagonisten identifizierten Bakterienarten wurden am Stammfuß der Baumindividuen entnommen, u.a. *Arthrobacter nitroguajacolicus*, *Bacillus subtilis* und *Stenotrophomonas rhizophila*. Das Vorkommen dieser Arten am unteren Stammabschnitt ist aufgrund der Nähe zu den oberen Erdschichten zu erklären, da z.B. Arten der Gattung *Arthrobacter* größtenteils in der Erde anzutreffen sind. Das Bakterium *B. subtilis* ist in den oberen Erdschichten weit verbreitet und ständig Hitze, Kälte oder Trockenheit ausgesetzt. Es wird angenommen, dass sich das Bakterium größtenteils in einem nicht wachsenden Zustand befindet und die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen eine Adaptionstrategie an das Leben im Boden darstellt. (Knott et al., 1995).

### 5.1.2 Nährmedium

Wenn Bakterien und Pilze zugleich getestet werden, ist die Wahl des Mediums in Bezug auf die Nährstoffe, den pH-Wert und weitere Wachstumskriterien entscheidend. Benko & Highley (1990b) testeten Bakterien und Pilze auf verschiedenen Medien und fanden heraus, dass das Vorkommen und die Menge an Metabolite von der Wahl des Mediums abhängt. Auf Pepton-Medium vermehrten sich Bakterienkolonien sehr gut, hingegen Pilze auf Malz-Medium besser wuchsen. Im Rahmen von Dualkulturen zeigten sowohl Bakterien- als auch Pilzarten ein gutes Wachstum auf Hefeextrakt-Agar (Benko & Highley, 1990b). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Medium mit einem pH-Wert von 6,8 (+/- 0,2) für die Versuchsreihe der Dualkulturen herangezogen.

### 5.1.3 Biochemische Untersuchung

Die Gramfärbung der zu untersuchenden Bakterienarten hat gezeigt, dass viele den grampositiven Bakterien zuzuordnen gewesen sind (Eitinger & Schlegel, 2007). Hinsichtlich der Biokontrolle in der Landwirtschaft gibt es bereits verschiedene Präparate, die gramnegative Bakterien, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*, beinhalten (Slininger et al., 1996). Dabei liegt die Schwierigkeit in der Herstellung und Anwendung, weil diese meist in gefrorenen Pellets vorliegen und kühl gehalten werden müssen, bevor eine Applikation erfolgen kann (Emmert & Handelsman, 1999). Grampositive Bakterien besitzen die Fähigkeit der Sporenbildung. Dies macht sie hitze- und trockenresistent und vereinfacht die Herstellung stabiler und einfach anzuwendener Produkte.

### 5.1.4 Molekularbiologische Identifizierung

Für die Identifizierung von Pilzen wird auf verschiedene molekulare Techniken zurückgegriffen, u.a. RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), welche z.B. für die Unterscheidung von Gebäudepilzen herangezogen wird (Schmidt & Moreth, 1998). Zur Differenzierung auf Artebene eignet sich die Methode der PCR mittels Pilzart-spezifischen Primern (PPSP) sehr gut, welche Moreth & Schmidt (2000) ebenfalls im Rahmen der Identifizierung von Gebäudepilzen zeigten. Häufig wird nach einer PCR die ITS-Region zur Charakterisierung und Identifizierung von Pilzarten herangezogen, welche sich für phylogenetische Analysen von nah verwandten Arten eignet (White et al., 1990). Zur Identifizierung von Bakterien kann die ITS-Region und der 16S rRNA-Bereich Anwendung finden (Schmidt et al., 2008). Die Analyse von Sequenzabschnitten der 16S rRNA-Gene ist weit verbreitet und wird für phylogenetische Zusammenhänge bevorzugt genutzt (Orphan et al., 2001; Weisburg et al., 1991). Die Datenbank der NCBI wies im Dezember 2009 einen Datenbestand von  $1,51 \times 10^6$  partieller oder vollständiger 16S rRNA-Sequenzen auf (Keller et al.,

2010). Durch den Vergleich selbst erarbeiteter Sequenzabschnitte mit Referenzsequenzen in Datenbanken wird eine genaue Charakterisierung der Bakterien möglich, weshalb diese Art der Identifizierung größtenteils angewendet wird. Lagacé et al. (2004) erhielten mithilfe spezifischer Primer, u.a. B27f (s. Kap. 3.5.2), Sequenzabschnitte des 16 S rRNA-Bereichs, die sie mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen. Eine eindeutige Identifizierung der Bakterienarten war so möglich, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall gewesen ist.

## 5.2 Ergebnisdiskussion

### 5.2.1 Dualkulturtestreihe

Im Rahmen der Konfrontationstests wurden Bakterien gezielt einem Gegenspieler ausgesetzt, um mögliche Reaktionen beider Mikroorganismen beobachten zu können. Es konnte festgestellt werden, dass die antagonistischen Bakterien ein unterschiedliches Wuchsverhalten aufwiesen. In einigen Fällen wurden die im Test verwendeten holzerstörenden Pilze bereits in einem frühen Stadium in ihrem Wachstum gehemmt ohne in sichtlichem Kontakt mit den Bakterien zu kommen, wie z.B. bei *Bacillus subtilis* (B4-4; Abb. 26).



Abb. 26: *Bacillus subtilis* (B4-4) in Konfrontation mit *Trametes versicolor* (P11); Vorderseite (links) und Rückseite (rechts).

Dieses lässt die allgemeine Annahme zu, dass bestimmte Inhibitoren, z.B. Enzyme wie Chitinasen und Proteasen, von Bakterien synthetisiert und ins Medium abgegeben werden (Grosch et al., 2007). Bernier et al. (1986) fanden heraus, dass fungizide Komponenten für die freibleibende Zone zwischen dem Bakterium *Bacillus subtilis* und dem Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* verantwortlich sind. Weiter wird beschrieben, dass die rasche Ausbreitung von Mikroorganismen auch für die Sicherung der Nährstoffe dienen kann (s. auch Abb. 27). Brodziak (1980) stellte fest, dass die Breite der freibleibenden Zone zwischen den Mikroorganismen mit der Produktionsmenge antibiotischer Stoffe zusammenhängt. Je breiter der Abstand von den konfrontierten Mikroorganismen zueinander desto mehr Antibiotika waren gebildet worden.

Eine weitere Untersuchung ergab, dass die Enzyme, die für die Herstellung der antibiotischen Stoffe (u.a. Mycobacillin) verantwortlich sind, erst nach Erreichen der exponentiellen Phase (bakterielle Vermehrung, s. Kap. 3.8) synthetisiert werden (Feio et al., 2004; Katz & Demain, 1977). Katz & Demain (1977) befassten sich mit der Gattung *Bacillus* und konnten *B. subtilis* 66 verschiedenen antimikrobiellen Peptiden zuordnen, neben Mycobacillin auch Subtilin und Bacilysin. Diese pathogeninduzierten Stoffe können auch in dieser Dualtestreihe eine Rolle gespielt haben. Insbesondere *B. subtilis* und *B. pumilus* wirkten stark antagonistisch gegenüber *Trametes versicolor* (B4-4 mit P=78,76 % bzw. B4-3 mit P=65,32 %). *B. mycoides* (B5-2) besaß die Fähigkeit sich rasch auf der Agarplatte zu etablieren, hingegen sich der recht langsam wachsende Prüfpilz *Daedalea quercina* (P30; s. auch Kap. 4.6.1, Tab. 27) nicht durchsetzen konnte (P=88,12 %; Abb. 27). Da die Hemmwirkung gegenüber allen Schadpilzen stark ausgeprägt war, sind diese drei Arten der Gattung *Bacillus* für die biologische Holzschutzmittellösung ausgewählt worden.



Abb. 27: *Bacillus mycoides* (B5-2) in Konfrontation mit *Daedalea quercina* (P30); Vorderseite (links) und Rückseite (rechts).

