
BACHELORARBEIT

Frau
Franziska Waldenburger

**Überprüfung auf Schädigung von
Lederhalbfabrikaten durch
Schimmelpilze**

Mittweida, 2017

Fakultät Angewandte Computer- und
Biowissenschaften

BACHELORARBEIT

Überprüfung auf Schädigung von Lederhalbfabrikaten durch Schimmelpilze

Autor:
Frau

Franziska Waldenburger

Studiengang:
Biotechnologie / Bioinformatik

Seminargruppe:
BT14wM-B

Erstprüfer:
Prof.Dr.rer.nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Dr. Kathrin Leppchen-Fröhlich

Einreichung:
Mittweida, 16.08.2017

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2017

Faculty Applied Computer Sciences & Biosciences

BACHELOR THESIS

Verification of Wet-Blue damage caused by fungi

author:

Ms.

Franziska Waldenburger

course of studies:

Biotechnology / Bioinformatics

seminar group:

BT14wM-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

second examiner:

Dr. Kathrin Leppchen-Fröhlich

submission:

Mittweida, 16.08.2017

defence/ evaluation:

Mittweida, 2017

Bibliographische Beschreibung:

Waldenburger, Franziska: Überprüfung auf Schädigung von Lederhalbfabrikaten durch Schimmelpilze. - 2017. – 32 Seiten Deckblätter und Verzeichnisse, 83 Seiten Inhalt, 29 Seiten Anhang
Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2017

Kurzbeschreibung:

Die vorliegende Bachelorarbeit befasst sich mit der Thematik zur Überprüfung der möglichen Schädigung von Lederhalbfabrikaten (Wet-Blue) durch verschiedene Schimmelpilze, welche auf Leder vorgekommen sind bzw. bereits von Leder isoliert werden konnten. Dafür sollte das Wachstum der Schimmelpilze auf dem Halbfabrikat mit Hilfe von Kultivierungsmethoden aus verschiedenen Bewuchstests gezielt gefördert werden. Anschließend wurden die Prüflinge auf eine Materialschädigung untersucht und auf mögliche Nährstoffquellen für das Wachstum der Schimmelpilze zurückgeschlossen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Michael Stoll und Dr. Michael Meyer bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, die vorliegende Bachelorarbeit im Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen gGmbH Freiberg durchzuführen.

Ein besonders großer Dank gilt meiner betrieblichen Betreuerin Dr. Kathrin Leppchen-Fröhlich. Danke für die zahlreichen Ratschläge, Ideen und die gesamte Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Gleichzeitig möchte ich mich für die große Unterstützung im Labor bei Dr. Isabel Zirnstein und Heidrun Berthold bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus für die Unterstützung seitens der Hochschule.

Ein weiterer großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während des gesamten Studiums und für die Hilfe bei der Verfassung dieser Bachelorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung von Schimmelpilzen	1
1.2 Motivation.....	2
1.2.1 Leder und Lederhalbfabrikat als Angriffspunkt für Schimmelpilze.....	2
1.3 Leder	6
1.4 Das Lederhalbfabrikat Wet-Blue	7
1.5 Schimmelpilze	8
1.5.1 Charakterisierende Merkmale.....	9
1.5.2 Wachstumszyklus	9
1.5.3 Wachstumsanforderungen	10
1.5.4 Materialzerstörende Eigenschaften von Schimmelpilzen.....	11
1.5.5 Charakterisierung der verwendeten Schimmelpilzarten	11
1.5.5.1 <i>Alternaria tenuissima</i>	12
1.5.5.2 <i>Aspergillus niger</i>	12
1.5.5.3 <i>Aureobasidium pullulans</i>	13
1.5.5.4 <i>Cladosporium cladosporioides (montecillanum)</i>	13
1.5.5.5 <i>Eurotium amstelodami (= Aspergillus hollandicus)</i>	14
1.5.5.6 <i>Fusarium verticillioides</i>	14
1.5.5.7 <i>Hormoconis resinae</i>	15
1.5.5.8 <i>Mucor racemosus</i>	15
1.5.5.9 <i>Paecilomyces variotii</i>	16
1.5.5.10 <i>Penicillium chrysogenum</i>	16
1.5.5.11 <i>Penicillium funiculosum</i>	17
1.5.5.12 <i>Rhizopus oryzae</i>	17
1.5.5.13 <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	18
1.5.5.14 <i>Trichoderma viride</i>	18
1.6 Bewuchstests.....	18

1.6.1 TEGEWA-Test	19
1.6.2 Direktbeimpfung / Feuchte Kammer	19
1.6.3 Tropical Chamber-Test	21
1.7 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen	22
2 Zielstellung	23
3 Material.....	24
3.1 Chemikalien	24
3.2 Medien	24
3.3 Schimmelpilze	26
3.4 Geräte.....	26
3.5 Materialien	27
4 Methoden	28
4.1 Herstellung der Nährmedien	28
4.2 Beimpfung der Nährmedien und Kultivierung der Schimmelpilze	28
4.3 Einstellung der Sporensuspension	29
4.4 Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test	29
4.5 Kultivierung in Anlehnung an die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer	30
4.5.1 Herstellung der Feuchten Kammer	30
4.5.2 Vorbereitung der Petrischalen	30
4.5.3 Vorbereitung der Prüflinge und Inkubation.....	30
4.6 Kultivierung in Anlehnung an den Tropical Chamber-Test	30
4.7 Herstellung der Kryokulturen	30
4.8 Mikroskopische Untersuchungen der Materialoberfläche	32
4.8.1 Vorbereitung der Prüflinge	32
4.8.2 Mikroskopie	32
4.9 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen	32
4.9.1 Probenvorbereitung.....	32
4.9.2 Bestimmung der Trockensubstanz.....	32
4.9.3 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen	32
5 Ergebnisse.....	34
5.1 Einstellung der Sporensuspension	34
5.2 Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test	35

5.3 Kultivierung in Anlehnung an die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer	37
5.4 Kultivierung in Anlehnung an den Tropical Chamber-Test	39
5.5 Mikroskopische Untersuchungen der Materialoberfläche	41
5.5.1 Mikroskopische Untersuchungen TEGEWA-Test	42
5.5.2 Mikroskopische Untersuchungen Feuchte Kammer	53
5.5.3 Mikroskopische Untersuchungen Tropical Chamber-Test	61
5.6 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen	63
5.6.1 Bestimmung der Trockensubstanz	63
5.6.2 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen	63
6 Diskussion	65
6.1 Einschätzung der Kultivierungsbedingungen des TEGEWA-Tests für das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue)	65
6.2 Einschätzung der Kultivierungsbedingungen der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer für das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue)	66
6.3 Einschätzung der Kultivierungsbedingungen der Tropical Chamber für das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue)	67
6.4 Vergleich der Kultivierungsparameter der einzelnen Testmethoden und Schlussfolgerung	68
6.5 Mikroskopische Untersuchungen	69
6.5.1 Mikroskopische Untersuchungen TEGEWA-Test	69
6.5.2 Mikroskopische Untersuchungen Feuchte Kammer	71
6.5.3 Mikroskopische Untersuchungen Tropical Chamber-Test	71
6.6 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen	72
6.7 Auswirkungen und Prävention	72
7 Ausblick	77
8 Zusammenfassung	80
9 Summary	82
Anhang	XVII
Literaturverzeichnis	XLVII
Selbstständigkeitserklärung	LVI

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Riesenhallimasch <i>Armillaria ostoyae</i> [URL-9]	1
Abb. 2: intakte Lederoberfläche [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009].....	3
Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahme einer beschädigten Lederoberfläche (A), (B) [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009]	3
Abb. 4: Wertschöpfungskette von Autositzen [Volkmann et al., 2009].....	4
Abb. 5: Vorherrschende Feuchtigkeits- und Temperaturwerte während eines Transportes zwischen Deutschland und Indien in einem 40'Container [Volkmann et al., 2009]	5
Abb. 6: Die verschiedenen Schritte der Lederherstellung [Kernegger et al., 2015].....	7
Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme der Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	8
Abb. 8: Wachstumszyklus Schimmelpilze [Bockmühl et al., 2006]	9
Abb. 9: Verfärbung der Narbenseite des Lederhalbfabrikats Wet-Blue durch <i>Hormoconis resiniae</i> (A) und <i>Paecilomyces variotii</i> (B)	11
Abb. 10: <i>Alternaria tenuissima</i> Oberseite (A, C) und Unterseite (B, D) kultiviert auf KDA (A, B) und V-8 Juice (C, D) bei 24 °C.....	12
Abb. 11: <i>Aspergillus niger</i> Oberseite (A, C) und Unterseite (B, D) kultiviert auf KDA (A, B) und MEA (C, D) bei 28,5 °C	13
Abb. 12: <i>Aureobasidium pullulans</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 24°C	13
Abb. 13: <i>Cladosporium cladosporioides</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24°C.....	14
Abb. 14: <i>Eurotium amstelodami</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf M 40 Y bei 24°C	14
Abb. 15: <i>Fusarium verticillioides</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24 °C	15
Abb. 16: <i>Hormoconis resiniae</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 20 °C	15
Abb. 17: <i>Mucor racemosus</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 20 °C	16

Abb. 18: <i>Paecilomyces variotii</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf CzA bei 28,5 °C	16
Abb. 19: <i>Penicillium chrysogenum</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24°C	17
Abb. 20: <i>Penicillium funiculosum</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 24°C	17
Abb. 21: <i>Rhizopus oryzae</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 28,5 °C	17
Abb. 22: <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24°C.....	18
Abb. 23: <i>Trichoderma viride</i> Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 24 °C	18
Abb. 24: Aufbau TEGEWA-Test mit Narbenseite (A) und Fleischseite (B)	19
Abb. 25: Direktbeimpfung / Feuchte Kammer Außen (A) und Innen (B) am Beispiel von <i>Fusarium verticillioides</i>	20
Abb. 26: Wet-Blue Prüflinge aus der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer nach Inkubation mit <i>Hormoconis resiniae</i>	20
Abb. 27: Tropical Chamber-Test Außen (A) und Innen (B)	22
Abb. 28: Soxhlet- Apparatur (A) und Halogentrockner (B).....	22
Abb. 29: Beispiel eines vollständig (durch <i>Rhizopus oryzae</i>) (A), teilweisen (durch <i>Paecilomyces variotii</i>) (B) und nicht (mit <i>Eurotium amstelodami</i>) (C) bewachsenen Wet-Blue Prüflings	35
Abb. 30: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen im TEGEWA-Test	36
Abb. 31: Bewuchs der Fleischseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen im TEGEWA-Test	37
Abb. 32: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Feuchten Kammer	38

Abb. 33: Bewuchs der Fleischseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Feuchten Kammer	39
Abb. 34: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Tropical Chamber	40
Abb. 35: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Tropical Chamber	41
Abb. 36: Unterwachsene Narbenseite von <i>P. variotii</i> (A) und <i>M. racemosus</i> (B)	42
Abb. 37: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Alternaria tenuissima</i> (KDA) für 76 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	43
Abb. 38: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Alternaria tenuissima</i> (V-8 Juice) für 76 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	43
Abb. 39: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Aspergillus niger</i> DSM 1957 für 83 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	44
Abb. 40: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Aspergillus niger</i> DSM 2143 für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	44
Abb. 41: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Aureobasidium pullulans</i> für 88 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	45
Abb. 42: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Cladosporium cladosporioides</i> für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	45
Abb. 43: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Eurotium amstelodami</i> für 88 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm	46

- Abb. 44: Mikroskopische Aufnahme der mit *Fusarium verticillioides* für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 46
- Abb. 45: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resiniae* für 90 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 47
- Abb. 46: Mikroskopische Aufnahme der mit *Mucor racemosus* für 83 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 47
- Abb. 47: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 48
- Abb. 48: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium chrysogenum* für 82 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 48
- Abb. 49: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 60 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 49
- Abb. 50: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 80 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 49
- Abb. 51: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 60 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 50
- Abb. 52: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 90 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 50
- Abb. 53: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* für 82 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 51

- Abb. 54: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 60 Tage im
TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher
Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 51
- Abb. 55: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 89 Tage im
TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher
Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 52
- Abb. 56: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) für 83 Tage
in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-
facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
..... 53
- Abb. 57: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) für 83
Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue
bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS:
100 µm 54
- Abb. 58: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 für 90 Tage
in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-
facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
..... 54
- Abb. 59: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 2143 für 92 Tage
in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-
facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
..... 55
- Abb. 60: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* für 102 Tage in
der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-
facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
..... 55
- Abb. 61: Mikroskopische Aufnahme der mit *Cladosporium cladosporioides* für 103
Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue
bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS:
100 µm 56

- Abb. 62: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* für 102 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 56
- Abb. 63: Mikroskopische Aufnahme der mit *Fusarium verticillioides* für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 57
- Abb. 64: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resinæ* für 104 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 57
- Abb. 65: Mikroskopische Aufnahme der mit *Mucor racemosus* für 90 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 58
- Abb. 66: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 58
- Abb. 67: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium chrysogenum* für 91 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 59
- Abb. 68: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 102 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 59
- Abb. 69: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 104 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 60
- Abb. 70: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* für 91 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 60

- Abb. 71: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 61
- Abb. 72: Mikroskopische Aufnahme der Narbenseite des Prüflings 1 nach einer Kultivierung in der Tropical Chamber für 96 Tage bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 61
- Abb. 73: Mikroskopische Aufnahme der Narbenseite des Prüflings 2 nach einer Kultivierung in der Tropical Chamber für 96 Tage bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm 62
- Abb. 74: Beschädigte Lederoberfläche [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009]XVII
- Abb. 75: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer intakten (A) und beschädigten (B) Lederoberfläche [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009].....XVII
- Abb. 76: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Aspergillus niger* DSM 1957 (A), *Aspergillus niger* DSM 2143 (B), *Aureobasidium pullulans* (C) und *Alternaria tenuissima* (KDA) (D)..... XXXI
- Abb. 77: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) (A), *Cladosporium cladosporioides* (B), *Eurotium amstelodami* (C) und *Fusarium verticillioides* (D)..... XXXI
- Abb. 78: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Hormoconis resinae* (A), *Mucor racemosus* (B), *Penicillium chrysogenum* (C) und *Penicillium funiculosum* (D) XXXI
- Abb. 79: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Paecilomyces variotii* (A), *Rhizopus oryzae* (B), *Scopulariopsis brevicaulis* (C) und *Trichoderma viride* (D)..... XXXI
- Abb. 80: Mikroskopische Aufnahme der Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....XXXII
- Abb. 81: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) für 76 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µmXXXII

- Abb. 82: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) für 76 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXIII
- Abb. 83: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 für 83 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXIII
- Abb. 84: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 2143 für 81 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXIII
- Abb. 85: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* für 88 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXIV
- Abb. 86: Mikroskopische Aufnahme der mit *Cladosporium cladosporioides* für 89 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXIV
- Abb. 87: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* für 88 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXIV
- Abb. 88: Mikroskopische Aufnahme der mit *Fusarium verticillioides* für 81 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXV
- Abb. 89: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resinae* für 90 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm
 XXXV

- Abb. 90: Mikroskopische Aufnahme der mit *Mucor racemosus* für 83 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µmXXXV
- Abb. 91: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* für 81 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm XXXVI
- Abb. 92: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium chrysogenum* für 82 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm XXXVI
- Abb. 93: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 88 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm XXXVI
- Abb. 94: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 90 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µmXXXVII
- Abb. 95: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* für 82 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µmXXXVII
- Abb. 96: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 89 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm XXXVII
- Abb. 97: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) (A) für 76 Tage und *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) (B) für 76 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....XXXVIII
- Abb. 98: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 (A) für 83 Tage und *Aspergillus niger* DSM 2143 (B) für 81 Tage im TEGEWA-

Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....	XXXVIII
Abb. 99: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Aureobasidium pullulans</i> (A) für 88 Tage und <i>Cladosporium cladosporioides</i> (B) für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XXXIX
Abb. 100: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Eurotium amstelodami</i> (A) für 88 Tage und <i>Fusarium verticillioides</i> (B) für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XXXIX
Abb. 101: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Hormoconis resiniae</i> (A) für 90 Tage und <i>Mucor racemosus</i> (B) für 83 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XL
Abb. 102: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Paecilomyces variotii</i> (A) für 81 Tage und <i>Penicillium chrysogenum</i> (B) für 82 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XL
Abb. 103: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Penicillium funiculosum</i> (A) für 88 Tage und <i>Rhizopus oryzae</i> (B) für 90 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLI
Abb. 104: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (A) für 82 Tage und <i>Trichoderma viride</i> (B) für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLI
Abb. 105: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Alternaria tenuissima</i> (KDA) (A) für 83 Tage und <i>Alternaria tenuissima</i> (V-8 Juice) (B) für 83 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....	XLII
Abb. 106: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Aspergillus niger</i> DSM 1957 (A) für 90 Tage und <i>Aspergillus niger</i> DSM 2143 (B) für 92 Tage in der Feuchten	

Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....	XLII
Abb. 107: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Aureobasidium pullulans</i> (A) für 102 Tage und <i>Cladosporium cladosporioides</i> (B) für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....	XLIII
Abb. 108: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Eurotium amstelodami</i> (A) für 102 Tage und <i>Fusarium verticillioides</i> (B) für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLIII
Abb. 109: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Hormoconis resinae</i> (A) für 104 Tage und <i>Mucor racemosus</i> (B) für 90 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLIII
Abb. 110: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Paecilomyces variotii</i> (A) für 92 Tage und <i>Penicillium chrysogenum</i> (B) für 91 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLIV
Abb. 111: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Penicillium funiculosum</i> (A) für 102 Tage und <i>Rhizopus oryzae</i> (B) für 104 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLIV
Abb. 112: Mikroskopische Aufnahme der mit <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (A) für 91 Tage und <i>Trichoderma viride</i> (B) für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm	XLIV
Abb. 113: Mikroskopische Aufnahme der Fleischseite Prüfling 1 (A) und Prüfling 2 (B) nach einer Kultivierung in der Tropical Chamber für 96 Tage bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm.....	XLV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte Testorganismen für die Tropical Chamber	21
Tabelle 2: Verwendete Testorganismen	26
Tabelle 3: Schimmelpilze und Kultivierungsbedingungen.....	28
Tabelle 4: Eingestellte Sporenanzahl.....	34
Tabelle 5: Trockensubstanz ausgewählter Prüflinge nach Kultivierung	63
Tabelle 6: Werte der in Dichlormethan löslichen Substanzen anhand ausgewählter Prüflinge.....	64
Tabelle 7: Ergebnisse TEGEWA-Test nach 27-30Tagen.....	XVII
Tabelle 8: Ergebnisse TEGEWA-Test nach 61-70Tagen.....	XX
Tabelle 9: Ergebnisse TEGEWA-Test nach 76-90Tagen.....	XXII
Tabelle 10: Ergebnisse Direktbeimpfung / Feuchte Kammer nach 27-30 Tagen.....	XXV
Tabelle 11: Ergebnisse Direktbeimpfung / Feuchte Kammer nach 61-70 Tagen....	XXVII
Tabelle 12: Ergebnisse Direktbeimpfung / Feuchte Kammer nach 83-104 Tagen	XXVIII
Tabelle 13: Ergebnisse Tropical Chamber-Test nach 28-96 Tagen	XXIX

Abkürzungsverzeichnis

ASTM	American Society for Testing and Materials
a_w	Wasseraktivität
BCM	Benzimidazol
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CHA	Czapek-Hefeextrakt-Agar
CzA	CZAPEK-DOX-Agar
DCM	Dichlormethan
DG 18	Dichloran-18 % Glycerol-Agar
DIMTS	Diiodmethyl-p-tolylsulfon
DRYES	Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose agar
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
FILK	Forschungsinstitut Leder und Kunststoffbahnen
FS	Fleischseite
HA	Haferflocken-Agar
KDA	Kartoffel-Dextrose-Agar
KSA	Kartoffel-Saccharose-Agar
MBT	2-Mercaptobenzothiazol
MEA	Malzextrakt-Agar
MS	Maßstab
M 40 Y	Medium für osmophile Pilze
NS	Narbenseite
OIT	Octylisothiazolinon
OPP	ortho-Phenylphenol
PCMC	Chlorocresol

REACH	Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals
TCMTB	(Benzothiazol-2-ylthio)methylthiocyanat
TEGEWA	Verband der Textilhilfsmittel-, Lederhilfsmittel-, Gerbstoff- & Waschrohstoff- Industrie
TS	Trockensubstanz
V-8 Juice	Vegetable-Juice

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Schimmelpilzen

Vor ungefähr 3,8 Milliarden Jahren waren Mikroorganismen, unter anderem Bakterien und Pilze, die ersten Lebewesen auf unserer Erde. Sie nehmen eine wichtige Position im Ökosystem ein, da ohne diese Destruenten ein Leben auf der Erde nicht möglich wäre. Die Mikroorganismen bauen tote Biomasse und organische Ausscheidungsprodukte von anderen Organismen in einfache organische Verbindungen ab, damit können diese vermeintlichen Abfallprodukte als wichtige Nährstoffe wieder zugänglich gemacht werden. Außerdem werden durch Mikroorganismen lebensnotwendige, geochemische Kreisläufe angetrieben und das globale Klima beeinflusst [Volkmann et al., 2009], [Gattner et al., 1988].

Auch das bislang größte Lebewesen der Welt zählt zu den Mikroorganismen. Dabei handelt es sich um einen Pilz. Dieser Riesenhallimasch *Armillaria ostoyae* (Abb. 1) breitet sich bereits seit 2400 Jahren über 900 Hektar unter dem Waldboden des Malheur National Forests in Oregon (USA) aus [URL-9]. Schätzungen zufolge gibt es 1,5 Millionen verschiedene Pilzarten. Davon sind jedoch bislang nur ca. 80.000 Arten beschrieben. Das Reich der Pilze ist sehr vielfältig. Unter den Pilzen finden sich wiederum einige Gattungen, die als Schimmelpilze zusammengefasst werden, wobei eine Abgrenzung der Schimmelpilze innerhalb der Pilze sehr schwierig ist [URL-8].



Abb. 1: Riesenhallimasch *Armillaria ostoyae* [URL-9]

Durch die Anwendung von Schimmelpilzen in der Bio- und Lebensmitteltechnologie bieten sie einen großen Nutzen für den Menschen. Schimmelpilze zählen zu den

wichtigsten Antibiotikaproduzenten und werden kommerziell für die Herstellung verschiedener organischer Säuren (z. B. Zitronensäure, Ascorbinsäure oder Gluconsäure) genutzt. Auch Lebensmittelfarbstoffe, Enzyme oder Aromastoffe aus Schimmelpilzen spielen eine bedeutende Rolle. Beispielhaft dafür ist der rote Reis welcher mit dem Schimmelpilz *Monascus purpureus* fermentiert wird und in Asien zur Anfärbung diverser Lebensmittel wie Sake dient. In Europa zählen hingegen bestimmte Fleischwaren wie Salami und Schimmelpilzkäse (z. B. Blauschimmelkäse mit Hilfe von *Penicillium roqueforti*) zu den bekanntesten mit Schimmelpilzen hergestellten Lebensmitteln [Kück et al., 2009].

1.2 Motivation

In der Öffentlichkeit ist der Nutzen der durch Schimmelpilze verursacht wird, wohl weitaus weniger verbreitet als deren Schadwirkung. Schimmelpilze können als Mensch- und Pflanzenpathogene eine nicht unerhebliche Gefahr für den Menschen sein und hohe landwirtschaftliche Schäden verursachen. Außerdem treten Schimmelpilze durch deren saprophytische Lebensweise oftmals als Kontamination auf Lebensmitteln auf und gelten als Materialzerstörer. Dadurch können ebenfalls hohe volkswirtschaftliche Schäden entstehen und der Mensch gefährdet werden [Kück et al., 2009].

1.2.1 Leder und Lederhalbfabrikat als Angriffspunkt für Schimmelpilze

Vor allem das Naturprodukt Leder, ein seit Menschengedenken wichtiges Wirtschaftsgut, unterliegt unterschiedlichsten Beanspruchungen, die durch Herstellung, Lagerung, Handel und Einsatz des Materials verursacht werden [Stather, 1967], [Coote et al., 1998], [Kleinloh et al., 2012]. Abbildung 2 zeigt eine intakte Lederoberfläche.

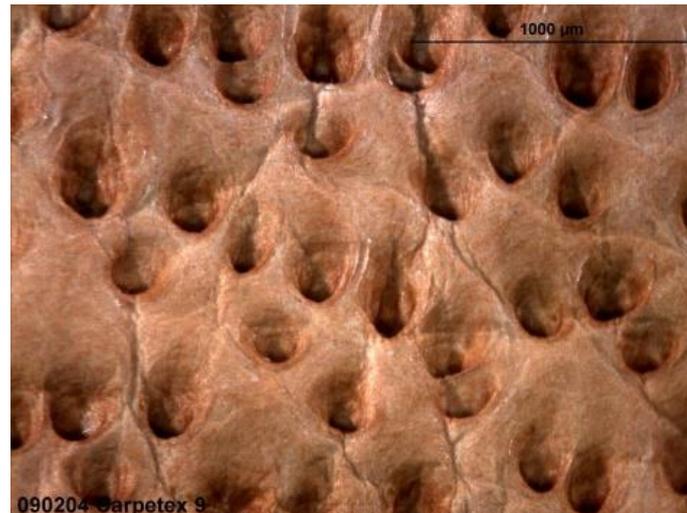


Abb. 2: intakte Lederoberfläche [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009]

Abbildung 3 verdeutlicht im Gegensatz dazu eine Oberflächenschädigung von Leder. Die Schäden sind während der Optimierung eines enzymatischen Äschers entstanden, d. h. Enzyme, die eigentlich nur die Haare entfernen sollten, haben den Narben zerstört. Weitere Oberflächenschädigungen, die während der Herstellung entstanden sind, sind in Abbildung 74 und 75 (Anhang) dargestellt.



Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahme einer beschädigten Lederoberfläche (A), (B) [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009]

Erhebliche Materialschäden werden vor allem durch Schimmelpilzbefall verursacht. Gründe sind im Aufbau von Leder zu finden. Schimmelpilze sind in der Lage gegerbte Kollagenfasern sowie natürliche und während der Herstellung aufgetragene Fette abzubauen. Dies geschieht durch die Ausscheidung spezifischer Enzyme. Dadurch

können die entstehenden Fettsäuren als Nahrungsgrundlage für deren Wachstum genutzt werden [Kück et al., 2009].

Der Im- und Export von Leder und Lederhalbfabrikaten ist in Deutschland von wirtschaftlicher Bedeutung. Schimmelpilzwachstum kann beim Versand des Materials in Containern von und nach Übersee entstehen. Vor allem viele Fabriken und Montagewerke u. a. in Asien, sind ideale Brutstätten für die ubiquitär vorhandenen Schimmelpilzsporen aufgrund der hohen Luftfeuchtigkeit und Temperatur. Das Passieren unterschiedlicher Klimazonen sowie Land- und Seeklima in Kombination mit Tag-Nacht Temperaturschwankungen führt zu Veränderungen des Mikroklimas im Container während des Transportprozesses. Dadurch kommt es zur Kondensation bzw. Betauung an den Containerwänden oder an bzw. in den Packstücken, was wiederum an dem Lederhalbfabrikat oder hygroskopischen Leder zu Schimmelpilzbefall führen kann. Abbildung 4 verdeutlicht am Beispiel der Wertschöpfungskette eines Autositzes, den langen Weg von der Rohware zum fertigen Produkt [URL-7], [Kleinloh et al., 2012], [Volkman et al., 2009].

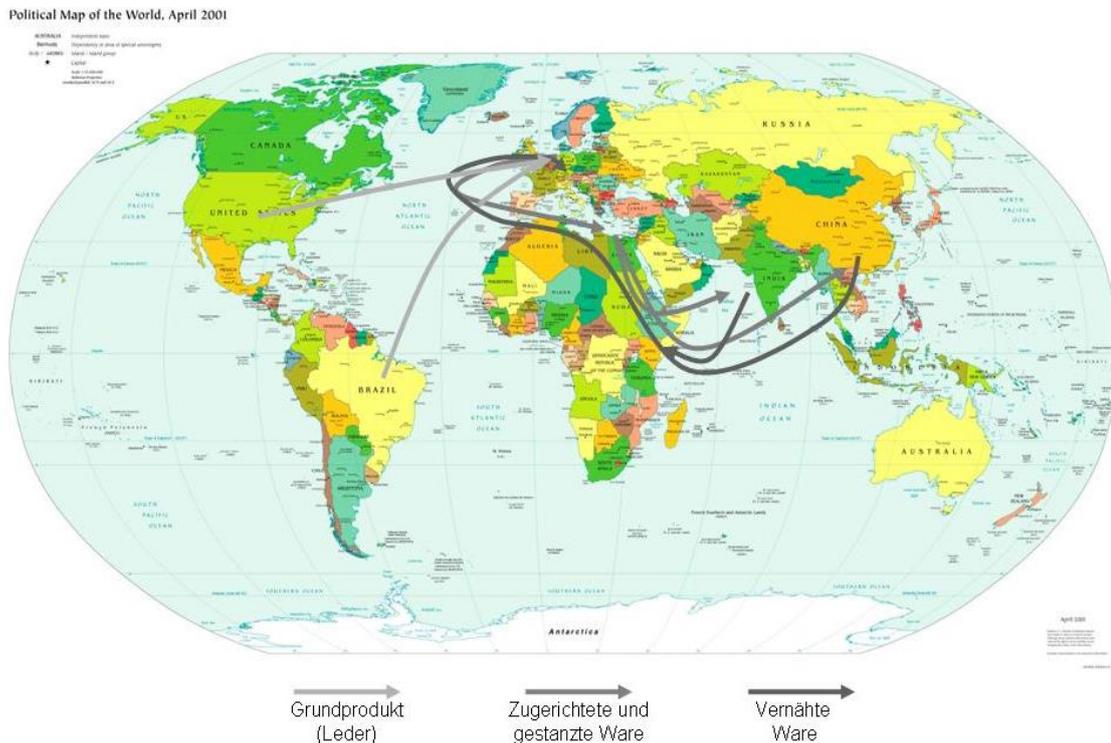


Abb. 4: Wertschöpfungskette von Autositzen [Volkman et al., 2009]

Die Abb. 5 zeigt den Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsverlauf während des Transportes. Dabei liegen die Temperaturen im Bereich zwischen 18-40 °C und relative Luftfeuchtigkeitsverhältnisse über 60% bis annähernd 100% können erreicht werden. Temperaturen im Bereich zwischen 25 °C bis 35 °C in Kombination mit hohen relativen Luftfeuchtigkeiten von 92-99% bieten ideale Wachstumsbedingungen für Schimmelpilze [Volkman et al., 2009].

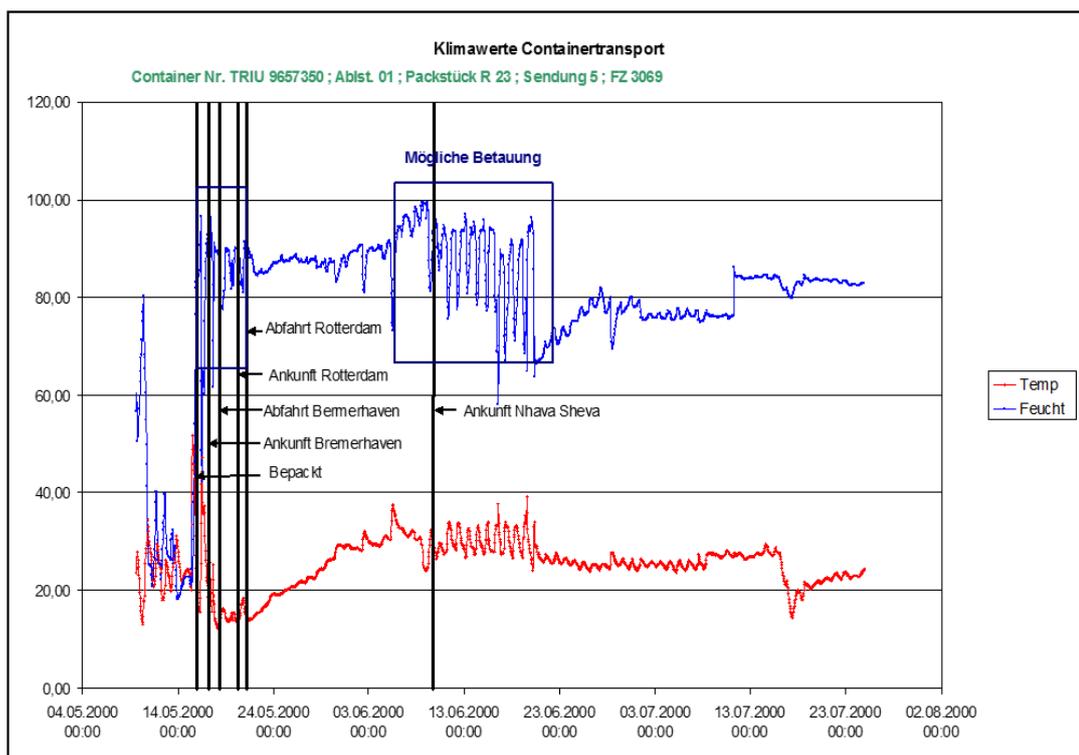


Abb. 5: Vorherrschende Feuchtigkeits- und Temperaturwerte während eines Transportes zwischen Deutschland und Indien in einem 40'Container [Volkman et al., 2009]

Schimmelpilzbefall bedingt eine Verschlechterung ästhetischer und funktioneller Eigenschaften von Lederhalbfabrikaten und Leder. Der Grund dafür ist eine Zerstörung der Materialstruktur (Narbenschäden, Versprödungen, Instabilität des Fasergefüges) und Verfärbungen durch den Schimmelpilz selbst oder durch exsudierte Stoffwechselprodukte. Die Folgen sind hohe ökonomische Schäden. Durch falsche Lagerbedingungen im Handel und Transport sowie unzureichende antimikrobielle Ausrüstung der Halbfabrikate, könnte Schimmelpilzwachstum entstehen. Dies führt zu Wertverlusten und Qualitätsminderungen sowie zusätzlichen Kosten durch den

Zeitverzug bei der Neuherstellung des Halbfabrikats bzw. bei der Nacharbeit [Paulus, 2005], [Orlita, 2004], [Zugno et al., 2010], [Rother et al., 1995], [Kleinloh et al., 2012]. Die Schimmelpilzproblematik kann neben wirtschaftlichen Schäden auch erhebliche gesundheitliche Schäden nach sich ziehen. Schimmelpilze gehören weltweit zu den führenden bekannten Allergenen. Sie besitzen einen umfangreichen Sekundärmetabolismus und daher die Fähigkeit Schimmelpilzgifte (Mykotoxine) zu produzieren. Dies kann oftmals zu Atemwegserkrankungen und Allergien führen [Volkman et al., 2009], [Kleban, 2008], [Zugno et al., 2010].

1.3 Leder

Als Leder wird gegerbte tierische Haut bezeichnet [Pauligk et al., 1983]. Die Haut ist eine komplexe Struktur, bestehend aus Haaren, Schweißdrüsen, Fett, Blutgefäßen und einer Schicht von Kollagenfaserbündeln, die aus Proteinen aufgebaut sind. Die äußere Oberflächenschicht der Haut wird als Narbenseite oder Haarseite bezeichnet. Die Unterseite der Haut wird hingegen Fleischseite genannt [Coote et al., 1998]. Die Lederhaut (Cutis oder Corium) bildet mit ca. 80% den größten Anteil einer tierischen Rohhaut. Sie ist die wichtigste Schicht beim Herstellungsprozess von Leder (Abb. 6), da diese Hautschicht für die Eigenschaften des fertigen Leders bestimmend ist [Stather, 1967]. Das Hauteiweiß Kollagen macht neben dem Fett und Wasser 96% der Lederhaut aus [Paulus, 2005], [Pauligk et al., 1983].

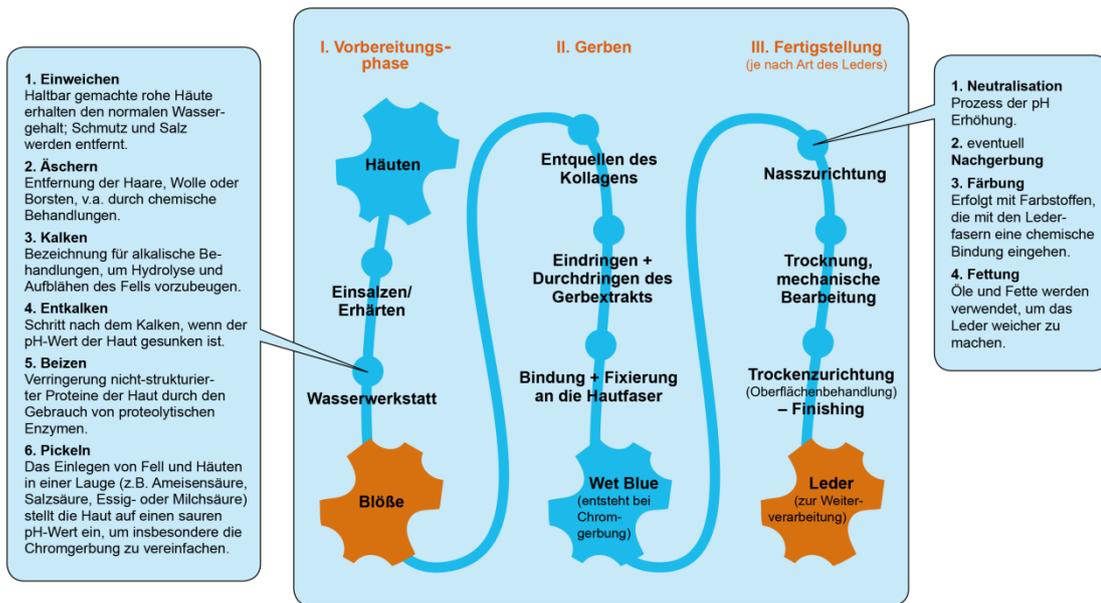


Abb. 6: Die verschiedenen Schritte der Lederherstellung [Kernegger et al., 2015]

1.4 Das Lederhalbfabrikat Wet-Blue

Das Lederhalbfabrikat ist ein wichtiges Zwischenprodukt in der Lederherstellung und ist das Resultat aus den Bearbeitungsprozessen in der Wasserwerkstatt (wie Weiche, Äschern, Entfleischen, Spalten, Entkalken, Beizen und Pickel) und dem Gerben. Nach dem Äschern bis zum Prozess des Gerbens wird die Rohhaut als Blöße bezeichnet. Jeder Gerbstoff, synthetisch oder pflanzlich, fertigt eine einzigartige Lederart. Die Chromgerbung ist die am häufigsten genutzte Gerbmethode [Paulus, 2005]. Die dreiwertigen Chromsalze, meist Chromsulfate, werden dabei als Gerbstoffe genutzt [Berghuber, 2005], [Kernegger et al., 2015]. Das mit Chromsalzen gegerbte nasse Halbfabrikat besitzt eine typische grün-bläuliche Farbe (Abb. 7 und (Abb. 80-Anhang)), was namensgebend ist. [URL-2], [Pauligk, 1983], [Orlita, 2004], [Paulus, 2005].