Das antagonistische Auftreten kann weiterführend gezielt bestimmten Wirksubstanzen zugeordnet werden, indem das Stoffgemisch z.B. mithilfe eines Gaschromatographens, zuerst aufgetrennt und die einzelnen Stoffe anschließend mit einem Massenspektrometer identifiziert werden. Dalmas et al. (2013) untersuchten mithilfe der analytischen Methode HPLC das Medium von Dualkulturen (Schadpilz und Bakterium), wobei die Probenentnahme aus dem sichtlich freien Bereich zwischen Bakterium und Pilz erfolgte. Die Ausscheidungsprodukte des Antagonisten der Gattung *Streptomyces* konnten u.a. den  $\beta$ -Carboline Alkaloiden, z.B. 1-Acetyl- $\beta$ -carboline, und antimikrobiellen Peptiden, z.B. Stenothricin, zugeordnet werden, die bekannterweise antimikrobiell wirken. Sind die Ausscheidungsprodukte der jeweiligen Bakterienart bereits bekannt, kann eine vereinfachte Methode angewendet werden, um diese fungizide Wirkung gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen aufzuzeigen. Dabei werden die Antibiotika direkt in das Medium geimpft und der zu testende Schadpilz auf die Agar-Platte aufgebracht, um folgend das Wachstum

des Testpilzes und der möglicherweise auftretenden Inhibitionszone zu dokumentieren (Pereira et al., 2013).

Der an der Zersetzung im Boden verbleibender Stubben und für Schäden am lagernden Holz beteiligte Schadpilz *Stereum hirsutum* (Liese, 1950) wuchs auf dem Medium sehr rasch und erreichte in den Kontrollen den Petrischalenrand innerhalb von 5 Tagen. Trotz dieses raschen Wachstums, beeinflusste das Bakterium *Viridibacillus arenosi* (B3-1) die Mycel-Ausbreitung mit einem Inhibitionsfaktor von  $P=88,14\%$  sehr stark (Abb. 28). Genauso wie die Gattung *Bacillus* gehören Bakterienarten von *Viridibacillus* zur Familie der *Bacillaceae*, sind stresstolerant und für ihre wachstumsfördernden Eigenschaften bei Pflanzen bekannt (Thakur et al., 2017).



Abb. 28: *Viridibacillus arenosi* (B3-1) in Konfrontation mit *Stereum hirsutum* (P1); Vorderseite (links) und Rückseite (rechts).

Würden diese Bakterienarten für ein biologisches Holzschutzmittel im Außenbereich Anwendung finden, wären die Eigenschaften von entscheidender Bedeutung, da diese verschiedenen Stress- und Witterungsbedingungen ausgesetzt wären.

*Pseudomonas fluorescens* (B4-9) wirkte ebenfalls wachstumshemmend gegenüber *Stereum hirsutum*, jedoch mit  $P=44,28\%$  weniger stark als gegenüber *Pleurotus ostreatus* mit  $P=66,09\%$ . Das aerobe Bakterium *P. fluorescens* kommt im Boden, im Wasser und auf der Pflanze vor und wird aufgrund seiner antagonistischen Eigenschaften bereits in der Landwirtschaft eingesetzt. Dabei besiedeln diese die Pflanzen sehr stark, fördern die Widerstandskraft der Pflanze gegenüber Pathogenen und produzieren diffusionsfähige und flüchtige antimykotische Stoffe, wie z.B. Phenazin, 2,4-diacetylphloroglucinol, Pyoluteorin und Pyrrolnitrin (Haas & Défago, 2005; Haas & Keel, 2003). *P. moraviensis* (B2-5) inhibierte das Mycelwachstum von *Daedalea quercina* und *Flammulina velutipes* mit  $P=76,09\%$  bzw.  $P=74,79\%$  gleichermaßen stark. Im Rahmen des Pflanzenschutzes haben *in vitro*-Versuche gezeigt, dass *P. moraviensis* antagonistisch gegenüber dem Erreger *Rhizoctonia solani* wirkt (Mrabet et al., 2013). *In vivo*-Versuche im Gewächshaus zeigten auf, dass *P. moraviensis* den Schaderreger im Befall nicht hindern konnte. Dies bestätigt,

dass im Anschluss an Laboruntersuchungen in jedem Fall Feldversuche folgen sollten, um die antagonistischen Eigenschaften von Bakterienarten gegenüber Pathogenen verifizieren zu können.

### 5.2.2 Holzschutzmitteltestreihe

Es gibt verschiedene Bakterienarten, die bereits für ihre antagonistische Wirkungsweise bekannt sind und auch dahingehend an Holz-Prüfkörpern untersucht wurden. Mithilfe der Bakterienart *Bacillus subtilis* wurde eine biologische Suspension hergestellt und Pk der Gelbkiefer (Splintholz) beimpft, um diese u.a. gegenüber *Aureobasidium pullulans* zu testen (Kreber & Morrell, 1992). Auch Bernier et al. (1986) führten Laborversuche zu *B. subtilis* und *Aureobasidium pullulans* durch, verwendeten jedoch Fichten-Pk. In beiden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch *B. subtilis* eine Verblauung weitestgehend ausblieb, im Vergleich zu den Kontrollen, in denen eine Verfärbung der Pk bereits nach einer Woche Prüfungsdauer zu erkennen gewesen ist. Mithilfe der aus der vorliegenden Arbeit biologischen Holzschutzmittellösung (Gemisch B) konnte ein solcher Schutz der Kiefer-Pk vor Verblauung durch *A. pullulans* nicht bestätigt werden. Möglicherweise war die Zeit des Eintauchens der Pk in die biologische Lösung, die hier über eine Dauer von 5 min. stattfand, im Vergleich zu einer Einwirkzeit von 24h (Bernier et al., 1986), nicht ausreichend, sodass sich die Bakterien auf den Prüfkörpern nicht gut genug etablieren konnten. Auch können die Bakterienarten, die im Gemisch B zusammengefügt wurden, sich gegenseitig in der Ausbreitung gehemmt haben. Jedes einzeln in Dualkultur gegenüber eines Schadpilzes getestete Bakterium wies antagonistische Eigenschaften auf, was jedoch nicht bedeuten muss, dass alle Bakterienarten in einer Lösung synergistisch wirken oder sich sogar deren antagonistisches Potential vervielfacht. Ein gutes Zusammenwirken verschiedener Bakterienarten konnte von Benko & Highley (1990a) im Rahmen von Untersuchungen gezeigt werden, indem sie eine biologische Lösung mit sechs verschiedenen Bakterienarten herstellten, bestehend u.a. aus drei Arten der Gattung *Streptomyces*. Deren Ansatz war, dass mithilfe unterschiedlicher Antagonisten ein größeres Spektrum an Holzschutz erreicht werden kann. Durch den ähnlichen Versuchsaufbau und nahezu identischer Methodik können deren Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Nach acht Wochen Prüfungsdauer ermittelten sie einen mittleren Masseverlust der Kiefer-Pk von 0,25 % gegenüber *T. versicolor*, im Vergleich zu den Kontrollen mit 11,82 % (Benko & Highley, 1990a). In dieser Forschungsarbeit wiesen die Kiefer-Pk nach gleicher Prüfungsdauer einen Masseverlust von ca. 2,1 % auf, die Kontrollen von ca. 14,52 %.

Der nach 16 Wochen Prüfungsdauer ermittelte Masseverlust der Kiefer-Kontrollen betrug nach dem Befall durch *T. versicolor* 27,76 %. Bei denen durch *T. versicolor* befallenen Buche-Kontrollen konnte ein mittlerer Masseverlust von 43,28 % festgestellt werden. Der für die Validität erforderliche



minimale Masseverlust nach 16 Wochen wurde mit 15 % für Kiefernholz und 20 % für Buchenholz erfüllt (DIN EN 113, 1996-11). Schlussfolgernd war die Gültigkeit dieser Versuchsreihe in Anlehnung an die Norm gegeben. Meyer et al. (2014) ermittelten bereits nach 12 Wochen Prüfungsdauer ähnliche Abbauwerte durch *T. versicolor*, ca. 28 % bei Kiefer-Pk und ca. 46 % bei Buche-Pk.

In Konfrontation mit dem Schadpilz *C. puteana* betrug der mittlere Masseverlust der Kiefer-Kontrollen 14,32 %, befand sich somit unter dem geforderten Mindestwert von 20 % (DIN EN 113, 1996-11). Anders verhielt es sich mit den Buche-Kontrollen, dessen mittlerer Masseverlust mit 23,59 % nach 16 Wochen über der Mindestanforderung von 20 % lag. Wälchli (1976) führte Abbauversuche zu *C. puteana* durch und erhielt nach zwölf Wochen einen Masseverlust von 37,7 % für Buche-Pk und 29,3 % für Kiefer-Pk. Nach gleichem Prüfungszeitraum wiesen die von Meyer et al. (2014) untersuchten Pk einen Masseverlust von ca. 32 % bei Buche und ca. 39 % bei Kiefer auf. Andere Untersuchungen zeigten, dass *C. puteana* nach 18 Wochen Prüfungszeit einen Masseverlust von 49 % bei Kiefer-Pk bewirkte (Schmidt et al., 2002). Durch die geringen Abbauraten der Kontrollen durch *C. puteana* ist die Wertung des geringeren Holzabbaus der mit biologischer Lösung behandelten Kiefer-Pk mit Vorsicht zu betrachten. Dieser lag nach 16 Wochen Prüfungsdauer bei 2,35 %, was einen deutlichen Unterschied zu den unbehandelten Pk erkennen lässt (mittlerer Masseverlust von 14,32 %). Die niedrigen Werte der Abbauraten könnten auf eine geringere Virulenz des Prüfpilzes zurückzuführen sein. Von daher sollte die Abbauaktivität dieses Stammes von *C. puteana* im Rahmen von Virulenzkontrollen überprüft werden.

Die optimalen Temperatur- und Wachstumsbedingungen für *C. puteana* sind auf künstlichem Nährmedium untersucht worden und liegen zwischen 20 und 32°C. (Huckfeldt & Schmidt, 2006; Schmidt, 1994). In der Klimakammer lag die Temperatur bei 22 +/- 2°C und war somit im optimalen Bereich für den Prüfpilz. Testreihen von Hausfäulepilzen an Kiefersplintholz über einen Zeitraum von 8-12 Wochen zeigten, dass sich der Feuchteanspruch von *C. puteana* in einem weiten Spektrum befindet. So ist das Minimum bei 21,5 % und das Maximum bei ca. 250 % einzuordnen, mit Voraussetzung, dass sich der Masseverlust > 2 % im Minimum und > 10 % im Optimum befindet (Huckfeldt & Schmidt, 2006; Huckfeldt et al., 2005).

Auffallend hoch waren die Feuchtigkeitswerte der ausgebauten Pk zu den jeweiligen Ausbaupunkten. Zu Beginn der Versuchsreihe wurde mithilfe von Vergleichs-Pk neben der Lösungsaufnahme auch die Holzfeuchte ermittelt und wies für die Pk der Kiefer 67,18 % und der Buche 19,98 % auf. Die mit der biologischen Lösung behandelten Kiefer-Pk zeigten steigende Feuchtigkeitswerte über die Zeit auf, in Konfrontation mit *T. versicolor* 131,85 % und mit *C. puteana*

165,20 % im Mittel nach 16 Wochen. Smith & Shortle (1991) führten Untersuchungen an Kernholz-Pk verschiedener Holzarten unter Laborbedingungen durch und stellten einen Anstieg der Holzfeuchtigkeit gegenüber *T. versicolor* zwischen 78 und 236 % innerhalb von 84 Tagen fest. Nach Behandlung der Pk mit der biologischen Lösung lag eine für *C. puteana* annehmbare Holzfeuchtigkeit vor, sodass ein Holzabbau möglich war. Generell ist die Holzfeuchtigkeit aller verwendeten Pk über den Prüfungszeitraum angestiegen. Insbesondere die behandelten Kiefer-Pk wiesen in Gegenüberstellung mit *C. puteana* hohe Ausbaufeuchten auf, wobei der Masseverlust niedrig gewesen ist. Als Beispiel ist die mittlere Holzfeuchtigkeit der Kiefer-Pk von 165,20 % nach 16 Wochen zu nennen. Hier lag der durchschnittliche Masseverlust bei 2,35 %. Daraus kann geschlossen werden, dass die Feuchtigkeit im Pk nicht allein durch den pilzbedingten Abbau zustande gekommen sein kann. Bei der Zersetzung von Cellulose werden neben der Veratmung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O auch Metabolite zur Synthese von Pilzbiomasse verwendet (Schmidt, 1994). Eine Annahme ist, dass es zu Interaktionen zwischen den eingesetzten Bakterien auf dem Pk und dem Pilz gekommen sein kann. Der Pilz wurde aufgrund der Bakterien-Präsenz davon abgehalten sich der Cellulose zu bedienen und hat die Nährstoffe des Mediums bevorzugt. Zur Abwehr des jeweiligen Gegenspielers können Sekundärstoffe gebildet worden sein. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei der Synthese gewisser Stoffe H<sub>2</sub>O entstanden ist, welches sich im Pk ansammelte. Vom Pilz ausgehende Guttationstropfen konnten nicht festgestellt werden (Schmidt, 1994). Im Vergleich dazu lagen die Feuchtigkeitswerte unbehandelter, jedoch mit Pepton-Flüssigmedium getränkter, Kiefer-Pk mit 141,33 % im Mittel unter den behandelten Pk nach 16 Wochen. Es ließ sich jedoch mit 14,32 % ein höherer Masseverlust dieser Pk ermitteln. Hier kann die Ausbaufeuchte durch den Holzabbau erklärt werden.

Gleiches trat bei den Kiefer-Pk in Konfrontation mit dem Prüfpilz *T. versicolor* auf. Bei den unbehandelten Pk kam es nach 16 Wochen zu einem mittleren Masseverlust von 27,76 %, wobei eine Ausbaufeuchte von 138,88 % ermittelt wurde. Bei den behandelten Kiefer-Pk konnte eine ähnliche Ausbaufeuchte von 131,65 % ausgemacht werden, jedoch kam es zu einem geringeren Masseverlust von 2,47 %.

Bei den Buchen-Pk stiegen mit dem Masseverlust auch die Werte der Ausbaufeuchte an. Dabei spielte die Behandlung der Pk keine große Rolle. Hier können gleiche Schlussfolgerungen wie zuvor bei den unbehandelten Kiefer-Pk gezogen werden, dass beim pilzbedingten Abbau neben der Synthese der Metabolite CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O entstanden sind, welche die mit der Zeit ansteigenden Ausbaufeuchten erklären.

Aufgrund der geringen Masseverluste bei den behandelten Kiefer-Pk über die Prüfungszeit, kann festgestellt werden, dass die biologische Lösung gewirkt haben muss. Trotzdem muss erklärt werden, warum die Wirkung bei den Buchen-Pk ausblieb. Ein Anhaltspunkt kann die bereits erwähnte Lösungsaufnahme sein, die mithilfe der Vergleichs-Pk ermittelt wurde. Mit einer Lösungsaufnahme der Kiefer-Pk von 334,67 kg/m<sup>3</sup> war die eingebrachte Menge an Lösung doppelt so hoch wie bei den Buchen-Pk mit 151,53 kg/m<sup>3</sup>. Es kann die Annahme gemacht werden, dass die höhere Menge, also auch höhere Präsenz antagonistischer Bakterien, die Prüfpilze im Abbau der Kiefer-Pk gehindert haben. Eine weitere Untersuchung könnte diese These stützen, indem entweder die Einbringmenge in die Buchen-Pk verdoppelt oder die Konzentration der einzubringenden Lösung in die Kiefer-Pk verringert werden würde.