Während der ersten Bearbeitungsschritte in der Wasserwerkstatt wird prozessbedingt der pH-Wert im alkalischen Bereich gehalten (pH 8-10 bis zu pH 12-13). Zur Vorbereitung auf die Gerbung wird die Blöße hingegen stark sauer eingestellt (pH 5,5-3,5 bis zu pH 3-2). Dies wird durch den Pickel erreicht, welcher eine Lösung aus Salz und Säure in Wasser ist und dazu dient, das Fasergefüge aufnahmefähiger bei der Gerbung zu machen. Der Pickel ist der Wendepunkt des pH-Bereiches bei der Lederherstellung, da hier der Wechsel von alkalischen zu sauren Bedingungen erfolgt [Pfleiderer et al., 1988], [Pauligk, 1983], [Gattner et al., 1988].

Grundsätzlich bevorzugen Bakterien im Gegensatz zu Schimmelpilzen eher einen leicht alkalischen bis neutralen pH-Wert und brauchen ein größeres Nährstoffangebot. Der a_w -Wert, welcher im Kapitel 1.5.3 näher beschrieben wird, beträgt 0,91-0,95 [Rother, 1995], [Bockmühl et al., 2006], [URL-6], [Kück et al., 2009]. Aus diesem Grund überwiegt bis dahin die Gefahr eines bakteriellen Befalls beim Lederherstellungsprozess, während bei den folgenden Bearbeitungsschritten im sauren pH-Bereich die Kontamination durch Hefen und Schimmelpilze überwiegt. Schimmelpilze haben nur geringe Ansprüche an Feuchtigkeit, Temperatur und Nährstoffen für ein Wachstum. Deshalb bieten viele Substrate eine ideale Nährstoffquelle für diese Mikroorganismen. Wet-Blue ist aufgrund seiner Zusammensetzung ein ideales Wachstumsmedium für Schimmelpilze [Kleinloh et al., 2012]. Ein pH-Wert von 3-4 und ein Wassergehalt von 40-50% unterstützen das Wachstum von Schimmelpilzen zusätzlich [Paulus, 2005]. [Pfleiderer et al., 1988].

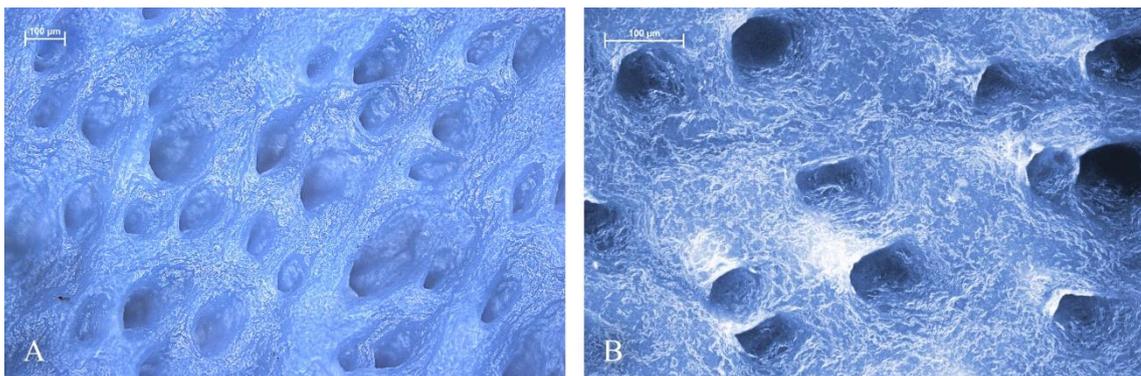


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme der Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

1.5 Schimmelpilze

Die Gesamtheit der Schimmelpilze wird den Thallophyten, den so genannten „Lagerpflanzen“ zugeordnet, da sie keine Gliederung in Blätter, Sprosse und Wurzeln aufweisen. Außerdem besitzen Pilze nicht die Fähigkeit, ihre Energie mittels Photosynthese zu erzeugen. Sie besitzen einen Zellkern, sowie andere membranumschlossene Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien und werden somit den Eukaryoten zugeordnet. Des Weiteren besitzen Schimmelpilze Zellen mit Zellwand und eine oder mehrere Vakuolen [Cypionka, 2005], [Kück, 2009].

1.5.1 Charakterisierende Merkmale

Ein filamentöses, saprophytisches und schnelles vegetatives Wachstum des Myzels, asexuelle Sporenbildung, ein umfassender Sekundärmetabolismus, welcher artspezifisch ist, sowie ein ubiquitäres Vorkommen zählen zu charakteristischen Merkmalen der Schimmelpilze. Als saprophytisch wird die Eigenschaft, dass Schimmelpilze organische, abgestorbene Substanzen als Nährstoffe nutzen können, bezeichnet [Kück, 2009]. Einige Schimmelpilze sind xerotolerant (tolerieren niedrige a_w -Werte), osmotolerant (tolerieren hohe Zuckerkonzentrationen) oder halotolerant (tolerieren hohe Kochsalzkonzentrationen) [Ellner, 2015].

1.5.2 Wachstumszyklus

Der größte Teil bekannter Pilze sind Vielzeller. Dazu gehören auch die als Hyphenpilze bezeichneten Schimmelpilze. Hyphen bilden den Thallus der Pilze, welcher auch als Myzel bezeichnet wird. Viele Hyphenpilze sind in der Lage, sich nicht nur sexuell, sondern auch asexuell zu vermehren. Das hat oft zu einer Mehrfachbenennung derselben Pilzart in der Vergangenheit geführt [Kück, 2009]. Der Wachstumszyklus von Schimmelpilzen, lässt sich in verschiedene Phasen untergliedern (Abb. 8). Der aus dem Myzel bestehende Organismus kann große Teile eines Objektes besiedeln und oft nicht sichtbar innerhalb (invasiv) eines Substrates wachsen.

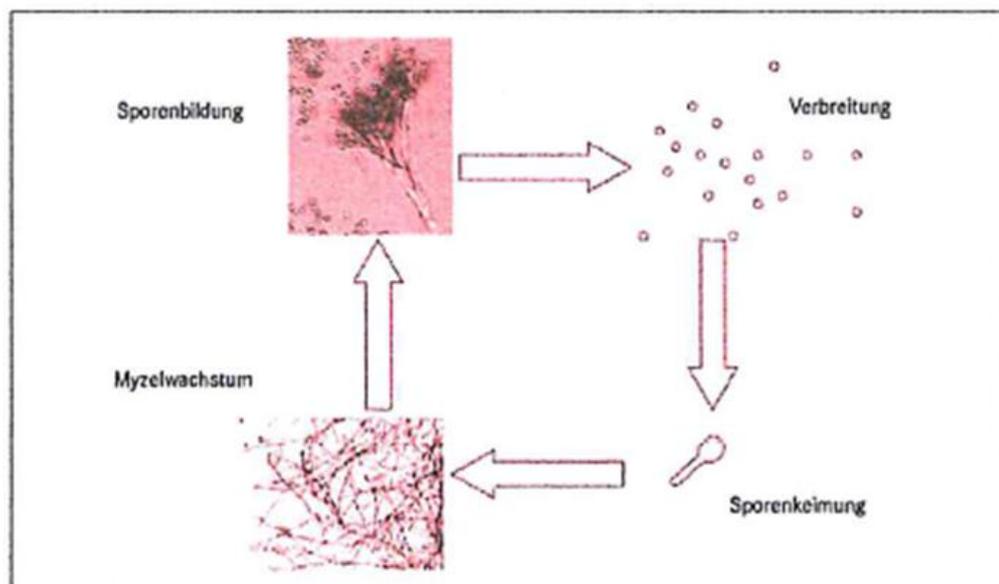


Abb. 8: Wachstumszyklus Schimmelpilze [Bockmühl et al., 2006]

Aus dem Myzel entstehen die Konidiophoren, welche auch Verbreitungsorgane genannt werden. Diese heben wiederum die Konidien, auch Sporen genannt, aus dem Nährboden heraus, um sie über die Luft verbreiten zu können. Durch das typisch pelzige Erscheinungsbild werden die sporenbesetzten Konidien oftmals als eigentlicher Schimmelpilzbefall angesehen. Der Wachstumszyklus kann durch Myzelbildung erneut beginnen, wenn die Sporen an eine Stelle gelangen, die ideale Wachstumsbedingungen bietet und auskeimen [Bockmühl et al., 2006].

1.5.3 Wachstumsanforderungen

Schimmelpilze besitzen ein breites Wachstumsoptimum und Temperaturspektrum. Sie können daher in psychrophil, das bedeutet „kälteliebend“, mesophil oder auch in thermophil („wärmeliebend“) unterteilt werden. Die meisten Schimmelpilze besitzen ein Temperaturoptimum im Bereich von 15 °C bis 40 °C und sind mesophil [Kück, 2009]. Andere Literaturquellen definieren das Temperaturoptimum im Bereich zwischen 25 °C bis 35 °C [Volkman et al., 2009].

Schimmelpilze können sowohl im Wasser, in der Luft als auch im Erdboden vorkommen, wobei letzteres das Hauptreservoir der meisten Schimmelpilze darstellt. Die Sporen der Schimmelpilze zeigen oft eine Pigmentierung, welche durch Melanine verursacht wird und als UV-Schutz dient. Eine optimale Kultivierung erfolgt bei einem pH-Wert zwischen 4,5 bis 6,5. PH-Werte zwischen 2 und 8 sind tolerierbar. Im Verlauf der Wachstumsphase kann sich der pH-Wert auch aufgrund von metabolischen Vorgängen verändern [Kück, 2009]. Für den Metabolismus der Schimmelpilze ist eine große Menge frei verfügbares Wasser (nicht chemisch gebunden), definiert durch die Wasseraktivität a_w des jeweiligen Substrates, notwendig. Der a_w -Wert wird oftmals mit der relativen Luftfeuchtigkeit gleichgesetzt. Mittels osmotischer Diffusion erfolgt dabei der Transport über die semipermeable Zellmembran in die Hyphen [Kück, 2009], [Pitt et al., 2009]. Jede Schimmelpilzart ist durch einen charakteristischen Feuchtebereich definiert, wobei die meisten Hyphenpilze bei einem a_w -Wert von 0,80 optimal wachsen. Die untere Grenze liegt bei einem a_w -Wert von 0,70. Einige xerotolerante Schimmelpilze können einen a_w -Wert von 0,65 tolerieren [Sedlbauer et al., 2003]. Andere Literaturquellen definieren den optimalen a_w -Wert im Bereich zwischen 0,92 bis 0,99 und das Minimum beträgt 0,62 bis 0,85. [Volkman et al., 2009].

1.5.4 Materialzerstörende Eigenschaften von Schimmelpilzen

Schimmelpilze besitzen die Fähigkeit eine Vielzahl von Materialien zu besiedeln und so zu schädigen, dass sie für den weiteren Gebrauch mitunter nicht mehr genutzt werden können. Dabei können die Schäden in direkt und indirekt unterteilt werden.

Ein direkter Schaden entsteht, wenn Schimmelpilze Enzyme in die Umgebung sekretieren, die in der Lage sind, Makromoleküle wie Proteine, Fette und Kohlenhydrate zu kleineren Einheiten abzubauen. Diese Substrate können durch die Zellmembranen absorbiert werden und als Nährstoffe dienen [Bockmühl et al., 2006], [Kleban, 2008], [Kück, 2009], [Paulus, 2005]. Der entstandene Schaden kann sich beispielsweise in einer beschädigten Narbenstruktur widerspiegeln.

Indirekte Schäden hingegen werden oftmals durch abgesonderte Stoffwechselprodukte, wie beispielsweise organische Säuren verursacht. Die Säuren bedingen eine Veränderung der Textur bzw. Stabilität der Leder und beeinträchtigen damit die Anfärbbarkeit der Materialien während der Herstellung. Eine weitere indirekte Schädigung bildet die Eigenfärbung der Mikroorganismen, wenn diese auf dem Material wachsen [Bockmühl et al., 2006], [Kleban, 2008]. Abbildung 9 verdeutlicht eine durch den Schimmelpilz *H. resiniae* (A) und *P. variotii* (B) hervorgerufene Verfärbung des Halbfabrikats.

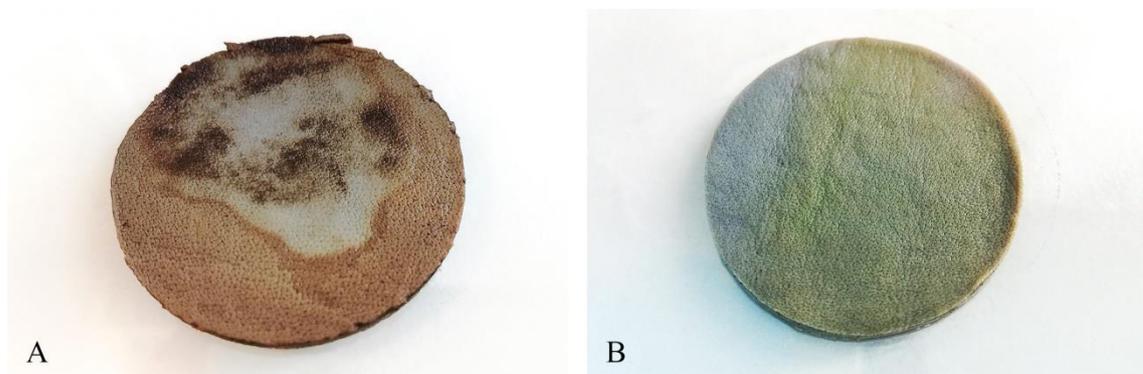


Abb. 9: Verfärbung der Narbenseite des Lederhalbfabrikats Wet-Blue durch *Hormoconis resiniae* (A) und *Paecilomyces variotii* (B)

1.5.5 Charakterisierung der verwendeten Schimmelpilzarten

Die in dieser Bachelorarbeit verwendeten Schimmelpilzarten sind Vertreter, die im Herstellungsprozess des Wet-Blue bzw. während des Transportes oder der Lagerung des Halbfabrikats vorkommen können und aufgrund ihrer Eigenschaften die Fähigkeit besitzen, das Halbfabrikat und Leder als Nährstoffquelle zu nutzen. Einige der Vertreter sind auch Isolate von Leder (z. B. *Aspergillus niger*).

1.5.5.1 *Alternaria tenuissima*

Kolonien der Gattung *Alternaria* variieren in der Farbgebung je nach Art auf KDA von grau-weiß bis tief-schwarz bzw. tief-grün. Die abgegrenzt wachsenden *Alternaria tenuissima* Kolonien haben auf DRYES während einer Kultivierung bei 25 °C, eine hellgrüne, samtige, gefurchte Erscheinung [Samson, 2010]. Der pH-Wert befindet sich mit 5 im leicht sauren Bereich [URL-1]. Die Abbildung 10 verdeutlicht, dass das Erscheinungsbild der Kolonien medienabhängig ist. Laut DSMZ wird eine Kultivierung auf V-8 Juice bei 24 °C empfohlen [URL-3].

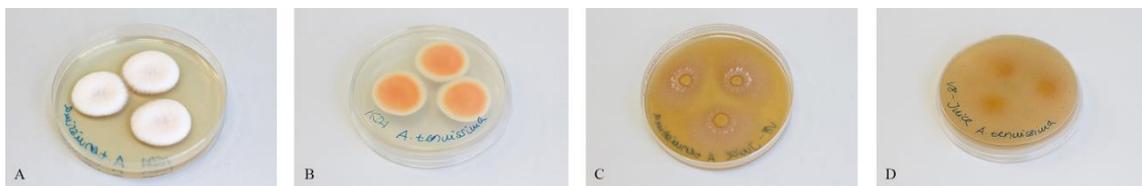


Abb. 10: *Alternaria tenuissima* Oberseite (A, C) und Unterseite (B, D) kultiviert auf KDA (A, B) und V-8 Juice (C, D) bei 24 °C

1.5.5.2 *Aspergillus niger*

Die umgangssprachlich als Gießkannenschimmel bezeichnete Gattung *Aspergillus* bildet typischerweise ornamentartige, abgegrenzte Strukturen auf Festmedien, wenn die Konidien völlig ausdifferenziert sind, wie in Abbildung 11 zu sehen ist. *Aspergillus niger* kommt ubiquitär vor und zeigt ein optimales und schnelles Wachstum auf allen Medien, z. B. auf CzA, bei einer Temperatur von 24-26 °C. Die Konidien sind violett-schwarz, braun-schwarz oder schwarz. Die Unterseite ist cremefarben bis gelblich, kann in einigen Fällen auch dunkelbraun bis schwarz sein. Der Schimmelpilz besitzt ein breites Wachstumsoptimum zwischen 17-42 °C und ist halogenverträglich. *Aspergillus niger* kann niedrige pH-Werte und niedrige Wasseraktivitäten tolerieren [Kück, 2009], [Samson et al., 2010]. Dabei liegt der tolerierte pH-Bereich zwischen 3,0-9,0 bzw. 2,0-11,0. *Aspergillus niger* kann damit in stark sauren und alkalischen Umgebungen wachsen [Coral et al., 2002], [Wheeler et al., 1991]. Das pH-Optimum beträgt 3,0-5,0 [Milala et al., 2005].

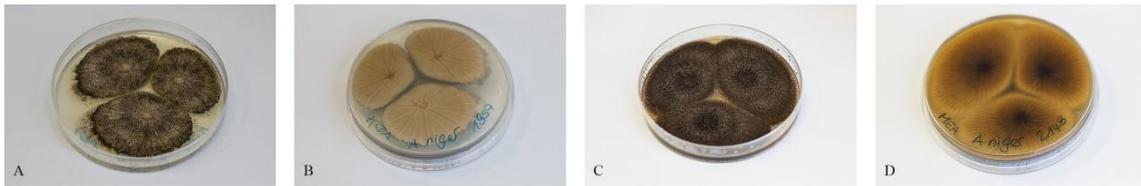


Abb. 11: *Aspergillus niger* Oberseite (A, C) und Unterseite (B, D) kultiviert auf KDA (A, B) und MEA (C, D) bei 28,5 °C

1.5.5.3 *Aureobasidium pullulans*

Die Kolonien wachsen abgegrenzt (Abb. 12) und besitzen bei einer Temperatur von 24 °C auf MEA ein glattes Erscheinungsbild, welches relativ schnell mit schleimigen Sporen bedeckt wird. Diese können gelb, creme, rosa, braun oder schwarz sein. Das Luftmyzel ist manchmal geformt, spärlich oder dünn und flockig. *Aureobasidium*-Arten haben eine weltweite Verteilung. Die minimale Wachstumstemperatur liegt bei 4 °C, das Maximum bei 30 °C. Die optimale Temperatur beträgt 25 °C und die maximal tolerierte Salzkonzentration liegt bei 15% [Samson et al., 2010]. Das pH-Spektrum beträgt 3,0-5,5 und das pH-Optimum liegt im Bereich von 4,0-4,5 [Leathers, 1986].