Ein anderer Aspekt behandelt die chemische Zusammensetzung und spezifische Anatomie beider Holzarten. Generell befindet sich der pH-Wert von Holz im sauren Bereich, was es manchen Bakterien, z.B. der Gattung *Pseudomonas spp.*, schwierig macht sich auf der Holzoberfläche anzusiedeln und zu vermehren (Cruciata et al., 2018; Gaglio et al., 2016). Der pH-Wert der Oberflächen beider Holzarten ist mit 5,1 für Kiefernholz und 5,1-5,4 für Buchenholz etwa ähnlich, weshalb ein Unterschied hinsichtlich dieses Aspekts nicht auszumachen ist.

Ein anderer Anhaltspunkt betrifft die Anfangsholzfeuchte der jeweiligen Holzarten. Bei den Buchen-Pk lag diese bei ca. 19,98 %. Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften von Holz, kann es bei den Buchen-Pk, insbesondere zu Beginn der Testreihe, zu einer starken Absorption der biologischen Lösung gekommen sein. Dadurch könnte die Feuchtigkeit der Pk-Oberfläche zu gering für das Etablieren der Bakterienkolonien gewesen sein (Milling et al., 2005; Stienen et al., 2014). Auch aufgrund der Porosität von Holz ist eine raschere Feuchtigkeitsaufnahme als vergleichsweise bei Plastik, Keramik oder Stahl gegeben (Chiu et al., 2006). Untersuchungen von Mousavi et al. (1998) haben gezeigt, dass Holz hygroskopisch antimikrobiell wirkt, wenn es sich unter dem Fasersättigungsbereich befindet. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Kiefer-Pk mit einer zu Beginn vorliegenden Feuchtigkeit von ca. 67,18 %, nicht mehr antimikrobiell gewirkt haben können. Die Bakterienkolonien der Lösung konnten sich so auf der Holzoberfläche ansiedeln und gegenüber der Schadpilze behaupten.

Aufgrund der Aktualität der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit, wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit zusätzlich Untersuchungen angestellt. Dabei war das Zusammenwirken der einzelnen Schadorganismen der Komplexkrankheit von Bedeutung. Mithilfe der Dualkulturtests konnten gezielt Bakterienarten für das Gemisch B ausgewählt werden, die eine stärkere Hemmung

gegenüber der Schadpilze *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus* aufwiesen. Für die Abbauprobieren mit Holzproben der Roskastanie wurden Pk mit diesem Bakterien-Gemisch beimpft. Es sollte überprüft werden, ob ein Holzschutz mithilfe dieses Gemisches möglich ist und inwieweit der Schaderreger *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Psa) beim Holzabbau eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse dieser Testreihe ließen sich größtenteils mit denen von Müller-Navarra (2019) vergleichen, da derselbe Bakterienstamm des Schaderregers Psa als auch dieselben Schadpilze *F. velutipes* und *P. ostreatus* verwendet wurden. In dieser Testreihe konnte ein mittlerer Masseverlust der Roskastanien-Pk von 13,22 % nach vier Wochen, 16,65 % nach acht Wochen und 22,43 % nach zwölf Wochen ermittelt werden. Im Vergleich dazu zeigte sich ein ähnlicher Masseverlust von 11,26 %, 14,21 % und 18,86 % nach 31, 61 bzw. 86 Tagen (Tab. 38) bei gleichen Versuchsbedingungen (Müller-Navarra, 2019). Der durch den Schadpilz *P. ostreatus* verursachte Masseverlust wies die Mittelwerte 3,77 % (31 Tage), 7,01 % (61 Tage) und 10,42 % (86 Tage) auf und war niedriger als der durch den Schadpilz *F. velutipes* ermittelte Masseverlust von 6,90 % nach 31 Tagen, 11,58 % nach 61 Tagen und 11,01 % nach 86 Tagen. Der Holzabbau der Pk, die beiden Schadpilzen ausgesetzt waren, war demnach höher als der Abbau derjenigen Pk, die jeweils nur mit einem Pilz konfrontiert wurden. Dieses lässt darauf schließen, dass es bei der Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum zu erhöhter Aktivität und weiterführend zu einem stärkeren Abbau der Holzsubstanz gekommen sein muss. Zugleich konnte eine hohe Ausbaufeuchte von 170,98 % der unbehandelten Roskastanien-Pk, welche ausschließlich *F. velutipes* und *P. ostreatus* gegenüberstanden, festgestellt werden. Die Pk, die zusätzlich dem Schadbakterium Psa ausgesetzt waren, wiesen eine niedrigere Ausbaufeuchte mit 105,06 % im Mittel auf. Dieses spiegelt sich auch in Bezug auf den Masseverlust wider, welcher mit 6,79 %, 9,81 % und 12,72 % nach vier, acht bzw. zwölf Wochen, ermittelt wurde. Diese niedrigeren Masseverluste führen zur Annahme, dass Psa das Wachstum der Schadpilze gehemmt haben muss.

Tab. 38: Holzschutzmitteltestreihe der Roskastanie mit Angabe des arithmetischen Mittels des Masseverlusts ML [%], mit Vergleichswerten von Müller-Navarra (2019)\*; nach Inkubationszeiten von vier, acht und zwölf Wochen bzw. 31, 61 und 86 Tagen (n=4).

Ausbauzeitpunkt/ Schadorganismen	<i>F. velutipes</i> und <i>P. ostreatus</i> ML [%]		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i> mit <i>F. velutipes</i> und <i>P. ostreatus</i> ML [%]	<i>F. velutipes</i> ML [%]	<i>P. ostreatus</i> ML [%]
4 Wochen bzw. 31 Tage*	13,22	11,26*	6,79	6,90*	3,77*
8 Wochen bzw. 61 Tage*	16,65	14,21*	9,81	11,58*	7,01*
12 Wochen bzw. 86 Tage*	22,43	18,86*	12,72	11,01*	10,42*

*In-vivo*-Untersuchungen der neuartigen Rosskastanien-Komplexkrankheit weisen darauf hin, dass dieses wirtsspezifische Pathovar als Primärschädling gilt und oft eine Besiedlung der Sekundärschädlinge *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus* mit sich bringt (Müller-Navarra et al., 2014). Dieses lässt sich ebenfalls anhand von Inokulationsversuchen an der Rosskastanie bestätigen. Dabei konnte eine Infektion durch Psa insbesondere an Baumindividuen mit Wunden festgestellt werden (Schmidt et al., 2013). Dieser Aspekt behandelt die Reihenfolge des Schaderregerbefalls. Müller-Navarra (2019) zeigte, dass *F. velutipes* stärker als *P. ostreatus* an den untersuchten Rosskastanien vertreten war und die vorzeitige Anwesenheit von Psa das Wachstum dieses Pilzes förderte. In dieser Holzschutzmitteltestreihe wurden die beteiligten Schadorganismen zur gleichen Zeit aufgebracht und mit den behandelten bzw. unbehandelten Rosskastanien-Pk konfrontiert. Daher kann die Vermutung angestellt werden, dass dies der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Testreihe und den *in-vivo*-Untersuchungen ist.

In Bezug auf die Beimpfung der Rosskastanien-Pk mit der biologischen Lösung können keine deutlichen Unterschiede zu den unbehandelten Pk festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die biologische Lösung keinen Schutz vor dem Befall durch die Schadorganismen bieten konnte, obwohl beteiligte Bakterienarten wie *P. fluorescens* den Weißfäulepilz *P. ostreatus* mit einem Inhibitionsfaktor von P=66,09 % und *P. moraviensis* den Schadpilz *F. velutipes* mit P=74,97 % hemmten (Dualkulturen). Eine Erklärung kann sein, dass auch in dieser Testreihe die Behandlung der Pk mit der biologischen Lösung von 5 min. ggf. zu gering gewesen ist und sich dadurch die Bakterienkolonien nicht ausgiebig etablieren konnten. Im Vergleich zur vorherigen Testreihe mit *T. versicolor*, *C. puteana* und *A. pullulans*, die nur einem Erreger gegenüberstanden, wurden die Bakterienkolonien dieser Lösung zwei bzw. drei Schadorganismen zugleich ausgesetzt. Das kann dazu geführt haben, dass die Schadpilze, die nicht nur gut an die Gegebenheiten in der Petrischale angepasst waren, sondern auch einen höheren Masseverlust aufgrund möglicher Konkurrenz hervorriefen, gestärkt der Bakteriensuspension gegenüberstanden. Von daher kann geschlussfolgert werden, dass beim gemeinschaftlichen Auftreten von Schadpilzen eine größere Hemmwirkung der gegenübergestellten Antagonisten geleistet werden muss.