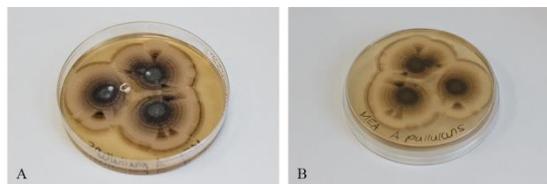


Abb. 12: *Aureobasidium pullulans* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 24°C

1.5.5.4 *Cladosporium cladosporioides* (*montecillanum*)

Die abgegrenzten Kolonien wachsen gut auf DRYES, MEA oder DG18 bei 25 °C. *Cladosporium cladosporioides* ist gefurcht und in der Mitte samtig, stumpf spinat- bzw. blattgrün bis grau-grün mit einem dünnen weißen Rand, wie in Abbildung 13 zu sehen. Die Unterseite erscheint dunkel [De Hoog et al., 2000] [Samson et al., 2010]. Das pH-Spektrum beträgt 4,1-7,6 [Skirdal et al., 1993].

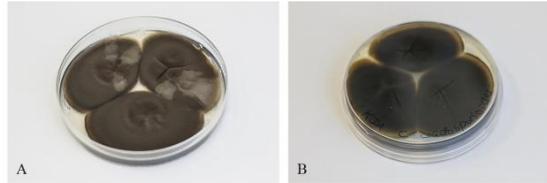


Abb. 13: *Cladosporium cladosporioides* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24°C

1.5.5.5 *Eurotium amstelodami* (= *Aspergillus hollandicus*)

Eurotium amstelodami hat eine weltweite Verbreitung und wächst bzw. sporuliert gut auf M 40 Y. Die Kolonien bestehen aus einem dichten Aufwuchs von grau-grünen Konidiophoren, die aus dem Agar oder dem spärlichen Luftmyzelium und zahlreichen gelben Fruchtkörpern entstanden sind. Die Unterseite der Kolonie ist ungefärbt bis blassgrün (Abb. 14). Der Schimmelpilz ist osmo-, xero- und halotolerant, wächst bei 37 °C in einem pH-Bereich von 4,0-6,5. Niedrige Wasseraktivitäten sind tolerierbar, allerdings ist kein Wachstum bei hohen Wasseraktivitäten möglich [Samson et al., 2010], [Magan et al., 1984].

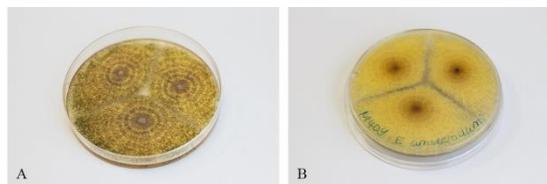


Abb. 14: *Eurotium amstelodami* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf M 40 Y bei 24°C

1.5.5.6 *Fusarium verticillioides*

Charakteristisch ist ein schnelles Wachstum für alle Fusarien-Arten [Kück, 2009]. Dabei wird ein pH-Wert im Bereich zwischen 5,5-7,0 bevorzugt. Ein Wachstumsoptimum wird bei einem a_w -Wert von 0,994-0,98 erreicht [Marin et al., 1995]. Kolonien von *Fusarium verticillioides* wachsen abgegrenzt auf KDA oder KSA bei 25 °C leicht cremefarben bis teilweise pfirsichfarben oder violett bis lila. Das Luftmyzelium ist weiß und dicht, zart, flockig bis samtig oder mit einem pulverförmigen Erscheinungsbild. Die untere Seite wirkt leicht creme bis gelb mit dunkelvioletten, weinroten oder hellen Schattierungen (Abb. 15). Einige Isolate können unter anaeroben Bedingungen wachsen und manche tolerieren >15% NaCl im Medium. Ein optimaler Temperaturbereich liegt zwischen 22,5-

27,5 (-35) °C [Samson et al., 2004], [Samson et al., 2010]. Und ein bevorzugter pH-Bereich ist 4,5-7,0 [Flaherty et al., 2003].

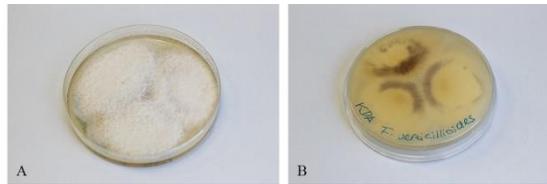


Abb. 15: *Fusarium verticillioides* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24 °C

1.5.5.7 *Hormoconis resiniae*

Die anamorphe Form von *Cladosporium resiniae* (*Hormoconis resiniae*), hat ein Wachstumsoptimum bei 20 °C auf MEA [URL-4]. Der bevorzugte pH-Wert beträgt 4,5 bzw. 5,0 [Walker et al., 1973], [Qi et al., 2002]. Der Schimmelpilz wächst abgegrenzt und die Kolonien sind auf der Oberseite braun und auf der Unterseite braun bis schwarz, wie in der Abbildung 16 ersichtlich ist. Weitere Nährmedien sind KDA, HA oder DG18 [Seifert et al., 2007].

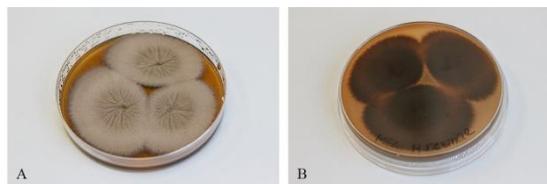


Abb. 16: *Hormoconis resiniae* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 20 °C

1.5.5.8 *Mucor racemosus*

Vertreter der Gattung *Mucor* werden oft auch als „Köpfchenschimmel“ bezeichnet und zeichnen sich durch ein schnelles Wachstum aus. Alle Mucoraceen gelten als koprophil, d. h. „dungliebend“ [Kück, 2009]. Die ursprünglich weißen, abgegrenzten Kolonien von *Mucor racemosus* werden mit dem Alter bräunlich bis grau aufgrund der intensiven Sporenbildung (Abb. 17). Gutes Wachstum und eine gute Sporulation zeigt sich zwischen 5-30 °C. Die optimale Temperatur liegt zwischen 20-25 °C und die Maximaltemperatur beträgt ca. 37 °C. KDA eignet sich als Anzuchtmedium bei einem pH-Wert von 5,8±0,1 [Samson, 2010], [Dantigny, 2002].

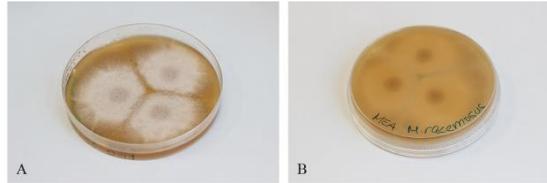


Abb. 17: *Mucor racemosus* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 20 °C

1.5.5.9 *Paecilomyces variotii*

Die abgegrenzten Kolonien wachsen schnell auf MEA bei 25 °C. Weitere Anzuchtmedien sind V-8 Juice oder CHA. *Paecilomyces variotii* besteht aus dichten und zahlreichen Konidiophoren, die den Kolonien ein pulverförmiges, mattes und oliv- bis gelbbraunes Aussehen verleihen. Die Unterseite wirkt fast identisch, wie die Abbildung 18 veranschaulicht. Der Schimmelpilz zeigt ein thermotolerantes Wachstum (40-65 °C) und lässt sich optimal bei 37 °C im pH-Bereich von 4,5-6,5 kultivieren [Samson, 2010], [Horn et al., 1992], [Battestin et al., 2007].

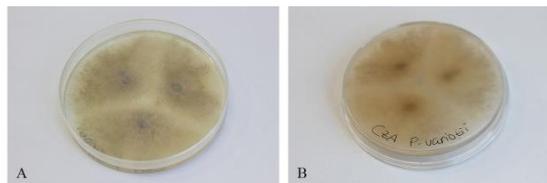


Abb. 18: *Paecilomyces variotii* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf CzA bei 28,5 °C

1.5.5.10 *Penicillium chrysogenum*

Die Gattung *Penicillium* wird auch umgangssprachlich als „Pinselschimmel“ bezeichnet. [Kück, 2009]. Tolerierbare pH-Werte befinden sich im Bereich von 4,0-6,5 bei einem a_w -Wert von 0,79-0,83 [Magan et al., 1984]. *Penicillium chrysogenum* Kolonien wachsen abgegrenzt auf CHA bei 25 °C. Der Schimmelpilz kann eine geringe Luftfeuchtigkeit tolerieren [URL-5]. Die Konidien haben eine gelb-grüne bis hellblau-grüne Farbe und werden im Alter dunkler, samtig bis etwas flockig. Wenn Exsudate (austretende Metabolite) vorhanden sind, sind diese typischerweise als gelbe Tropfen zu sehen. Die Unterseite ist stark gelb, beige oder blasse-creme. Auf MEA wachsen die Kolonien meist schneller, die Konidien sind blaugrün bis grün mit flachen samtigen oder leicht flockigen Aussehen und blasser oder gelber Unterseite. *P. chrysogenum* ist halotolerant und psychrotolerant. Der Schimmelpilz wächst gut im Temperaturbereich zwischen 5 bis 30

°C [De Hoog et al., 2000] [Samson et al., 2010]. Abbildung 19 zeigt die Kultivierung auf KDA.

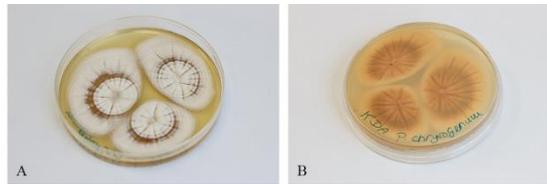


Abb. 19: *Penicillium chrysogenum* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24°C

1.5.5.11 *Penicillium funiculosum*

Das oft gelbe vegetative Myzel von *Penicillium funiculosum* wächst abgegrenzt auf CHA bei 25 °C. Die Konidiophoren sind grau bis gelb-grün. Die Unterseite wirkt pink bis tiefrot oder orange-braun (Abb. 20). Wenn Exsudate vorhanden sind, zeigen sich gelbe Tröpfchen. Auf MEA sind die Konidien grau-grün und auf der Unterseite blass. Die Kolonien wachsen schnell. *Penicillium funiculosum* ist thermotolerant. Der Schimmelpilz wächst bei 30 °C und 37 °C [Samson, 2010].

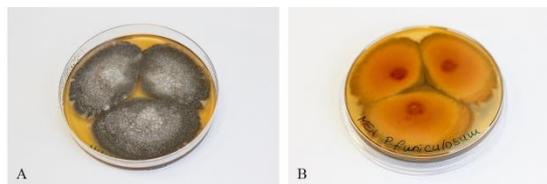


Abb. 20: *Penicillium funiculosum* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 24°C

1.5.5.12 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae Kolonien wachsen flächendeckend, weißlich und werden im Verlauf bräunlich-grau (Abb. 21). Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 30-35 °C, minimal ca. 5-7 °C und maximal 44 bis 49 °C [Samson, 2010]. Als Anzuchtmedium eignet sich KDA [Tai et al., 2010]. Ein tolerierbarer pH-Bereich beträgt 5,5-7,5. Das Optimum befindet sich bei 5,5 [Kumar et al., 2005].

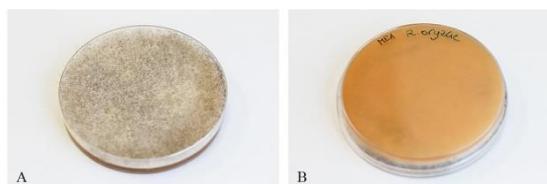


Abb. 21: *Rhizopus oryzae* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 28,5 °C

1.5.5.13 *Scopulariopsis brevicaulis*

Die abgegrenzt wachsenden Kolonien von *Scopulariopsis brevicaulis* können gut bei 24°C auf MEA kultiviert werden [Samson et al., 2004]. Das pH-Optimum befindet sich im Bereich zwischen 9-10 [Bothast et al., 1975]. Das Myzel ist erst weiß und kann später bräunlich-rosa oder weinrot bis gelbbraun werden. Die Kolonien wirken pulvrig bzw. staubig mit auffallenden Noppen im mittleren Bereich. Die Unterseite ist cremefarben mit bräunlichen Schattierungen (Abb. 22) [De Hoog et al., 2000] [Samson et al., 2010].

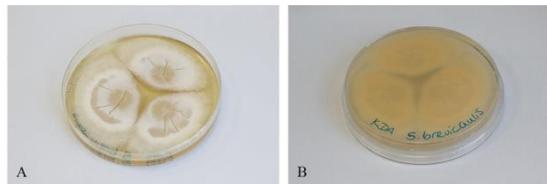


Abb. 22: *Scopulariopsis brevicaulis* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf KDA bei 24°C

1.5.5.14 *Trichoderma viride*

Kolonien von *Trichoderma viride* wachsen flächendeckend auf HA bei 20 °C zunächst mehr oder weniger transparent, später mit weißlich-grünen Schattierungen, wie in Abbildung 23 dargestellt. Die Unterseite erscheint farblos [Samson, 2004]. Der Schimmelpilz besitzt ein breites Temperaturspektrum zwischen 0-37 °C, das Optimum befindet sich bei 25 °C [Samson, 2004], [Singh et al., 2014]. Der benötigte pH-Wert liegt im schwach sauren Bereich zwischen 3,0-5,0 [Brown et al., 1977], [Anand et al., 2006]. Für die Sporenbildung ist ein a_w -Wert von 0,98 erforderlich [Kück, 2009].

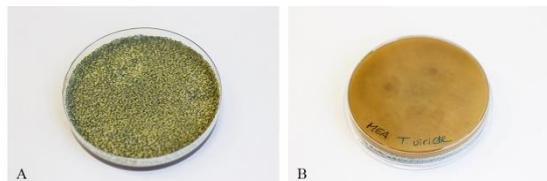


Abb. 23: *Trichoderma viride* Oberseite (A) und Unterseite (B) kultiviert auf MEA bei 24 °C

1.6 Bewuchstests

Der TEGEWA-Test, die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer und der Tropical Chamber-Test sind Testverfahren zur Überprüfung der Anfälligkeit von Halbfabrikaten und Leder gegenüber Schimmelpilzen unter für sie günstigen Wachstumsbedingungen. Für ein optimales Wachstum der Schimmelpilze auf dem Halbfabrikat Wet-Blue wurden diese

Kultivierungsbedingungen übernommen. Auf ein Biozid, welches normalerweise bei der Herstellung des Halbfabrikats eingesetzt wird, wurde verzichtet, um ein maximal mögliches Pilzwachstum zu erreichen. Dabei variieren die Kultivierungsbedingungen aus den Testverfahren und dies wird in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.6.1 TEGEWA-Test

Der TEGEWA-Test ist eine weit verbreitete Methode zur Überprüfung der Schimmelpilzfestigkeit von Halbfabrikaten (Wet-Blue). Bei diesem so genannten „Agardiffusionstest“ werden Wet-Blue Prüflinge direkt auf ein Agarmedium für Schimmelpilze platziert, welches zuvor gleichmäßig mit einer definierten Sporensuspension beimpft wurde (Abb. 24). Die Petrischalen werden anschließend bei geeigneten Kultivierungstemperaturen der Schimmelpilze inkubiert. Nach ca. 28 Tagen erfolgt eine optische Auswertung der Oberfläche der Proben (Fleisch- und Narbenseite) auf Pilzbewuchs [Christner et al., 1996].

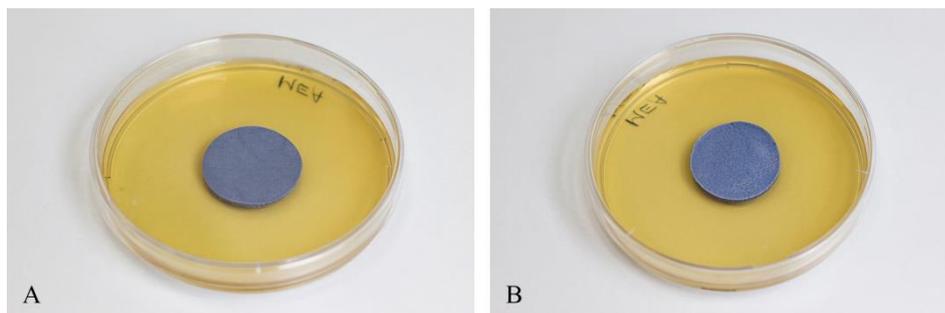


Abb. 24: Aufbau TEGEWA-Test mit Narbenseite (A) und Fleischseite (B)

1.6.2 Direktbeimpfung / Feuchte Kammer

Die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer (Abb. 25) ist eine FILK-Hausmethode zur Bestimmung des Potenzials für Schimmelwachstum auf Halbfabrikaten und Leder und ist in der Richtlinie PV 3970, die Bestandteil der TL52064 VW [Volkswagen AG, 2009] ist, geregelt. In der Literatur ist dieser Test in abgewandelter Form auch als „Inkubationstest“ beschrieben und dient normalerweise der Prüfung der Schimmelpilzfestigkeit von Halbfabrikaten bei Einsatz von Fungiziden. Dabei steht das Probenmaterial (Wet-Blue) als alleinige Nährstoffquelle für das Wachstum von diversen Schimmelpilzen zur Verfügung (Abb. 26). Durch die Abschirmung der Proben in der Kammer (Proben liegen in einzelnen Petrischalen auf feuchtem Filterpapier) und

sämtlicher Vorbereitung in keimfreier Umgebung, soll eine keimarme Umgebung für die Prüflinge gewährleistet werden. Es sollen nur die bereits auf dem Material vorhandenen Sporen auskeimen und wachsen.

Zur Aufrechterhaltung der Feuchtigkeit in den Proben, ist die Feuchte Kammer dicht verschlossen und der Boden der Feuchten Kammer leicht mit Wasser bedeckt. Gemäß der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur der Schimmelpilze wird die Feuchte Kammer entsprechend inkubiert. Nach ca. 28 Tagen erfolgt eine optische Auswertung der Oberfläche der Proben (Fleisch- und Narbenseite) auf Pilzbewuchs [Leppchen-Fröhlich, 2017], [Christer, 1996], [Volkswagen AG, 2009].