### **5.3 Bakterienarten als Potential für biologische Holzschutzmittel**

Für die Herstellung eines biologischen Holzschutzmittels müssen gewisse Aspekte in Bezug auf den risikofreien Umgang mit Mikroorganismen und den umweltbewussten und vor allem nachhaltigen Einsatz erfüllt sein. Sowohl die Herstellung und Lagerung als auch die Anwendung dieser Präparate müssen den wirtschaftlichen Gesichtspunkten entsprechen. Die Grundlage ist

eine leichte Vermehrbarkeit und eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegenüber extremen Witterungsbedingungen. Das Bakterium *B. subtilis* besitzt als Adaptionstrategie die Fähigkeit Endosporen zu bilden, was es widerstandsfähig gegenüber Hitze, Kälte und Trockenheit macht (Hentschel & Bochow, 1990). Durch die Stabilität der Sporen gegenüber UV-Strahlung (Bayliss et al., 1981) kann die Verwendung von *B. subtilis* in einem Präparat über einen längeren Zeitraum im Außenbereich möglich sein. Nach Junge et al. (2000) ist es möglich das Bakterium für mindestens zwei Jahre ungekühlt aufzubewahren, was für gute Lagerbedingungen spricht (Krisp, 2002; Schmiedeknecht et al., 1998). Das im Rahmen dieser Holzschutzmitteltestreihe verwendete Nährmedium liegt für *B. subtilis* mit einem pH-Wert von 7,2 im optimalen Bereich (Thimann, 1964). Bei einem pH-Wert zwischen 5,0 und 8,0 beschreiben Gupta & Utkhede (1986) eine maximale Produktion antifungaler Substanzen durch *B. subtilis*, mit einem Temperaturoptimum zwischen 21-28°C. Sowohl bei der Vermehrung der Bakterienkolonien als auch bei der Verwendung als biologisches Holzschutzmittel wurde in dieser Arbeit eine Temperatur von 27°C gewählt, welche sich im Bereich des Optimums für *B. subtilis* befindet. Reddy & Rahe (1989) gaben an, dass die Temperatur neben dem pH-Wert und hoher Feuchtigkeit die wichtigste Variable in Hinblick auf die Populationsdichte darstellt. *B. subtilis* wies bei Temperaturen zwischen 22-25°C eine höhere Populationsdichte auf als bei 17-19°C, ebenso wird den Nährstoffverhältnissen des Substrats eine Schlüsselrolle zugesprochen (Krebs et al., 1998). Mithilfe des Präparats FZB24® konnte auch bei niedrigen Temperaturen eine Stoffwechselaktivität von *B. subtilis* gezeigt werden, sodass bereits im Frühjahr ein Befall durch *Rhizoctonia solani* effektiv bei Kartoffeln entgegengewirkt werden konnte (Kilian et al., 1998). Der Grund dieser verschiedenen Wirkungsweisen liegt darin, dass einzelne Stämme von *B. subtilis* populationsdynamisch unterschiedlich auftreten können (Bochow, 1994; Reddy & Rahe, 1989).

Pseudomonaden werden aufgrund ihrer stabilen Populationen bereits seit längerem in der Abwehr von boden- und samenbürtigen Krankheitserregern eingesetzt (Kim et al., 1997a; Kim et al., 1997b; Weller, 1988), neben den Gattungen *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Micrococcus* und *Flavobacterium* (Darbyshire & Greaves, 1973). Bei *in vivo*-Versuchen von Kartoffelwurzeln zeigten Loper et al. (1985), dass bei Temperaturen zwischen 12-18°C fluoreszierende Pseudomonaden beste Ergebnisse lieferten. Im Vergleich dazu lag das Temperatur-Optimum im Rahmen von *in vitro*-Versuchen bei 28°C bzw. 30°C. Ähnliche Erkenntnisse konnte auch Parke (1991) gewinnen, der eine 100x geringere Populationsdichte eines Stammes von *Pseudomonas fluorescens* Hv37a (James & Gutterson, 1986) bei 24°C im Vergleich zu Temperaturen zwischen 16 und 20°C feststellte. Schlussfolgernd können gewisse Bakterienarten auch bei niedrigeren

Temperaturen antagonistisch gegenüber Pathogenen wirken, was in Bezug auf die Anwendung von biologischen Präparaten bedeutsam ist.

Weller (1988) untersuchte die Beständigkeit der Wirkung biologischer Bakterienisolate. Untersuchungen über mehrere Jahre zeigten, dass eine Langzeitwirkung aufgrund uneffizienter Wurzelbesiedlung ausblieb (Bull et al., 1991; Thompson et al., 1996). Um die Wirksamkeit biologischer Pflanzen- bzw. Holzschutzmittel gewährleisten zu können, sind Kenntnisse über die Wirkungsweise von Präparaten auf Basis von Mikroorganismen erforderlich. Dabei kann eine zu hohe Spezifität eines einzelnen Antagonisten aufgrund verschiedener Umweltbedingungen zu Wirkungsminderungen führen (Metzler, 1991). Eine höhere ökologische Stabilität könnte mithilfe einer Kombination mit anderen Präparaten oder Mikroorganismen erreicht werden (Graf, 2001). Die Voraussetzung dafür ist, dass sich die Kombinationspartner nicht antagonistisch zueinander verhalten, sondern in ihrem Hemmvermögen synergistisch ergänzen.

## 6 Ausblick

Viele Untersuchungen hinsichtlich der Schutzwirkung antagonistischer Bakterienarten gegenüber unterschiedlichen pflanzenpathogenen Pilzen zeigten im Rahmen von Laborversuchen positive Ergebnisse, die bisher nicht in Form von Freilandversuchen bestätigt werden konnten (Benko & Highley, 1990a). Um jedoch ein marktfähiges biologisches Holzschutzmittel herstellen zu können, sollten Prüfungen im Rahmen von Feldversuchen durchgeführt werden. Dabei gilt es eine homogene und schadfreie Besiedlung der antagonistischen Bakterien auf Holz zu schaffen und zugleich einen Schutz vor pathogenen Mikroorganismen zu garantieren. Die Bakterienisolate müssen bestimmten Umweltbedingungen wie Hitze- und Trockenperioden, z.B. durch die Bildung von Dauersporen, standhalten und genügsam bezüglich ihres Nahrungs- und Feuchteanspruchs sein (Graf, 2001; Junge et al., 2000). Die Möglichkeit biologische Alternativen zu Pestiziden in der Landwirtschaft oder marktüblichen Schutzmitteln in der Forst- und Holzwirtschaft anbieten zu können, ist in Bezug auf den gesundheitlichen Aspekt für Lebewesen, insbesondere für Insekten, bedeutsam. Für die Zukunft sind Alternativen zu chemischen Mitteln gefragt. Es bedarf weiterhin intensive Forschung, um ein Verständnis über die Wirkmechanismen von Mikroorganismen hinsichtlich wachstumshemmender- und fördernder Eigenschaften zu bekommen.



## 7 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Annesi, T., Curcio, G., D'Amico, L., & Motta, E. (2005). Biological control of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinea* by *Phlebiopsis gigantea*. *Forest Pathology*, 35(2), 127-134. doi:10.1111/j.1439-0329.2004.00394.x
- Bailey, B., Bae, H., Strem, M., Roberts, D., Thomas, S., Crozier, J., Samuels, G., Choi, I.-Y., & Holmes, K. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224(6), 1449-1464.
- Baker, G., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.
- Bariska, M., Osuský, A., & Bosshard, H. (1983). Änderung der mechanischen Eigenschaften von Holz nach Abbau durch Basidiomyceten. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 41(6), 241-245.
- Bayliss, C., Waites, W., & King, N. (1981). Resistance and structure of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of applied bacteriology*, 50(2), 379-390.
- Benko, R., & Highley, T. (1990a). Biological Control of Wood-Attacking Fungi Using Bacteria. In G. Llewellyn & C. O'Rear (Eds.), *Biodeterioration Research* (Vol. 3, pp. 327-332): Springer US.
- Benko, R., & Highley, T. L. (1990b). Selection of media for screening interaction of wood-attacking fungi and antagonistic bacteria. *Mater Org*, 25, 173-180.
- Bernier, R., Desrochers, M., & Jurasek, L. (1986). Antagonistic effect between *Bacillus subtilis* and wood staining fungi. *Journal of the Institute of Wood Science*, 10(5), 214-216.
- Blanchette, R. A. (1984). Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3), 647-653.
- Bochow, H. (1994). Populationsdynamisches Verhalten von *Bacillus subtilis* beim Einsatz als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz. *Mitt. ad Biol. Bundesanst. f. Land-und Forstwirtschaft*, 301, 355.
- Braun-Kiewnick, A., & Sands, D. (2001). Gram negative bacteria. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd Edition. APS Press, St. Paul, MN, 84-120.
- Brischke, C., Behnen, C. J., Lenz, M. T., Brandt, K., & Melcher, E. (2012). Durability of oak timber bridges – Impact of inherent wood resistance and environmental conditions. *International biodeterioration & biodegradation*, 75, 115-123. doi:10.1016/j.ibiod.2012.09.010
- Brodziak, Ł. (1980). Biotic interactions of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. with fungi which occur the most frequently in its cultures. *Acta Mycologica*, 16(2), 195-201.
- Bruce, A., King, B., & Highley Terry, L. (1991). Decay Resistance of Wood Removed from Poles Biologically Treated with *Trichoderma*. *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* (Vol. 45, pp. 307).
- Bull, C. T., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1991). Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81(9), 954-959.
- Butin, H. (1989). *Krankheiten der Wald-und Parkbaume: Diagnose-Biologie-Bekämpfung*: George Thieme Verlag.
- Chiu, T. H., Duan, J., Liu, C., & Su, Y. C. (2006). Efficacy of electrolysed oxidizing water in inactivating *Vibrio parahaemolyticus* on kitchen cutting boards and food contact surfaces. *Letters in applied microbiology*, 43(6), 666-672.
- Croan, S., & Highley, T. (1994). Biological Control of Sapwood-Inhabiting Fungi by Metabolites from *Streptomyces Rimosus*. In G. Llewellyn, W. Dashek, & C. O'Rear (Eds.), *Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration* (Vol. 4, pp. 243-256): Springer US.

- Cruciata, M., Gaglio, R., Scatassa, M. L., Sala, G., Cardamone, C., Palmeri, M., Moschetti, G., La Mantia, T., & Settanni, L. (2018). Formation and characterization of early bacterial biofilms on different wood typologies applied in dairy production. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4).
- Dalmas, F., Astarita, L., DeFilippis, L., Magel, E., Fiedler, H.-P., Bauer, R., & Hampp, R. (2013). Growth inhibition of an *Araucaria angustifolia* (Coniferopsida) fungal seed pathogen, *Neofusicoccum parvum*, by soil streptomyces. *BMC Microbiology*, 13(1), 1-10. doi:10.1186/1471-2180-13-168
- Darbyshire, J. F., & Greaves, M. P. (1973). Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pesticide science*, 4(3), 349-360.
- Domanski, S., Orlos, H., & Skirgiello, A. (1973). *Fungi: Polyporaceae 2, Mucronoporaceae 2, Ganodermataceae, Bondarzewiaceae, Boletopsidaceae and Fistulinaceae*.-332 pp: Warsaw.
- Dujesiefken, D., Gaiser, O., Jaskula, P., Kowol, T., & Stobbe, H. (2016). Das Rosskastanien-Sterben - ausgelöst durch *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Dujesiefken, D. (Hrsg.) Jahrbuch der Baumpflege 2016* (Haymarket Media), 99-107.
- Dujesiefken, D., & Liese, W. (2015). *The CODIT Principle and Arboriculture: Implications for Best Practice*: International Society of Arboriculture.
- Eitinger, T., & Schlegel, H. G. (2007). *Allgemeine mikrobiologie*: Georg Thieme Verlag.
- Emmert, E. A., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*: Springer Science & Business Media.
- Falck, R., & Haag, W. (1927). Der Lignin- und der Cellulose-Abbau des Holzes, zwei verschiedene Zersetzungsprozesse durch holz-bewohnende Fadenpilze. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 60(1), 225-232.
- Feio, S., Barbosa, A., Cabrita, M., Nunes, L., Esteves, A., Roseiro, J., & Curto, M. (2004). Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(5), 199-203. doi:10.1007/s10295-004-0133-x
- Freitag, M., & Morrel, J. J. (1991). Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(4), 317-323.
- Gaglio, R., Crucjata, M., Di Gerlando, R., Scatassa, M. L., Cardamone, C., Mancuso, I., Sardina, M. T., Moschetti, G., Portolano, B., & Settanni, L. (2016). Microbial activation of wooden vats used for traditional cheese production and evolution of neoformed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 585-595.
- Göbelmann, M. (2008). Schimmelpilzbildung im Bereich der Untersicht hölzerner Dachüberstände–Ursachen und Vermeidung. *Bauphysik*, 30(2), 75-82.
- Graf, E. (2001). Biologische und biotechnologische Verfahren gegen holzbewohnende Pilze- Eine Übersicht. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 59(5), 356-363.
- Green, S., Laue, B., Fossdal, C. G., A'Hara, S. W., & Cottrell, J. E. (2009). Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 58(4), 731-744.
- Grosch, R., Lottmann, J., & Berg, G. (2007). Einfluss von antagonistisch wirkenden *Trichoderma*-Isolaten auf den bodenbürtigen Erreger *Rhizoctonia solani*. *Landbauersforschung Völknerode-FAL Agricultural Research Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany*, 53.

- Gupta, V., & Utkhede, R. (1986). Factors Affecting the Production of Antifungal Compounds by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis*, Antagonists of *Phytophthora cactorum* 1. *Journal of phytopathology*, 117(1), 9-16.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307-319.
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 117-153.
- Hartley, C. C. P., Davidson, R. W., & Crandall, B. S. (1961). Wetwood, bacteria, and increased pH in trees.
- Hentschel, K., & Bochow, H. (1990). Biologischer Pflanzenschutz gegen bodenbürtige Mykosen durch Einsatz bakterieller Antagonisten beim Gemüsebau im Gewächshaus. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*(266), 293.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3233-3241.
- Hof, T. (1971). Water storage as cause of occasional paint failure on preservative treated spruce in the Netherlands. *Mitt Bundesforschungsanst Forst-Holzwirtschaft*, 83, 59-70.
- Holdenrieder, V. O. (1984). Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung von *Heterobasidion annosum* an Fichte (*Picea abies*) mit antagonistischen Pilzen II. Interaktionstests auf Holz. *European Journal of Forest Pathology*, 14(3), 137-153.
- Hoster, F. (2003). *Identifizierung von Chitinasen mit fungizider Wirkung*. Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen.
- Huckfeldt, T., & Schmidt, O. (2006). *Hausfäule- und Bauholzpilze: Diagnose und Sanierung*: R. Müller.
- Huckfeldt, T., Schmidt, O., & Quader, H. (2005). Ökologische Untersuchungen am Echten Hausschwamm und weiteren Hausfäulepilzen. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 63(3), 209-219.
- James, D. W., Jr., & Gutterson, N. I. (1986). Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 1183-1189. doi:10.1128/AEM.52.5.1183-1189.1986
- James, G. (2010). Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene *PCR for clinical microbiology* (pp. 209-214): Springer.
- Jaric, M., Segal, J., Silva-Herzog, E., Schneper, L., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2013). *Better primer design for metagenomics applications by increasing taxonomic distinguishability*. Paper presented at the BMC proceedings.
- Jeyaseelan, E. C., & Jashothan, P. J. (2012). In vitro control of *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) by *Ricinus communis* L. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(9), 717-721.
- Junge, H., Krebs, B., & Kilian, M. (2000). Strain selection, production, and formulation of the biological plant vitality enhancing agent FZB24® *Bacillus subtilis*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 1(1), 94-104.
- Katz, E., & Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, 41(2), 449.
- Keller, P. M., Hombach, M., & Bloemberg, G. V. (2010). 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. *Biospektrum*, 16(7), 755.
- Kilian, M., Junge, H., Steiner, U., & Krieg, U. (1998). Einfluss von Umweltfaktoren auf die ertragssteigernde Wirkung von FZB24 *Bacillus subtilis* bei Kartoffeln. *Mitt. Biol. BundAnst. Ld-u. Forstw. H*, 357, 361.