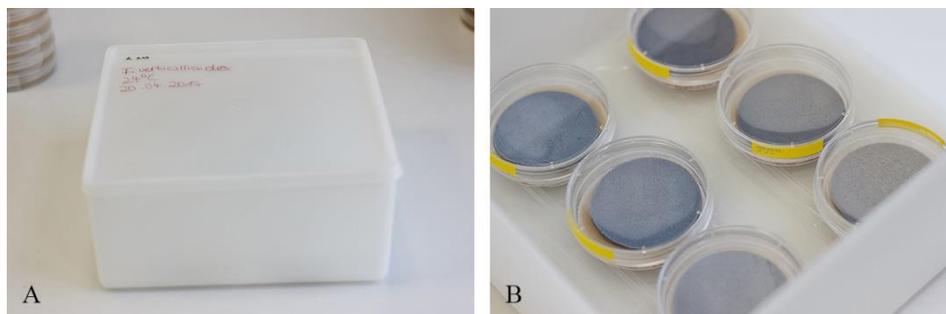


Abb. 25: Direktbeimpfung / Feuchte Kammer Außen (A) und Innen (B) am Beispiel von *Fusarium verticillioides*

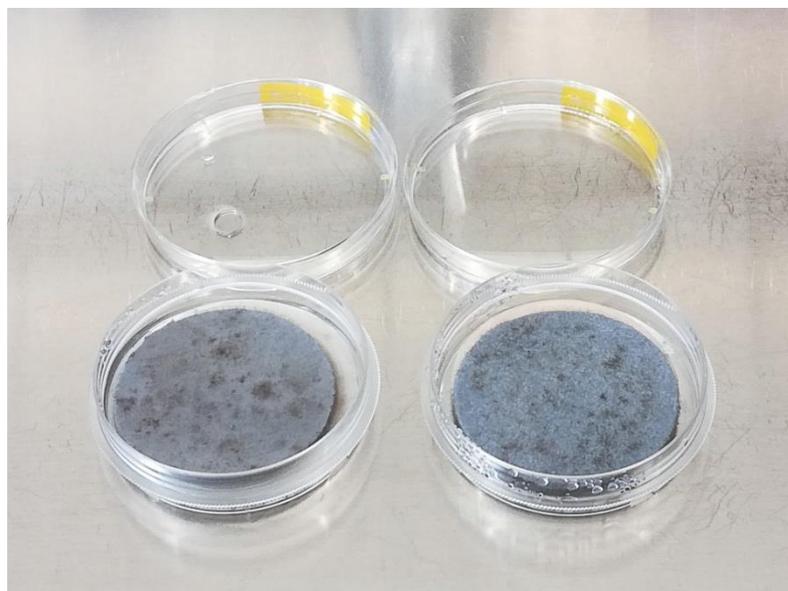


Abb. 26: Wet-Blue Prüflinge aus der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer nach Inkubation mit *Hormoconis resiniae*

1.6.3 Tropical Chamber-Test

Eine weitere Hausmethode des FILK ist der Tropical Chamber-Test. Dieser ist an die Norm ASTM D7584-10 angelehnt und dient normalerweise auch der Prüfung der Schimmelpilzfestigkeit von Halbfabrikaten bei Einsatz von Fungiziden [ASTM, 2010]. Die Tropical Chamber ist eine isolierte Kammer (Abb. 27) mit geregelter Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Als Medium dient dreifach autoklavierte Erde, welche mit Kartoffel-Dextrose-Pulver angereichert wird. Die Erde wird mit jeweils 10^6 Sporen/ml pro Schimmelpilze beimpft. Die okultierten Schimmelpilze sind der Tabelle 1 aufgeführt und entsprechen den im Herstellungsprozess des Wet-Blue möglicher Schimmelpilze bzw. um Vertreter, die von Leder isoliert wurden. Die Materialprüflinge werden über der inokulierten Erde an Stangen gehängt. Sensoren regeln die Temperatur von $32,5 \pm 1$ °C und die Luftfeuchtigkeit auf 95-98%. Dies sind optimale Wachstumsbedingungen für Schimmelpilze. Gemäß der Norm ASTM D7584-10 sorgt ein Ventilator für eine entsprechende Luftzirkulation, welcher jedoch in der eingesetzten Tropical Chamber nicht vorhanden war. Nach ca. 28 Tagen erfolgt eine optische Auswertung der Oberfläche der Proben (Fleisch- und Narbenseite) auf Pilzbewuchs [ASTM, 2010].

Tabelle 1: Ausgewählte Testorganismen für die Tropical Chamber

Schimmelpilze	Stamm
<i>Aspergillus niger</i> (isoliert von Leder)	DSM 1957
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 1958
<i>Aspergillus versicolor</i>	DSM 1943
<i>Chaetomium globosum</i> (isoliert von Baumwolle & Leder)	DSM 1962
<i>Hormoconis resinae</i> (isoliert von Wet-Blue)	CBS 115963
<i>Paecilomyces variotii</i>	DSM 1961
<i>Penicillium funiculosum</i>	DSM 1960
<i>Penicillium pinophilum</i>	DSM 1944
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 9122
<i>Trichoderma viride</i>	DSM 63065
<i>Trichoderma virens</i>	DSM 1963



Abb. 27: Tropical Chamber-Test Außen (A) und Innen (B)

1.7 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen

Durch die Extraktion mit der Soxhlet-Apparatur (Abb. 28 (A)) sollen die in Dichlormethan löslichen Stoffe in kollagenhaltigen Substanzen und Leder ermittelt werden. Dabei sollen vor allem Fette und ähnliche Stoffe aus dem Leder mit dem organischen Lösungsmittel Dichlormethan extrahiert werden. Allerdings werden teilweise auch Nichtfettstoffe, wie Schwefel herausgelöst. Ein weiteres Verfahren ist die Extraktion mit einem Hochdrucksystem [DIN EN ISO 4048, 2008]. Die so genannte Trockensubstanz wird dabei mit Hilfe eines Halogentrockners bestimmt (Abb. 28 (B)). Bei diesem Thermogravimetrischen Verfahren handelt es sich um eine Wäge-Trocknungs-Methode. Dabei wird die Probe mit Hilfe eines Halogen-Heizmoduls bis zum Erreichen einer Massenkonstanz erwärmt. Die dabei abgegebene Massenänderung entspricht der abgegebenen Feuchtigkeit [Mettler-Toledo AG, 2011].



Abb. 28: Soxhlet- Apparatur (A) und Halogentrockner (B)

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung, ob ausgewählte Schimmelpilze Lederhalbfabrikate (Wet-Blue) als Nahrungsgrundlage nutzen und zu deren Schädigung führen. Mit Hilfe verschiedener Kultivierungsmethoden soll das Wachstum der Schimmelpilze auf Halbfabrikaten gezielt gefördert, beobachtet und anschließend ausgewertet werden. Aussagen über mögliche resultierende Oberflächenschädigungen sollen in mikroskopischen Untersuchungen getroffen werden. Eine Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen soll Aussagen über die eventuelle verwendete Nahrungsgrundlage der Schimmelpilze geben.

3 Material

3.1 Chemikalien

- Physiologische Kochsalzlösung 0,9%
- (NaCl, LOT: 264215199, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
- Glycerin, Charge 364218506, Firma: ROTH ROTIPURAN®
- Tween 80 0,1%, Roth Nr. 54401
- NaNO₃, LOT: 274216275, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- MgSO₄ x 7 H₂O, LOT: 334217199, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- KCl, LOT: 224213940, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Fe₂(SO₄)₃ x H₂O, LOT: SZBG054AV, Firma: Honeywell/Fluka™; Fisher Scientific GmbH, Schwerte
- KH₂PO₄, Charge: 234214972, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- K₂HPO₄, Charge: 354218354, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Agar-Agar, LOT: V624314, Firma: MERCK, Darmstadt
- Hefeextrakt, LOT: 1.03753, Firma: MERCK, Darmstadt
- Saccharose, LOT: K37319951728, Firma: Merck KGaA, Darmstadt
- Malzextrakt, LOT: VM264491106, Firma: Merck KGaA, Darmstadt
- Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon, Charge: 243198504, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Pepton aus Soja, Charge: 14784458, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- V-8 Juice, Bio-Saft (Tomate), 09.06.2016
- CaCO₃, Art. 2414.1000, Firma: CHEMSOLUTE, Th. Geyer, Renningen
- CZAPEK-DOX-Agar, LOT: VM714560649, Firma: Merck kGAA, Darmstadt
- Malzextrakt-Agar, LOT: VM716698603, Firma: Firma: Merck kGAA, Darmstadt
- FeSO₄ x 7 H₂O, LOT: 144208007, Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Dichlormethan, Charge: 396242735, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.2 Medien

- CZAPEK-DOX-Agar
(pH 7,2)

	Saccharose	30,00 g/l
	NaNO ₃	3,00 g/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g/l
	KCl	0,50 g/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g/l
	K ₂ HPO ₄	1,00 g/l
	Agar-Agar	13,00 g/l
-	Kartoffel-Dextrose-Agar	
	Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon	26,50 g/l
	besteht aus: Kartoffel-Infusion 6,5 g/l, Glucose 20,00 g/l, pH 5,6±0,2	
	Agar-Agar	15,00 g/l
-	Malzextrakt-Agar (pH 5,6)	
	Malzextrakt	30,00 g/l
	Soja-Pepton	3,00 g/l
	Agar-Agar	15,00 g/l
-	M 40 Y	
	Saccharose	400,00 g/l
	Malzextrakt	20,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	Agar-Agar	20,00 g/l
-	V-8 Juice Agar (pH 7.2)	
	V-8 Juice	200,00 ml
	CaCO ₃	3,00 g/l
	Agar-Agar	15,00 g/l

3.3 Schimmelpilze

Tabelle 2: Verwendete Testorganismen

Spezies	Stamm
<i>Alternaria tenuissima</i>	DSM 63360
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1957
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 2143
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 3042
<i>Cladosporium cladosporioides (montecillanum)</i>	DSM 62121
<i>Eurotium amstelodami (= Aspergillus hollandicus)</i>	DSM 62629
<i>Fusarium verticillioides</i>	DSM 62264
<i>Hormoconis resiniae</i>	DSM 63423
<i>Mucor racemosus</i>	DSM 62760
<i>Paecilomyces variotii</i>	DSM 1961
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 848
<i>Penicillium funiculosum</i>	DSM 10640
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 2201
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 9122
<i>Trichoderma viride</i>	DSM 63065

3.4 Geräte

- Sterilbank: ENVAIR eco safe®, Geräte-Nr: SCS 1-5 117, Firma: ENVAIR Deutschland GmbH, Emmendingen
- Waage: Sartorius BP221S, Firma: SARTORIUS AG, Göttingen
- Autoklav: Systec VX-65, Firma: Systec GmbH, Linden
- Mikroskop: ZEISS Scope. A1, Seriennummer: 3329000234, Carl Zeiss AG, Oberkochen (Kamera: Axio CamMRC)
- Brutschrank: Infors HT Minitron, Firma: INFORS AG, Bottmingen
- Brutschrank: Memmert, Firma: Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
- Tiefkühlschrank: Fryka -80 °C, Firma: FRYKA-Kältetechnik GmbH, Esslingen
- Stanze: Maschinen-Nr: 101296, Baujahr: 2007, Firma: schoen + sandt machinery GmbH, Pirmasens
- Tropical Chamber: Firma: Forschungsinstitut Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg

- Neubauer Zählkammer: bright-line Profondeut, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² Fläche, Marienfeld
- Feuchte Kammer mit Einsatz: Firma: Forschungsinstitut Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg
- Soxhlet-Apparatur: Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf
- Halogentrockner (Moisture Analyzer) HB43-S: Firma: Mettler-Toledo AG Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee
- Wärmeschrank (Thermo ELECTRON CORPORATION) T6P: Firma: Heraeus, Langenselbold

3.5 Materialien

- Wet-Blue: Kalbshaut, 1,5 mm Dicke, ohne Biozid, pH 3,6-3,8
- Filterpapier: Ø 4 cm

4 Methoden

4.1 Herstellung der Nährmedien

Die verschiedenen Zusätze wurden entsprechend der angegebenen Rezeptur (Kapitel 3 Unterpunkt 3.2) abgewogen und mit destilliertem Wasser in einer Glasflasche suspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und jeweils 20 ml des Mediums unter der Sterilbank in eine sterile Petrischale gegossen und erstarren gelassen.

4.2 Beimpfung der Nährmedien und Kultivierung der Schimmelpilze

Jeder Schimmelpilzstamm wurde unter der Sterilbank mittels Dreipunktbeimpfung auf jeweils drei Agarplatten des gemäß DSMZ vorgegebenen Nährmediums beimpft und bei optimaler Wachstumstemperatur entsprechend Tabelle 3 im Brutschrank oder bei Raumtemperatur bis zur Sporulation kultiviert.

Tabelle 3: Schimmelpilze und Kultivierungsbedingungen

Spezies	Stamm	Medium	Wachstums- temperatur
<i>Alternaria tenuissima</i>	DSM 63360	V-8 Juice; KDA	24 °C
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1957	KDA	28,5 °C
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 2143	MEA	28,5 °C
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 3042	MEA	24 °C
<i>Cladosporium cladosporioides (montecillanum)</i>	DSM 62121	KDA	24 °C
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	DSM 62629	M 40 Y	24 °C
<i>Fusarium verticillioides</i>	DSM 62264	KDA	24 °C
<i>Hormoconis resiniae</i>	DSM 63423	MEA	20 °C
<i>Mucor racemosus</i>	DSM 62760	MEA	20 °C
<i>Paecilomyces variotii</i>	DSM 1961	CzA	28,5 °C

Spezies	Stamm	Medium	Wachstums- temperatur
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 848	KDA	24 °C
<i>Penicillium funiculosum</i>	DSM 10640	MEA	24 °C
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 2201	MEA	28,5 °C
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 9122	KDA	24 °C
<i>Trichoderma viride</i>	DSM 63065	MEA	24 °C

4.3 Einstellung der Sporensuspension

Für die Einstellung der Sporensuspension wurden auf den jeweiligen in den Petrischalen kultivierten Schimmelpilz 5 ml sterile, physiologische Kochsalzlösung mit 0,1% Tween 80 gegeben und die Sporen mittels Drigalskispatel abgeschabt. Die Sporensuspension wurde abpipettiert und in einem 50-ml-Falcontube durch sterile Watte filtriert, um die Sporen vom Myzel abzutrennen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Watte mittels Pinzette ausgedrückt und verworfen. Die Konzentration der Sporensuspension wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl auf die Zählkammer gegeben. Die Sporenkonzentration wurde mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung, welche 0,1% Tween 80 enthält, verdünnt und auf 10⁶ Sporen/ml eingestellt.

4.4 Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test

Für die Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test wurden jeweils 100 µl Sporensuspension (10⁶ Sporen/ml) auf jeweils sieben Petrischalen pipettiert und mit einem Drigalskispatel verteilt. Die Petrischalen enthielten das gemäß DSMZ vorgegebene Nährmedium für die jeweiligen Schimmelpilze. Anschließend wurden je drei Prüflinge (ein Prüfling pro Petrischale, Ø 3 cm, Dreifachansatz) mit der Narbenseite nach oben und drei Prüflinge mit der Fleischseite nach oben auf den Agar gelegt. Eine weitere Petrischale wurde als Wachstumskontrolle, ohne Prüfling, verwendet. Die Inkubation wurde für ca. drei Monate durchgeführt.

4.5 Kultivierung in Anlehnung an die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer

4.5.1 Herstellung der Feuchten Kammer

Die Kammer wurde desinfiziert, anschließend Platzhalter eingelegt und mit Wasser befüllt, so dass der Boden leicht bedeckt ist und die später eingelegten Petrischalen mit den Proben nicht im Wasser stehen.

4.5.2 Vorbereitung der Petrischalen

Pro Probe wurde eine Petrischale verwendet (drei für Narbenseite und drei für Fleischseite, Dreifachansatz). Jeweils fünf sterile Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 4,5 cm wurden mit Hilfe einer Pinzette pro sterile Petrischale eingelegt und anschließend mit jeweils 2,5 ml sterilem Wasser übergossen.

4.5.3 Vorbereitung der Prüflinge und Inkubation

Sechs Lederhalbfabrikat-Prüflinge pro Schimmelpilz wurden auf einen Durchmesser von 4,5 cm gestanzt. Jeweils ein Prüfling wurde mit Hilfe einer Pinzette direkt auf das feuchte Filterpapier der Petrischalen überführt, einmal mit der Narbenseite bzw. einmal mit der Fleischseite nach oben. Anschließend wurde pro Petrischale 100 µl der auf 10^6 Sporen/ml eingestellten Sporensuspension direkt auf den Prüfkörper gegeben und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Sechs Petrischalen wurden in jeweils einer Feuchten Kammer platziert und die Kammern dicht verschlossen. Entsprechend der für den jeweiligen Schimmelpilz optimalen Wachstumstemperatur wurde die Feuchte Kammer im Brutschrank oder bei Raumtemperatur für ca. drei Monate inkubiert

4.6 Kultivierung in Anlehnung an den Tropical Chamber-Test

Fünf Lederhalbfabrikat-Prüflinge wurden auf 7,5 x 4,5 cm gestanzt, gelocht und in die Tropical Chamber über die mit Sporen beimpfte Erde gehängt (Fünfachansatz). Die Proben wurden bei $32,5 \pm 1$ °C und 95-98% Luftfeuchtigkeit für drei Monate inkubiert.

4.7 Herstellung der Kryokulturen

Zur Lagerung bzw. Archivierung der Schimmelpilze wurden Kryokulturen hergestellt. Pro Schimmelpilz wurden zwei Kryokulturen angefertigt. Jeweils 1,5 ml Nährmedium wurden ohne Agar in ein Kryoröhrchen gefüllt und mit jeweils 15% Glycerin und 0,05% Tween 80 suspendiert. Mit einer Impföse wurden ein paar Sporen von den auf den

Agarplatten kultivierten Schimmelpilzen entnommen und der Suspension untergemischt.
Die Kryokulturen wurden abschließend bei -80 °C eingefroren.

4.8 Mikroskopische Untersuchungen der Materialoberfläche

4.8.1 Vorbereitung der Prüflinge

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden aus allen Kultivierungsmethoden pro Schimmelpilz die Narbenseiten, die Fleischseiten und die unterwachsenen Narbenseiten (aus der TEGEWA-Methode) genutzt. Der Prüfling wurde kurz in 70%igen Ethanol getaucht und anschließend wurde der Schimmelpilz von der Oberfläche des Prüflings durch (leichtes) Abschaben mittels Messer, Zellschaber oder Skalpell entfernt. Der Prüfling wurde nochmal kurz in 70%igen Ethanol getaucht und anschließend über Nacht getrocknet und gepresst.

4.8.2 Mikroskopie

Die Narbenseiten, Fleischseiten und unterwachsenen Narbenseiten (aus der TEGEWA-Methode) wurden bei 100-facher und 200-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop betrachtet. Die verschiedenen Bildebenen (Schärfeebenen) wurden mit Photoshop CC übereinandergelegt.

4.9 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen

4.9.1 Probenvorbereitung

Die mit Schimmelpilzbewachsenen, ausgewählten Wet-Blue Prüflinge wurden in 70%igen Ethanol getaucht und durch Abschaben mittels Messer, Skalpell oder Zellschaber vom Schimmelpilz befreit. Anschließend wurden die Prüflinge in 5 x 5 mm (± 2 mm) Stücke zerschnitten.

4.9.2 Bestimmung der Trockensubstanz

Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden pro Prüfling 0,5 – 1 g abgewogen und die Trockensubstanz im Halogentrockner bestimmt.

4.9.3 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen

Für die Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen wurden 5-10 g der vorbereiteten Probe (Einwaage) mit einer Analysewaage gewogen und gleichmäßig in einer Extraktionshülse platziert. Die Probe wurde mit einer dünnen Schicht Watte (aus Baumwolle) bedeckt. Das mit Siedesteinen versehene Extraktionsgefäß wurde 16 h bei 102 ± 2 °C getrocknet und nach dem Abkühlen (im Exsikkator) gewogen. Die mit der

Probe versehene Extraktionshülse wurde in der Soxhlet-Apparatur platziert und 6 h (ca. 30 Lösungsmittelwechsel) kontinuierlich mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend wurde das Dichlormethan im Auszug durch Destillation abgetrennt. Das mit Siedesteinen und der in Dichlormethan löslichen Substanz versehene Extraktionsgefäß wurde im Wärmeschrank bei $102 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht getrocknet und nach dem Abkühlen (im Exsikkator) gewogen.

Die in Dichlormethan extrahierbaren Bestandteile (als Massenanteil in Prozent) ergeben sich nach der Gleichung:

$$\frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \cdot F$$

Dabei ist:

m_1 die Masse der eingewogenen Probe in g

m_0 die Masse der Auswaage in g

Und

$$F = \frac{100}{100 - w}$$

Dabei ist:

w der Masseanteil der flüchtigen Bestandteile in Prozent

5 Ergebnisse

5.1 Einstellung der Sporensuspension

Tabelle 4 zeigt die eingestellten Sporensuspensionen der bis zur Sporulation kultivierten Schimmelpilze. Weiterhin sind die DSMZ-Nummern und Anzuchtmedien aufgelistet. Die Sporensuspension wurde jeweils auf 10^6 Sporen/ml eingestellt.

Tabelle 4: Eingestellte Sporenanzahl

Spezies	DSMZ-Nummer	Medium	Sporen/ml
<i>Alternaria tenuissima</i>	DSM 63360	V-8 Juice KDA	$4,07 \cdot 10^6$ $6,80 \cdot 10^6$
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1957	KDA	$6,07 \cdot 10^6$
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 2143	MEA	$6,08 \cdot 10^6$
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 3042	MEA	$2,54 \cdot 10^6$
<i>Cladosporium cladosporioides (montecillanum)</i>	DSM 62121	KDA	$3,67 \cdot 10^6$
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	DSM 62629	M 40 Y	$3,14 \cdot 10^6$
<i>Fusarium verticillioides</i>	DSM 62264	KDA	$6,38 \cdot 10^6$
<i>Hormoconis resiniae</i>	DSM 63423	MEA	$3,74 \cdot 10^6$
<i>Mucor racemosus</i>	DSM 62760	MEA	$3,92 \cdot 10^6$
<i>Paecilomyces variotii</i>	DSM 1961	CzA	$3,07 \cdot 10^6$
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 848	KDA	$4,99 \cdot 10^6$
<i>Penicillium funiculosum</i>	DSM 10640	MEA	$6,28 \cdot 10^6$
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 2201	MEA	$2,12 \cdot 10^6$
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 9122	KDA	$2,18 \cdot 10^6$
<i>Trichoderma viride</i>	DSM 63065	MEA	$4,95 \cdot 10^6$

5.2 Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test

Die Oberflächen der Wet-Blue Prüflinge wurden während der Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test hinsichtlich ihres Bewuchses mit Schimmelpilzen beurteilt. Dabei zeigt Abbildung 29 (A) einen vollständigen, (B) einen teilweisen und (C) keinen Bewuchs des Prüflings am Beispiel verschiedener Schimmelpilze.



Abb. 29: Beispiel eines vollständig (durch *Rhizopus oryzae*) (A), teilweisen (durch *Paecilomyces variotii*) (B) und nicht (mit *Eurotium amstelodami*) (C) bewachsenen Wet-Blue Prüflings

Im Diagramm (Abb. 30 und Abb. 31) wird der stärkste Bewuchs der Narben- bzw. Fleischseiten aus den Dreifachansätzen pro Schimmelpilz dargestellt. Die genauen Kultivierungszeiträume und Beschreibungen des Bewuchses sind im Anhang in der Tabelle 7,8,9 zusammengetragen.

In allen Fällen zeigte sich ein Bewuchs der Narbenseiten der Wet-Blue Prüflinge durch Schimmelpilze nach einer Kultivierung von mindestens 60 Tagen. Dabei wiesen *A. niger* DSM 2143, *P. variotii*, *P. funiculosus*, *R. oryzae* und *T. viride* im Kultivierungszeitraum von ca. 30 bis 90 Tagen das stärkste Wachstum auf. *C. cladosporioides* und *S. brevicaulis* haben im Gegensatz dazu den Prüfling kaum bewachsen. Bemerkenswert war das Wachstum von *A. tenuissima* (KDA) und *E. amstelodami*, da der Prüfkörper nach 60 Tagen größtenteils bzw. vollständig bedeckt wurde.

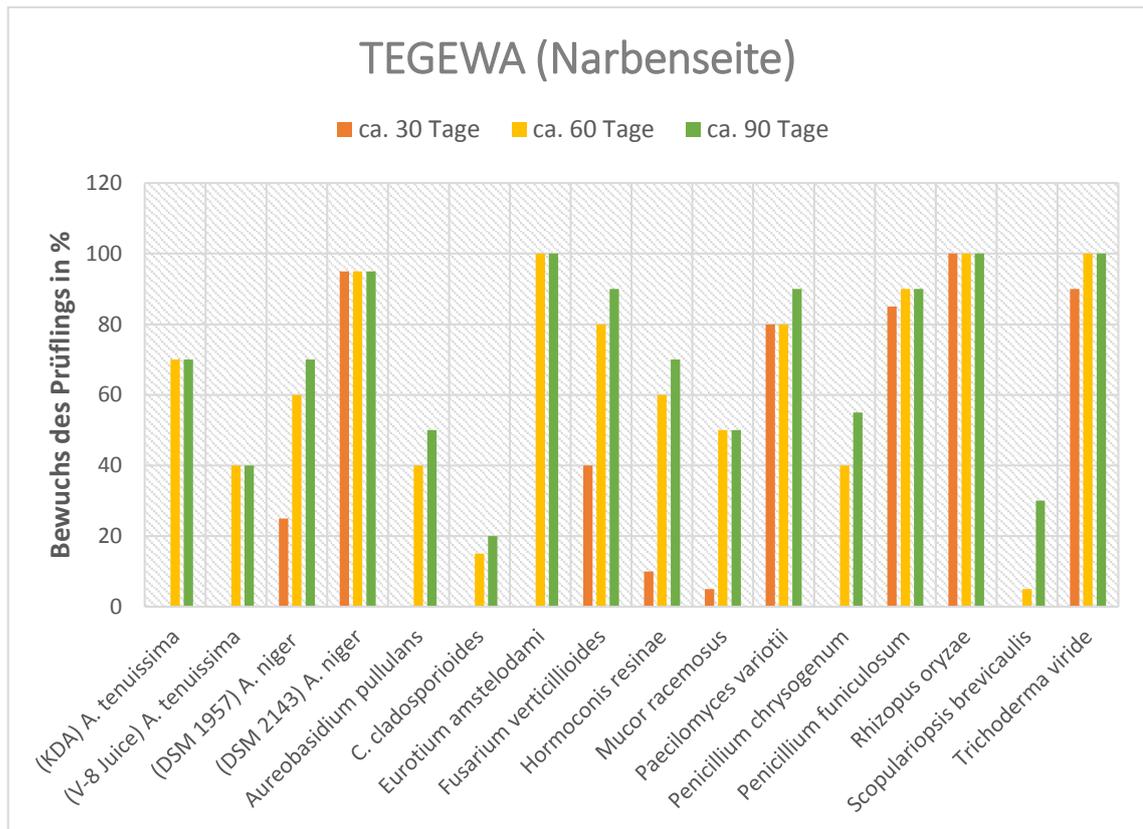


Abb. 30: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen im TEGEWA-Test

Nach einer Kultivierung von mindestens 60 Tagen zeigte sich bei allen Wet-Blue Prüflingen ein Bewuchs der Fleischseiten durch Schimmelpilze. Die Ausnahme war *S. brevicaulis*. Bei diesem Schimmelpilz wurde nach ersten Beobachtungen kein Bewuchs des Prüflings mit Myzel und die Ausbildung von Sporen festgestellt. Das stärkste Wachstum auf den Prüflingen zeigte *F. verticillioides*, *P. variotii*, *P. funiculosum*, *R. oryzae* und *T. viride* im Kultivierungszeitraum von ca. 30 bis 90 Tagen. *C. cladosporioides*, *M. racemosus* und *A. pullulans* haben im Gegensatz dazu den Prüfling kaum bewachsen. Bemerkenswert war das Wachstum von *A. tenuissima* (KDA), *A. niger* DSM 2143 und *E. amstelodami*, da der Prüfkörper nach 60 Tagen fast vollständig bzw. vollständig bedeckt wurde.

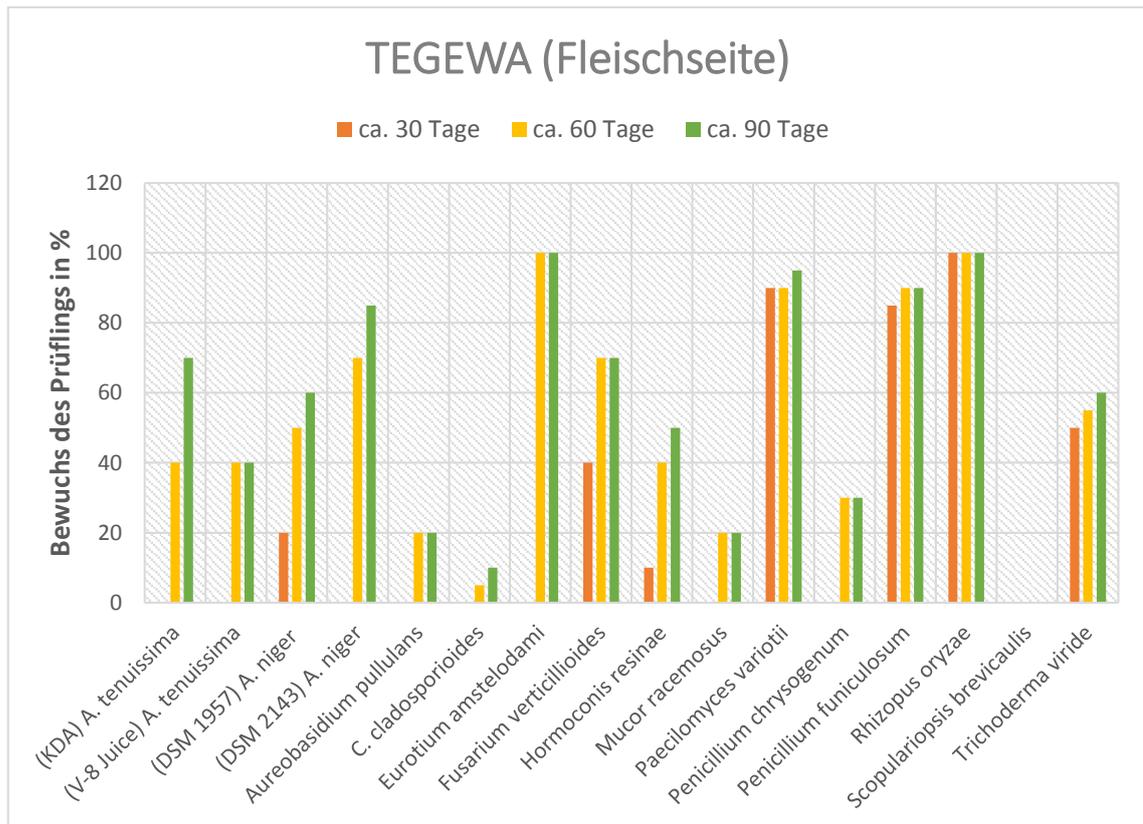


Abb. 31: Bewuchs der Fleischseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen im TEGEWA-Test

5.3 Kultivierung in Anlehnung an die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer

Im Diagramm (Abb. 32 und Abb. 33) ist der stärkste Bewuchs der Narben- bzw. Fleischseiten aus den Dreifachansätzen nach der Kultivierung der Schimmelpilze in Anlehnung an die Feuchte Kammer dargestellt. Die genauen Kultivierungszeiträume und Beschreibungen des Bewuchses sind im Anhang in der Tabelle 10,11,12 aufgeführt.

Lediglich *H. resinae*, *P. variotii* und *T. viride* zeigten ein Wachstum auf der Narbenseite nach 60-90 Tagen. Wobei *P. variotii* den stärksten Bewuchs verzeichnete.

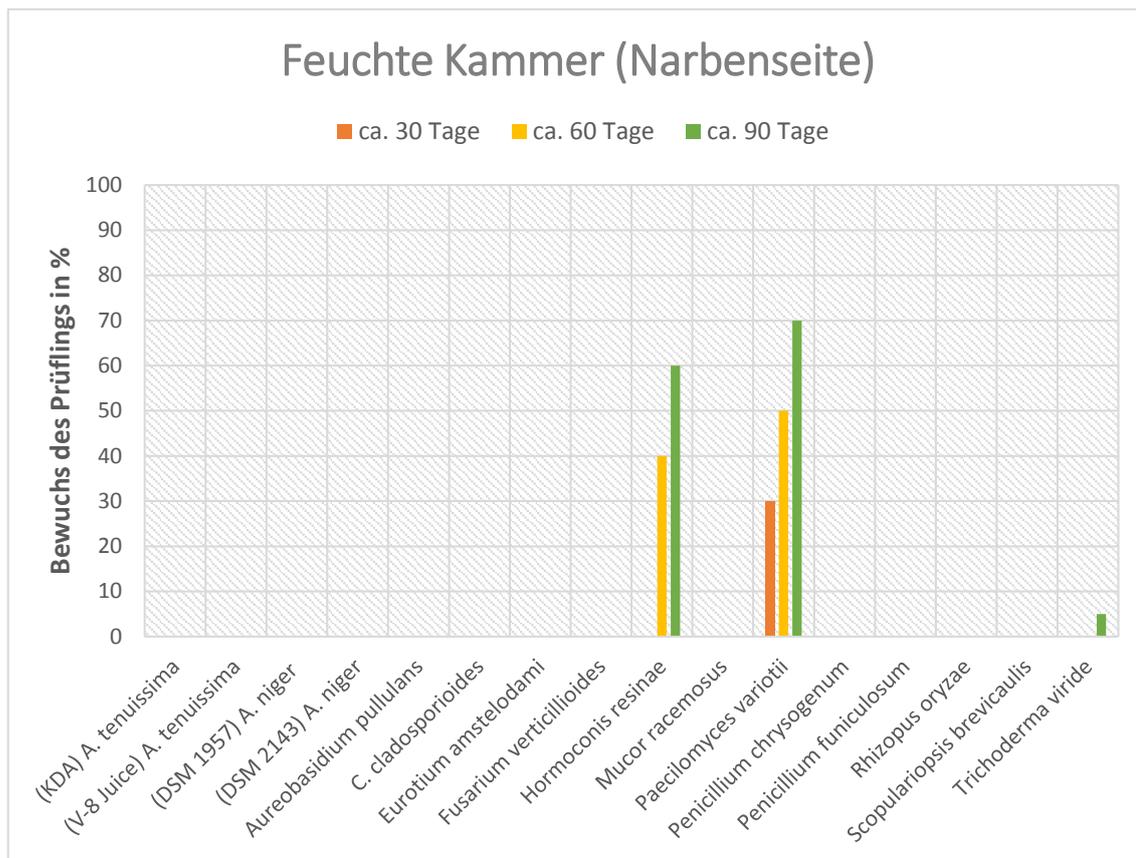


Abb. 32: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Feuchten Kammer

Die Fleischseite der Wet-Blue Prüflinge wurde während der Kultivierung in Anlehnung an die Feuchte Kammer von den Schimmelpilzen *A. niger* DSM 1957, *H. resiniae*, *P. variotii* und *T. viride* innerhalb von ca. 30 bis 90 Tagen bewachsen.

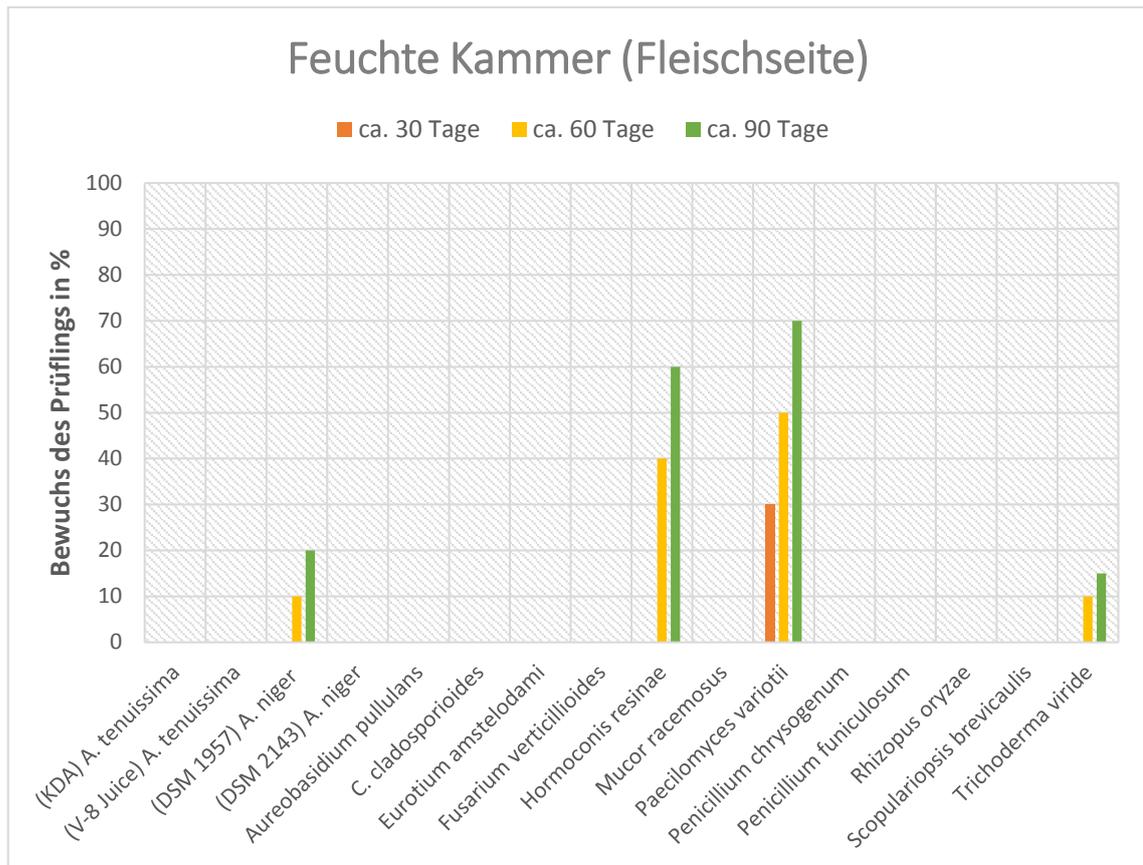


Abb. 33: Bewuchs der Fleischseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Feuchten Kammer

5.4 Kultivierung in Anlehnung an den Tropical Chamber-Test

Im Diagramm (Abb. 34 und Abb. 35) ist der Bewuchs der Narben- bzw. Fleischseite nach der Kultivierung in Anlehnung an die Tropical Chamber dargestellt. Die genauen Kultivierungszeiträume und Beschreibungen der Prüflinge sind im Anhang in der Tabelle 13 zu finden.