- Kim, D.-S., Cook, R. J., & Weller, D. M. (1997a). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87(5), 551-558.
- Kim, D.-S., Weller, D. M., & Cook, R. J. (1997b). Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 87(5), 559-564.
- Klaassen, R. K. (2008). Bacterial decay in wooden foundation piles – Patterns and causes: A study of historical pile foundations in the Netherlands. *International biodeterioration & biodegradation*, 61(1), 45-60.
- Klaassen, R. K., & van Overeem, B. S. (2012). Factors that influence the speed of bacterial wood degradation. *Journal of cultural heritage*, 13(3), S129-S134.
- Knott, A., Russell, A., & Dancer, B. (1995). Development of resistance to biocides during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of applied bacteriology*, 79(5), 492-498.
- Kreber, B., & Morrell, J. J. (1992). Ability of selected bacterial and fungal bioprotectants to limit fungal stain in ponderosa pine sapwood. *Wood and Fiber Science*, 25(1), 23-34.
- Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Workie, M. A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., & Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains/Anwendung von *Bacillus subtilis* als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz. I. Aktivitäten und Charakterisierung von *Bacillus* sibtills-Stämmen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 181-197.
- Kreisel, H. (1961). *phytopathogenen Grosspilze Deutschlands*.
- Krieglsteiner, G. J. (2000). *Grosspilze Baden-Württembergs*: E. Ulmer.
- Krisp, A. (2002). Analyse der Induktion der generellen Stressantwort von *Bacillus subtilis* während des Wachstums bei niedriger Temperatur-Charakterisierung der Interaktionen von RsbW mit SigB und RsbV.
- Kumar, D., & Gupta, R. (2004). Antagonistic *Streptomyces violaceus*niger to control wood-rotting fungi. *Biodiversity and natural products: Chemistry and medical applications*.
- Kumar, D., & Gupta, R. K. (2005). Biocontrol of wood-rotting fungi.
- Lagacé, L., Pitre, M., Jacques, M., & Roy, D. (2004). Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2052-2060.
- Lehr, N. A., Schrey, S. D., Bauer, R., Hampp, R., & Tarkka, M. T. (2007). Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. *New Phytologist*, 174(4), 892-903.
- Lichtenauer, A., Kowol, T., & Dujesiefken, D. (2013). Pilze bei der Baumkontrolle: Erkennen wichtiger Arten an Straßen-und Parkbäumen. *Braunschweig Thalacker Medien*.
- Liese, J. (1950). Zerstörung des Holzes durch Pilze und Bakterien *Handbuch der Holzkonservierung* (pp. 44-111): Springer.
- Liese, W. (1964). Über den Abbau verholzter Zellwände durch Moderfäulepilze. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 22(8), 289-295.
- Liese, W. (1966). Mikromorphologische Veränderungen beim Holzabbau durch Pilze. *Mat Org*, 1(Suppl No), 13-26.
- Liese, W. (1970). The action of fungi and bacteria during wood deterioration. *The action of fungi and bacteria during wood deterioration.*, 81-94.
- Liese, W., & Ammer, U. (1964). Über den Befall von Buchenholz durch Moderfäulepilze in Abhängigkeit von der Holzfeuchtigkeit. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 18(4), 97-102.
- Liese, W., & Schmid, R. (1962). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Abbau des Holzes durch Pilze. *Angew. Bot*, 36, 291-298.
- Lo, C.-T., & Lin, C.-Y. (2002). Screening strains of *Trichoderma* spp for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*(4), 215-220.

- Loper, J. E., Haack, C., & Schroth, M. N. (1985). Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 416-422.
- Lundborg, A., & Unestam, T. (1980). Antagonism against *Fomes annosus*. Comparison between different test methods in vitro and in vivo. *Mycopathologia*, 70(2), 107-115.
- Mertelik, J., Kloudova, K., Pankova, I., Krejzar, V., & Kudela, V. (2013). Occurrence of horse chestnut bleeding canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* in the Czech Republic. *Forest Pathology*, 43(2), 165-167.
- Messner, K., Fackler, K., Lamaipis, P., Gindl, W., Srebotnik, E., & Watanabe, T. (2003). Overview of white-rot research: where we are today (Vol. 845). Goodell, B., Nicholas, D.D., Schultz, T.P. Wood deterioration and preservation, advances in our changing world.: ACS Publications.
- Metzler, B. (1991). Application, nutritional factors, population dynamics and detection of antagonists *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology* (Vol. 23, pp. 341-349): Elsevier.
- Metzler, B., Thumm, H., & Scham, J. (2005). Stubbenbehandlung vermindert das Stockfäulerisiko an Fichte. *AFZ/Der Wald*, 60, 52-55.
- Meyer, L., Brischke, C., Melcher, E., Brandt, K., Lenz, M.-T., & Soetbeer, A. (2014). Durability of English oak (*Quercus robur* L.)—Comparison of decay progress and resistance under various laboratory and field conditions. *International biodeterioration & biodegradation*, 86, 79-85.
- Milling, A., Smalla, K., Kehr, R., & Wulf, A. (2005). The use of wood in practice—a hygienic risk? *Holz als Roh-und Werkstoff*, 63(6), 463-472.
- Moreth, U., & Schmidt, O. (2000). Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung*, 54(1), 1-8.
- Mousavi, S., Desobry, S., & Hardy, J. (1998). Mathematical modelling of migration of volatile compounds into packaged food via package free space. Part I: Cylindrical shaped food. *Journal of food engineering*, 36(4), 453-472.
- Mrabet, M., Djebali, N., Elkahoui, S., Miloud, Y., Saidi, S., Tarhouni, B., & Mhamdi, R. (2013). Efficacy of selected *Pseudomonas* strains for biocontrol of *Rhizoctonia solani* in potato. *Phytopathologia Mediterranea*, 449-456.
- Müller-Navarra, A. (2019). Untersuchung des Gefahrenpotentials von *Pleurotus ostreatus* ((Jacq.: Fr.) Kummer) und *Flammulina velutipes* ((Curtis: Fr.) Singer innerhalb der neuen Rosskastanien-Komplexkrankheit.
- Müller-Navarra, A., Gaiser, O., Moreth, U., Dujesiefken, D., & Magel, E. A. (2014). New disease on red flowering horse chestnut (*Aesculus× carnea* Hayne) and the molecular identification of the involved pathogens. *Journal für Kulturpflanzen*, 66(12), 417-423.
- Nagpure, A., Choudhary, B., & Gupta, R. K. (2014). Mycolytic enzymes produced by *Streptomyces violaceusniger* and their role in antagonism towards wood-rotting fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), 397-407. doi:10.1002/jobm.201200474
- Nicolotti, G., Gonthier, P., & Varese, G. (1999). Effectiveness of some biocontrol and chemical treatments against *Heterobasidion annosum* on Norway spruce stumps. *European Journal of Forest Pathology*, 29(5), 339-346.
- Nilsson, T. (1976). Soft-rot fungi-decay patterns and enzyme production. *Material und Organismen (Germany, FR)*.
- Oppermann, A. (1951). Das antibiotische Verhalten einiger holzzersetzender Basidiomyceten zueinander und zu Bakterien. *Archiv für Mikrobiologie*, 16(1-4), 364-409.
- Orphan, V., Hinrichs, K.-U., Ussler, W., Paull, C. K., Taylor, L., Sylva, S. P., Hayes, J. M., & Delong, E. (2001). Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing

- bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1922-1934.
- Parke, J. (1991). Root colonization by indigenous and introduced microorganisms *The rhizosphere and plant growth* (pp. 33-42): Springer.
- Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R. M., Baptista, P., Lino-Neto, T., & Almeida-Aguiar, C. (2013). A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological research*, 168(1), 1-5.
- Rayner, A. D., & Boddy, L. (1988). *Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology*: John Wiley & Sons Ltd.
- Reddy, M., & Rahe, J. (1989). Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizospheres. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(3), 373-378.
- Rishbeth, J. (1963). Stump protection against *Fomes annosus*: III. Inoculation with *Peniophora gigantea*. *Annals of Applied Biology*, 52(1), 63-77.
- Roiger, D., & Jeffers, S. (1991). Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology*, 81(8), 910-917.
- Rypacek, V. (1966). *Biologie holzzerstorender Pilze*. G. Fischer Verlag.
- Schink, B., Ward, J. C., & Zeikus, J. G. (1981). Microbiology of wetwood: role of anaerobic bacterial populations in living trees. *Microbiology*, 123(2), 313-322.
- Schlechte, G. (1986). *Holzbewohnende Pilze: 240 Arten in Farbe*: Jahn u. Ernst.
- Schmidt, O. (1994). *Holz- und Baumpilze. Biologie, Schäden, Schutz, Nutzen*.
- Schmidt, O., & Dietrichs, H. H. (1976). Zur Aktivität von Bakterien gegenüber Holzkomponenten. *Material und Organismen*, 3, 91-102.
- Schmidt, O., Dujesiefken, D., & Stobbe, H. (2013). Infektionsversuche an Rosskastanien mit *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*.
- Schmidt, O., Dujesiefken, D., & Stobbe, H. (2014). Infection tests of horse chestnut trees with *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Journal für Kulturpflanzen*, 66(4), 130-135.
- Schmidt, O., Dujesiefken, D., Stobbe, H., Moreth, U., Kehr, R., & Schröder, T. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* associated with horse chestnut bleeding canker in Germany. *Forest Pathology*, 38(2), 124-128.
- Schmidt, O., Grimm, K., & Moreth, U. (2002). Molecular identity of species and isolates of the *Coniophora* cellar fungi. *Holzforschung*, 56(6), 563-571.
- Schmidt, O., & Mehringer, H. (1989). Bakterien im Stammholz von Buchen aus Waldschadensgebieten und ihre Bedeutung für Holzverfärbungen. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 47(7), 285-290.
- Schmidt, O., & Moreth, U. (1998). Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis. *Holzforschung*, 52(3), 229-233.
- Schmiedeknecht, G., Bochow, H., & Junge, H. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases/Anwendung von *Bacillus subtilis* als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz. II. Biologische Bekämpfung von Kartoffelkrankheiten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 376-386.
- Schreiner, K. (2008). *Identifizierung mikrobieller Antagonisten gegen den bodenbürtigen phytopathogenen Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* und Nachweis antagonistisch wirkender Metaboliten*. Technische Universität München.
- Schubert, M., Fink, S., & Schwarze, F. W. M. R. (2008). Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control*, 45(1), 111-123. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.001
- Seehann, G. (1979). Holzzerstorende Pilze an Strassen- und Parkbaumen in Hamburg. *Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft*.

- Shigo, A. L. (1965). *Organism interactions in decay and discoloration in beech, birch, and maple* (Vol. 43): Northeastern Forest Experiment Station, Forest Service, US Department of ...
- Singh, A., & Butcher, J. (1991). Bacterial degradation of wood cell walls: a review of degradation patterns. *Journal of the Institute of Wood Science*, 12(3), 143-157.
- Singh, A., Nilsson, T., & Daniel, G. (1992). Resistance of *Alstonia scholaris* vestures to degradation by tunnelling bacteria. *Document-the International Research Group on Wood Preservation (Sweden)*.
- Singh, A., & Wakeling, R. (1993). Microscopic characteristics of microbial attacks of CCA-treated radiata pine wood. *Document-the International Research Group on Wood Preservation (Sweden)*.
- Slininger, P., Van Cauwenberge, J., Bothast, R., Weller, D., Thomashow, L., & Cook, R. (1996). Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3), 391-398.
- Smith, K. T., & Shortle, W. C. (1991). Decay fungi increase the moisture content of dried wood. *Biodeterioration and biodegradation*, 8, 138-146.
- Stienen, T., Schmidt, O., & Huckfeldt, T. (2014). Wood decay by indoor basidiomycetes at different moisture and temperature. *Holzforschung*, 68. doi:10.1515/hf-2013-0065
- Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H., & Ochi, K. (2002). Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 315-320.
- Thakur, R., Sharma, K., Gulati, A., Sud, R., & Gulati, A. (2017). Stress-tolerant *Viridibacillus arenosi* strain IHB B 7171 from tea rhizosphere as a potential broad-spectrum microbial inoculant. *Indian journal of microbiology*, 57(2), 195-200.
- Thimann, K. (1964). *Das Leben der Bakterien*. G. Fischer Verlag.
- Thompson, D., Clarke, B., & Kobayashi, D. (1996). Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms in Kentucky bluegrass. *Plant disease*, 80(8), 856-862.
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 99-114.
- v Pechmann, H., v Aufseß, H., Liese, W., & Ammer, U. (1967). Untersuchungen über die Rotstreifigkeit von Fichtenholz. *Beih. z. Forstw. Cbl.* 27/1967.
- Vicuña, R. (1988). Bacterial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(11), 646-655.
- Vorreiter, L. (1949). *Holztechnologisches Handbuch*. Band 1: Allgemeines, Holzkunde, Holzschutz und Holzvergütung.
- Wälchli, O. (1976). Die Widerstandsfähigkeit verschiedener Holzarten gegen Angriffe durch *Coniophora puteana* (Schum. ex Fr.) Karst. (Kellerschwamm) und *Gloephyllum trabeum* (Pers. ex Fr.) Murrill (Balkenblättling). *Holz als Roh-und Werkstoff*, 34(9), 335-338.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- Wilcox, W. W. (1978). Review of literature on the effects of early stages of decay on wood strength. *Wood and Fiber Science*, 9(4), 252-257.
- Willeitner, H. (1971). Anstrichschäden infolge Überaufnahmefähigkeit des Holzes. *Holz-Zbl*, 97(157), 2291-2292.
- Willeitner, H. (1981a). Grundprinzipien des baulichen Holzschutzes. *Willeitner, H., Schwab, EA Koch, Stuttgart*, 101-107.

- Willeitner, H. (1981b). Pilz-und Insektenbefall bei Holz-und Holzwerkstoffen. *Willeitner, H., Schwab, EA Koch, Stuttgart*, 62-68.
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2012). *Wood microbiology: decay and its prevention*: Academic press.

### Normen

- DIN EN 113 (1996-11). Holzschutzmittel: Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten. Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit. Beuth.
- DIN EN 152 (2011). Holzschutzmittel: Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit einer Schutzbehandlung von verarbeitetem Holz gegen Bläuepilze – Laboratoriumsverfahren. Beuth.
- DIN 68800-1 (2011). Holzschutz – Teil 1: Allgemeines. Beuth.

### Patente

- Messner, K. (1997). Stämme des Pilzes *Trichoderma*, daraus hergestelltes Fungizid, sowie Verfahren zu dessen Anwendung. (EP 0 615 409 B1). Europäisches Patentamt. <https://patents.google.com/patent/WO1993008694A1/de>.