Dabei verzeichneten drei der Prüflinge ein ausgeprägtes Wachstum (auf der Narbenseite) der Schimmelpilze von 70% nach einer Kultivierung von mindestens 60 Tagen. Zwei der fünf Prüflinge waren vertrocknet und zeigten nur einen mäßigen Bewuchs.

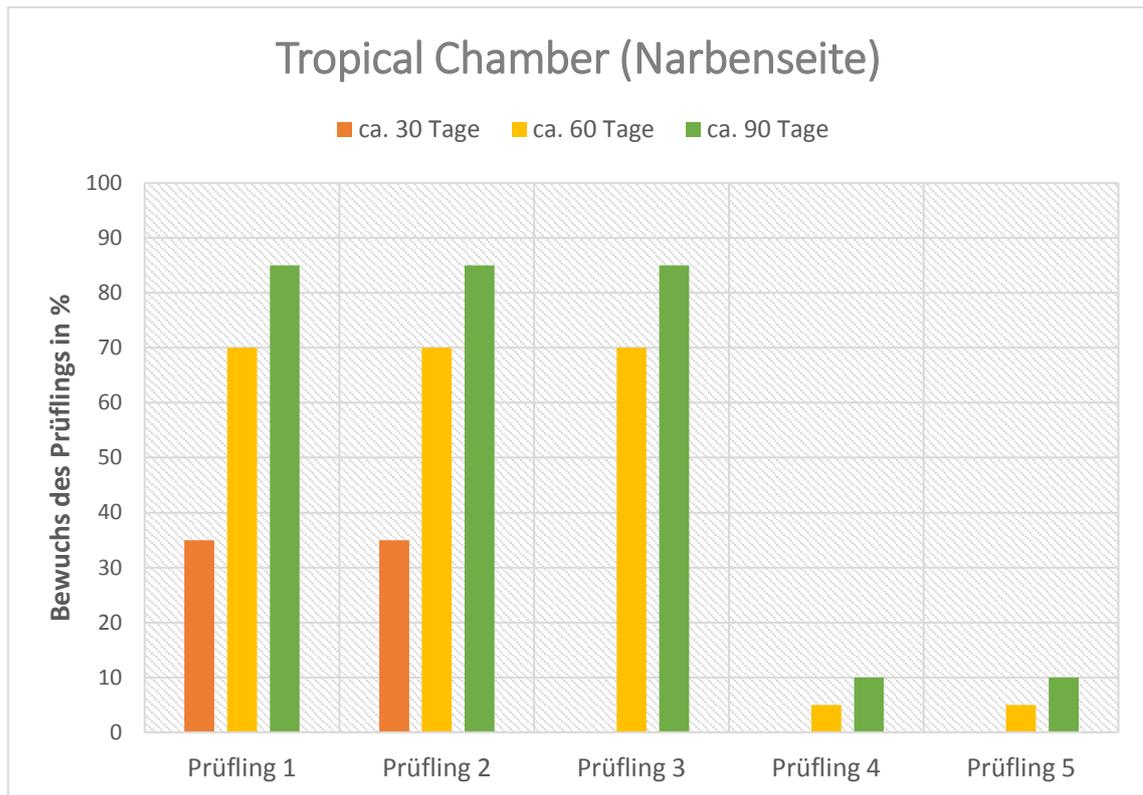


Abb. 34: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Tropical Chamber

Die Fleischseiten wurden weniger von Schimmelpilzen bewachsen als die Narbenseiten. Insgesamt wurden die Fleischseiten der Prüflinge nur zu maximal 40% von Schimmelpilzen bewachsen. Zwei der fünf Prüflinge waren vertrocknet und zeigten nur einen minimalen Bewuchs.

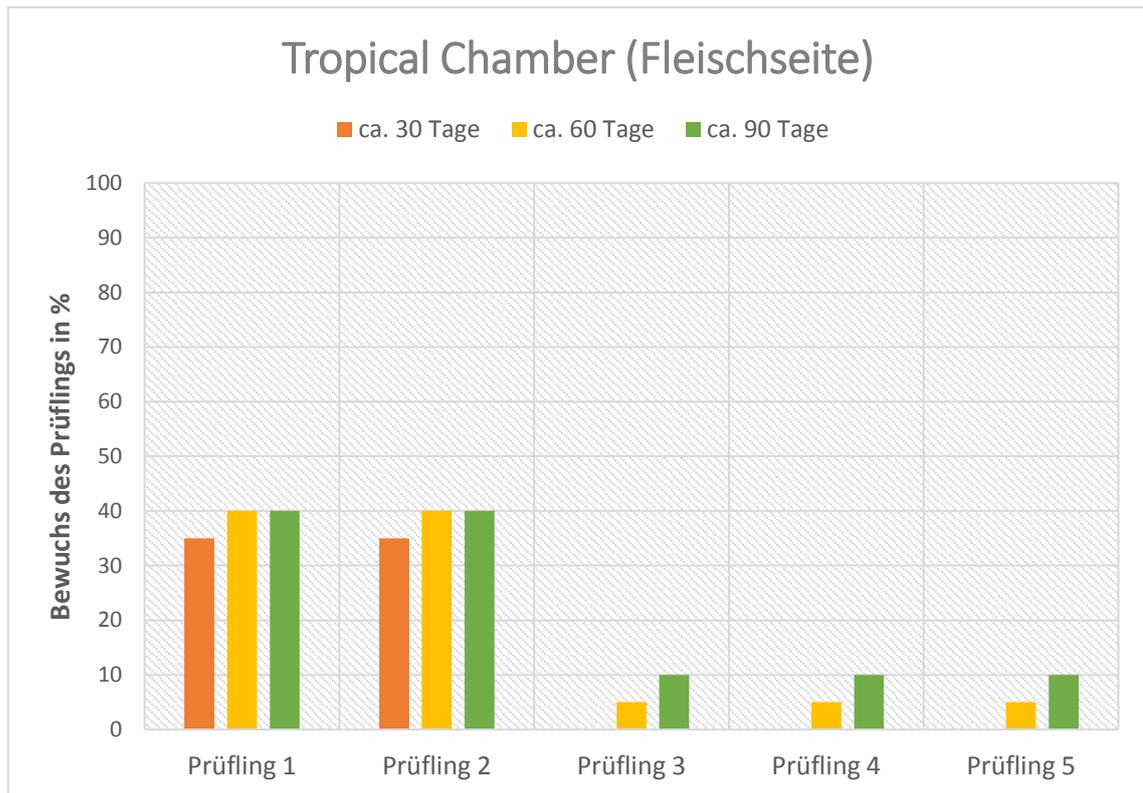


Abb. 35: Bewuchs der Narbenseite der Wet-Blue Prüflinge durch verschiedene Schimmelpilze nach einer Kultivierung von ca. 30 bis ca. 90 Tagen in der Tropical Chamber

5.5 Mikroskopische Untersuchungen der Materialoberfläche

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Narben- und Fleischseiten aus den verschiedenen Kultivierungsmethoden und zusätzlich die unterwachsenen Narbenseiten (Abb. 36) aus der Kultivierung nach dem TEGEWA-Test herangezogen. Die unterwachsene Narbenseite ist dabei die, die direkt auf dem Agarmedium lag, welches mir Sporen beimpft wurde. Die Auswahl der Prüflinge richtete sich danach, ob die Prüflinge, visuell betrachtet, vollständig, teilweise oder nicht vom Schimmelpilz innerhalb eines Kultivierungszeitraumes von 76 bis 104 Tagen bewachsen wurden. Bei den Schimmelpilzen *P. funiculosum*, *R. oryzae* und *T. viride* wurden nach einer 60-tägigen Kultivierung der Prüflinge die ersten mikroskopischen Untersuchungen der Narbenseite durchgeführt. Dadurch sollte gezeigt werden, ob Proben die innerhalb von 60 Tagen durch Schimmelpilze bewachsen wurden, auch eine Materialzerstörung aufweisen.

Die verwendeten unterwachsenen Narbenseiten sind im Anhang Abb. 76-79 zu finden und die mikroskopischen Aufnahmen dazu im Anhang Abb. 81-96. Die mikroskopischen

Aufnahmen der Fleischseiten aus der Kultivierung nach dem TEGEWA-Test (Abb. 97-104), der Feuchten Kammer (Abb. 105-112) und dem Tropical Chamber- Test (Abb. 113) befinden sich im Anhang.

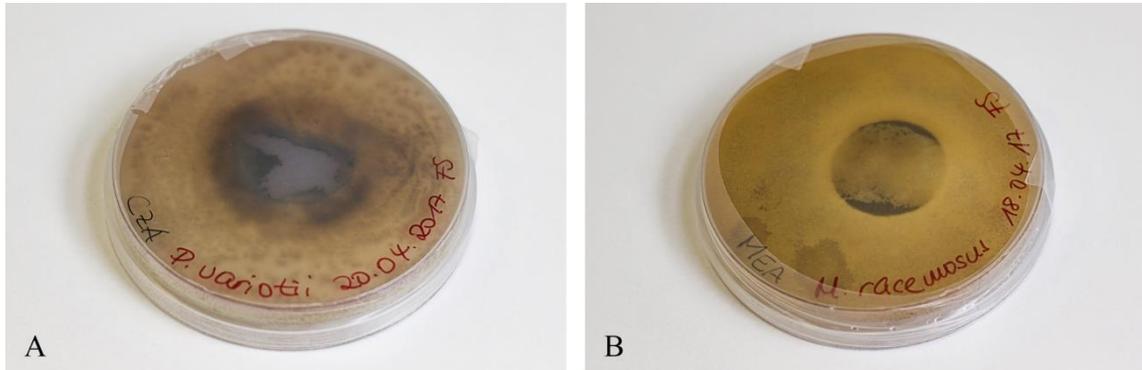


Abb. 36: Unterwachsene Narbenseite von *P. variotii* (A) und *M. racemosus* (B)

5.5.1 Mikroskopische Untersuchungen TEGEWA-Test

In den Abbildungen 37-55 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit Schimmelpilzen bewachsenen Narbenseiten aus der Kultivierung nach dem TEGEWA-Test dargestellt. Bei keinem Prüfling war eine Schädigung der Kollagenmatrix in Form von Löchern, aufgerauter Materialoberfläche oder Ausfransungen der Haarkanäle erkennbar (wie in den Abbildungen 3 (A), (B), 74 (A), (B) und 75 (B)). Einige Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt. Dennoch konnte nach dem Abschaben der Schimmelpilze und der Reinigung mit Ethanol festgestellt werden, dass sich die Prüflinge durch den Bewuchs mit Schimmelpilzen leicht bis stark verfärbt haben. Beispiele dafür sind in Abbildung 9 dargestellt.

5.5.1.1 *Alternaria tenuissima* KDA

Die mit *A. tenuissima* (KDA) bewachsene Oberfläche wies sowohl auf Narbenseite (Abb. 37), vor allem im Bereich der Haarkanäle, auf Fleischseite (Abb. 97 (A)) und auf unterwachsener Narbenseite (Abb. 81) einen unter dem Mikroskop ersichtlichen Bewuchs mit Myzel auf. Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

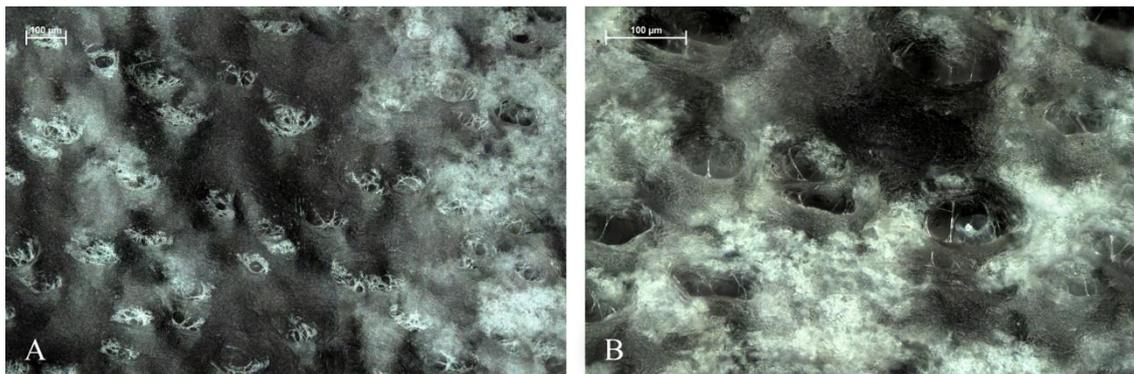


Abb. 37: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) für 76 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.2 *Alternaria tenuissima* V-8 Juice

Die mit *A. tenuissima* (V-8 Juice) bewachsene Oberfläche wies auf Narben- (Abb. 38) und Fleischseite (Abb. 97(B)) einen unter dem Mikroskop ersichtlichen schwachen Bewuchs mit Myzel auf. Auf der unterwachsenen Narbenseiten (Abb. 82) konnte ein starkes Myzelwachstum erfasst werden. Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

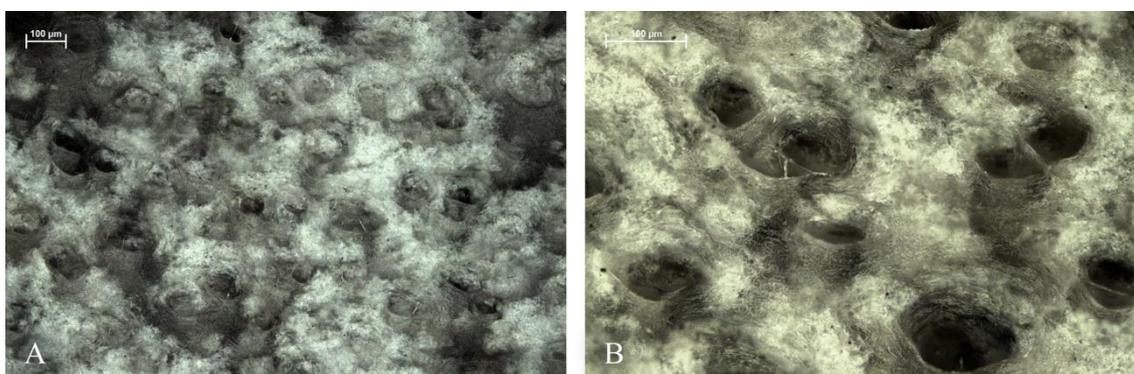


Abb. 38: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) für 76 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.3 *Aspergillus niger* DSM 1957

Die lichtmikroskopische Aufnahme der mit *A. niger* DSM 1957 bewachsenen Oberfläche zeigt vor allem auf der unterwachsenen Narbenseite (Abb. 83) einen unter dem Mikroskop erkennbaren schwachen Bewuchs mit Myzel. Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.



Abb. 39: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 für 83 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.4 *Aspergillus niger* DSM 2143

Die mit *A. niger* DSM 2143 bewachsene Oberfläche wies auf Narben- (Abb. 40), Fleischseite (Abb. 98(B)) und unterwachsener Narbenseite (Abb. 84) einen unter dem Mikroskop ersichtlichen schwachen Bewuchs mit Myzel auf. Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

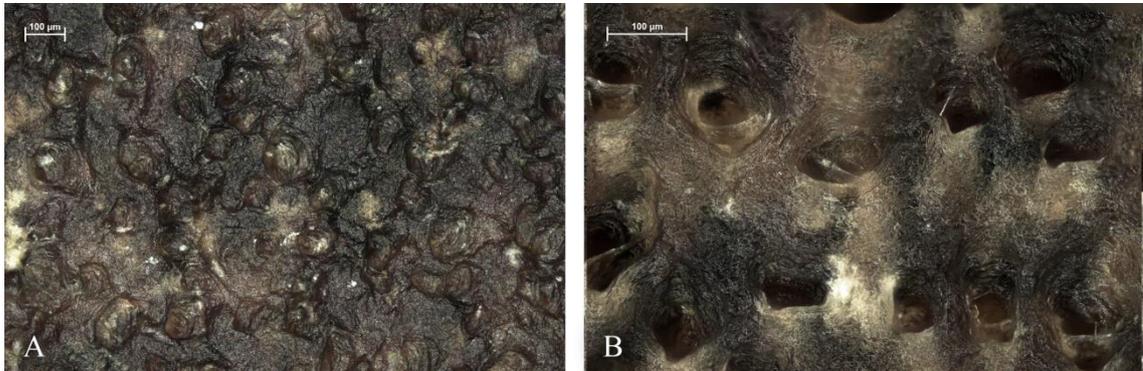


Abb. 40: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 2143 für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.5 *Aureobasidium pullulans*

Der mit *A. pullulans* bewachsene Prüfling hatte eine beige Verfärbung. Die Narben- (Abb. 41) und Fleischseite (Abb. 99 (A)) zeigte einen schwachen Bewuchs der Oberfläche mit Myzel. Auf der unterwachsenen Narbenseite (Abb. 85) konnte ein geringfügig stärkeres Myzelwachstum festgestellt werden.

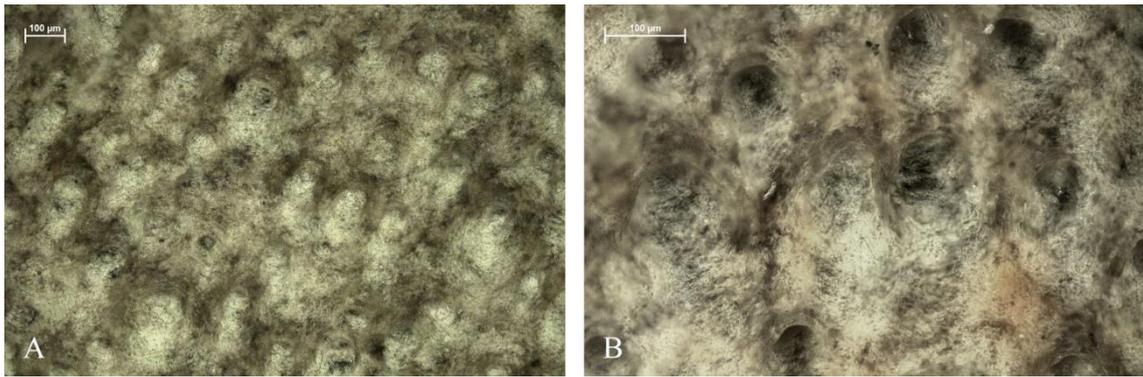


Abb. 41: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* für 88 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.6 *Cladosporium cladosporioides* (*montecillanum*)

Die mit *C. cladosporioides* bewachsene Oberfläche zeigte sowohl auf Narben- (Abb. 42), Fleischseite (Abb. 99 (B)) als auch auf unterwachsener Narbenseite (Abb. 86) eine Verfärbung des Prüfkörpers auf. Ein leichtes Myzelwachstum war unter dem Mikroskop auf der Narbenseite und unterwachsenen Narbenseite zu erkennen. Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

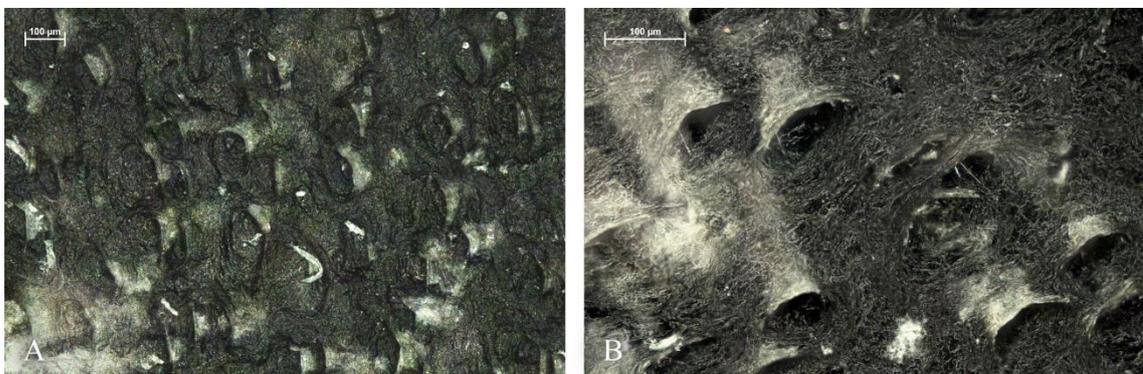


Abb. 42: Mikroskopische Aufnahme der mit *Cladosporium cladosporioides* für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.7 *Eurotium amstelodami* (= *Aspergillus hollandicus*)

Die Narben- (Abb. 43), Fleisch- (Abb. 100 (A)) und unterwachsene Narbenseite (Abb. 87) wies nach dem Bewuchs mit *E. amstelodami* eine starke schwarze Verfärbung auf. Der Prüfkörper wirkte schleimig und ein Myzelwachstum war vor allem auf der Fleischseite und unterwachsenen Narbenseite mikroskopisch erkennbar.

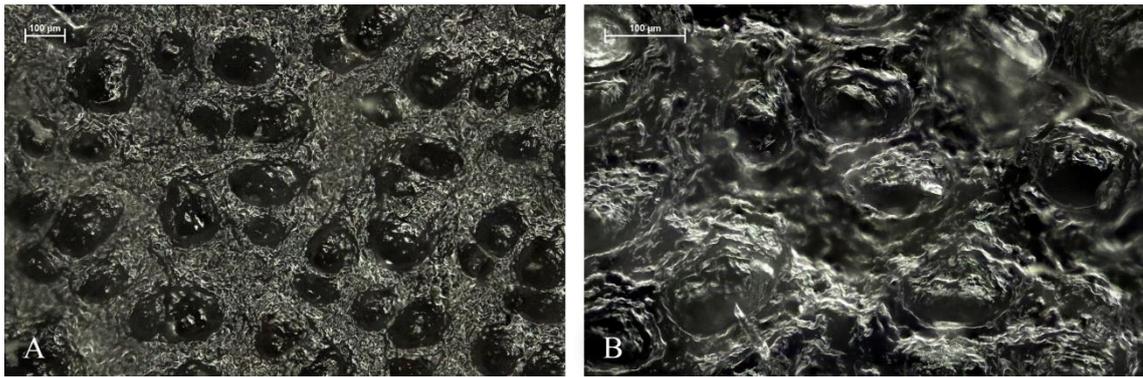


Abb. 43: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* für 88 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.8 *Fusarium verticillioides*

Die Narben- (Abb. 44) und Fleischseite (Abb. 100(B)) zeigte unter dem Mikroskop einen Bewuchs mit Myzel. Die Prüflinge waren leicht violett verfärbt. Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

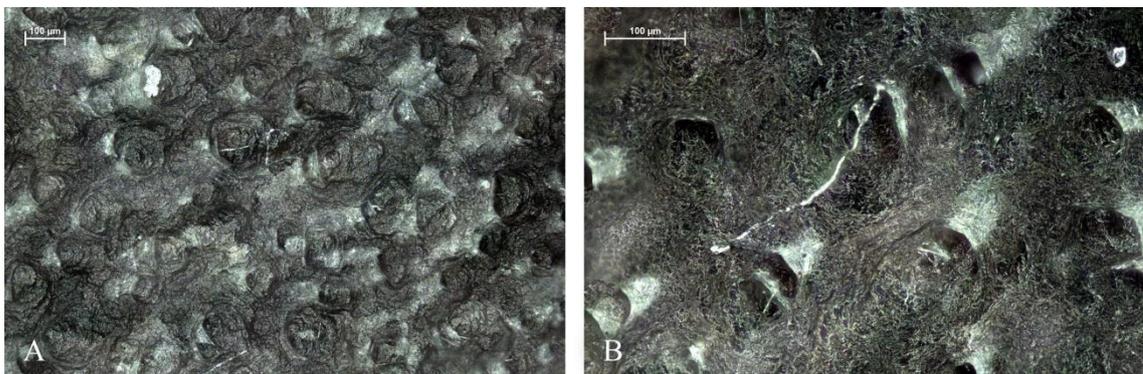


Abb. 44: Mikroskopische Aufnahme der mit *Fusarium verticillioides* für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.9 *Hormoconis resinae*

Die mit *H. resinae* bewachsene Oberfläche wies auf Narbenseite (Abb. 45) und unterwachsener Narbenseite (Abb. 89) einen unter dem Mikroskop deutlich erkennbaren Bewuchs mit Myzel auf. Die Prüflinge haben sich bräunlich verfärbt.

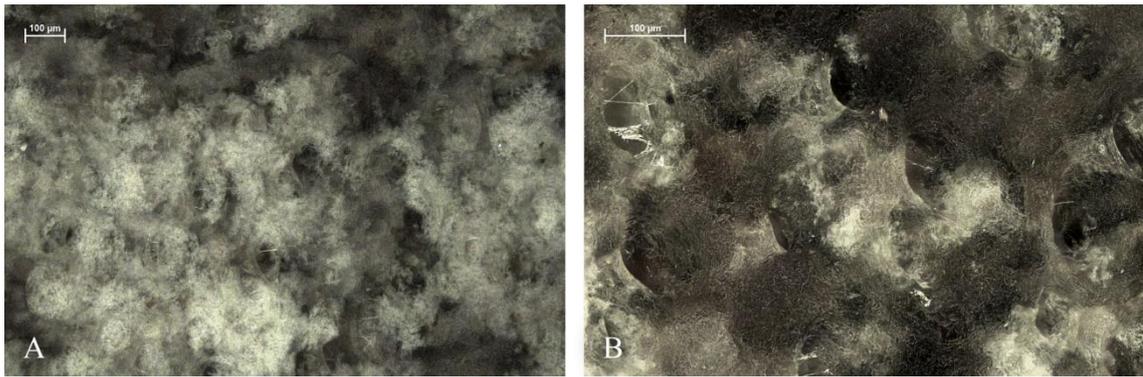


Abb. 45: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resinae* für 90 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.10 *Mucor racemosus*

Die mit *M. racemosus* bewachsene Oberfläche zeigte auf der Narbenseite (Abb. 46) ein leichtes Myzelwachstum. Die Prüflinge haben sich auf Narben-, Fleisch- (Abb. 101 (B)) und unterwachsener Narbenseite (Abb. 90) bräunlich verfärbt.

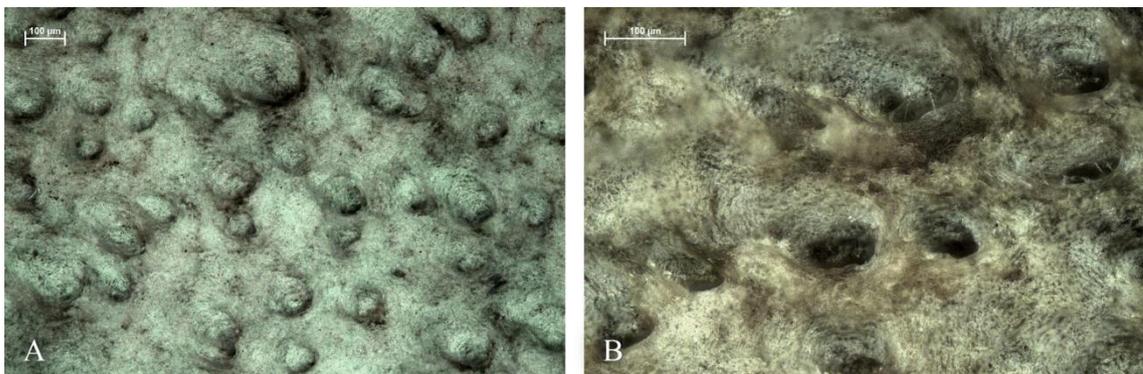


Abb. 46: Mikroskopische Aufnahme der mit *Mucor racemosus* für 83 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.11 *Paecilomyces variotii*

Die Narben- (Abb. 47), Fleisch- (Abb. 102 (A)) und unterwachsene Narbenseite (Abb. 91) hatte nach der Kultivierung einen unter dem Mikroskop deutlich erkennbaren Bewuchs mit Myzel. Die Prüflinge waren grün verfärbt und haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

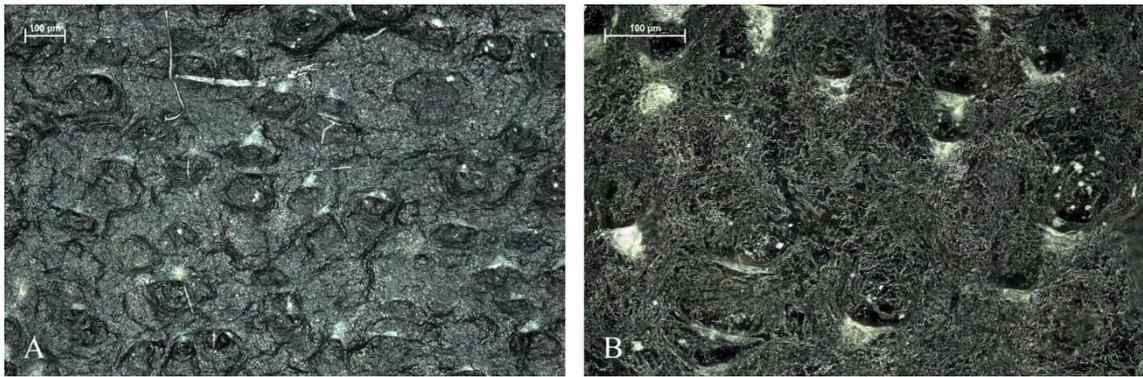


Abb. 47: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.12 *Penicillium chrysogenum*

Die lichtmikroskopische Aufnahme der Narbenseite (Abb. 48) der mit *P. chrysogenum* bewachsenen Oberfläche wies unter dem Mikroskop keinen direkten Bewuchs mit Myzel auf. Die Prüflinge waren kaum verfärbt und haben nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung eine dunkel bis schwarze Färbung angenommen.

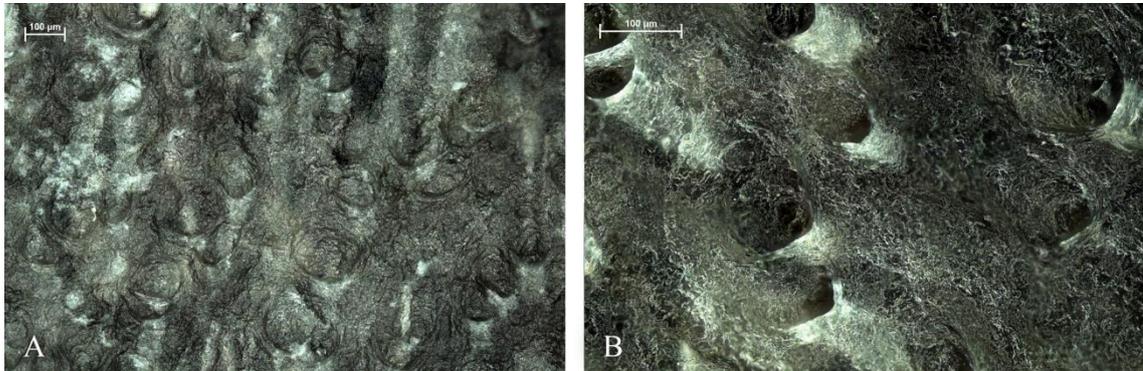


Abb. 48: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium chrysogenum* für 82 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.13 *Penicillium funiculosum*

Die mit *P. funiculosum* bewachsene Oberfläche wies nach 60-tägiger Kultivierung auf Narbenseite (Abb. 49) einen unter dem Mikroskop erkennbaren sehr schwachen Bewuchs mit Myzel auf. Der Prüfling wurde beige verfärbt.

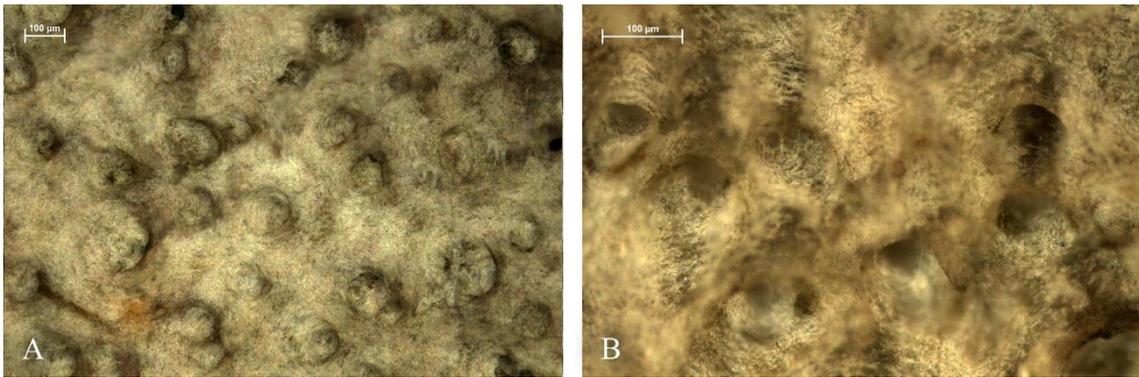


Abb. 49: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 60 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Narbenseite (Abb. 50) der mit *P. funiculosum* bewachsenen Oberfläche präsentiert eine bräunliche Verfärbung des Prüfkörpers nach einer Inkubation von 80 Tagen. Myzelwachstum konnte größtenteils auf der Narbenseite festgestellt werden.

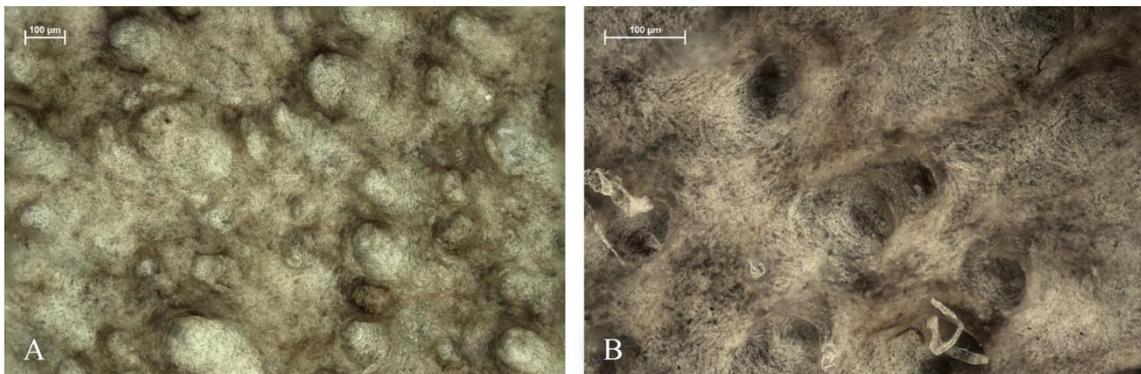


Abb. 50: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 80 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.14 *Rhizopus oryzae*

Die mit *R. oryzae* bewachsene Oberfläche hatte nach einer Inkubation von 60 Tagen auf der Narbenseite (Abb. 51) einen unter dem Mikroskop deutlich erkennbaren Bewuchs mit Myzel. Die Prüflinge haben sich beige/bräunlich verfärbt

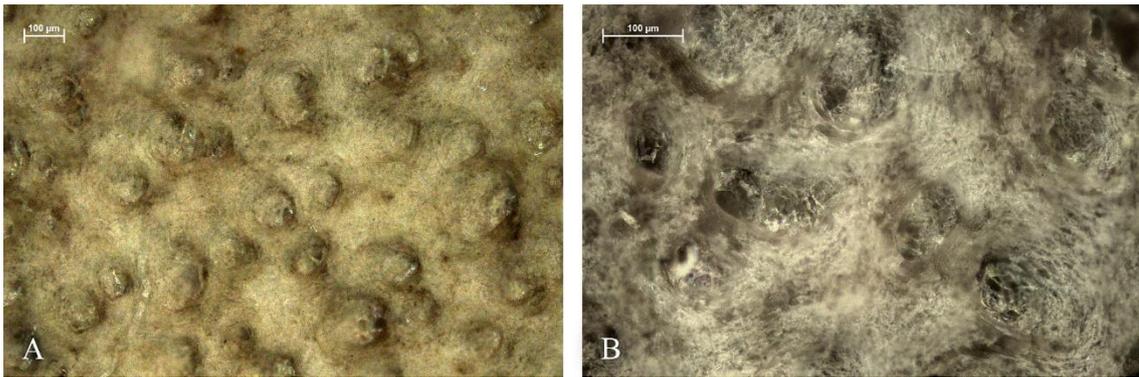


Abb. 51: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 60 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

Die für 90 Tage mit *R. oryzae* bewachsene Oberfläche wies auf Narben- (Abb. 52), Fleisch- (Abb. 103 (B)) und unterwachsener Narbenseite (Abb. 94) einen unter dem Mikroskop erkennbaren Bewuchses mit Myzel auf. Die Prüfkörper waren beige verfärbt.

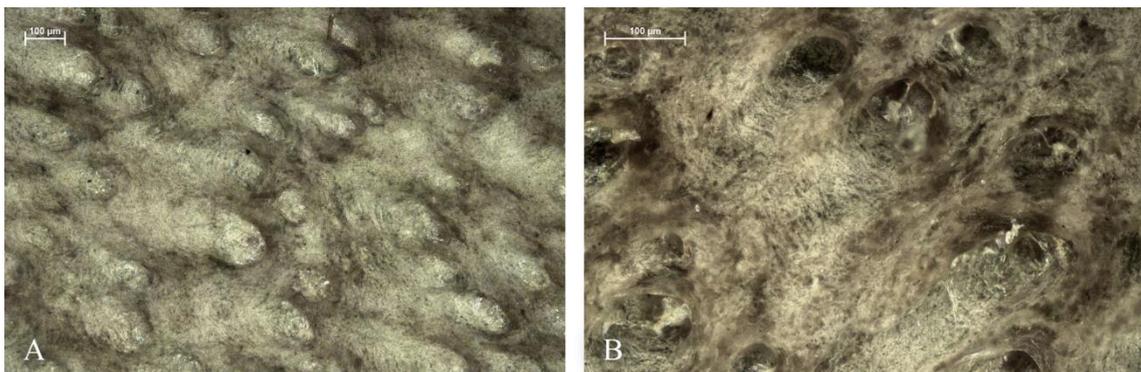


Abb. 52: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 90 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.15 *Scopulariopsis brevicaulis*

Die mit *S. brevicaulis* bewachsene Oberfläche präsentiert unter dem Mikroskop ein Myzelwachstum auf der Narben- (größtenteils im Bereich der Haarkanäle (Abb. 53)) und Fleischseite (Abb. 104 (A)). Die Prüflinge haben sich nach der Reinigung mit Ethanol und eintägiger Trocknung dunkel bis schwarz verfärbt.

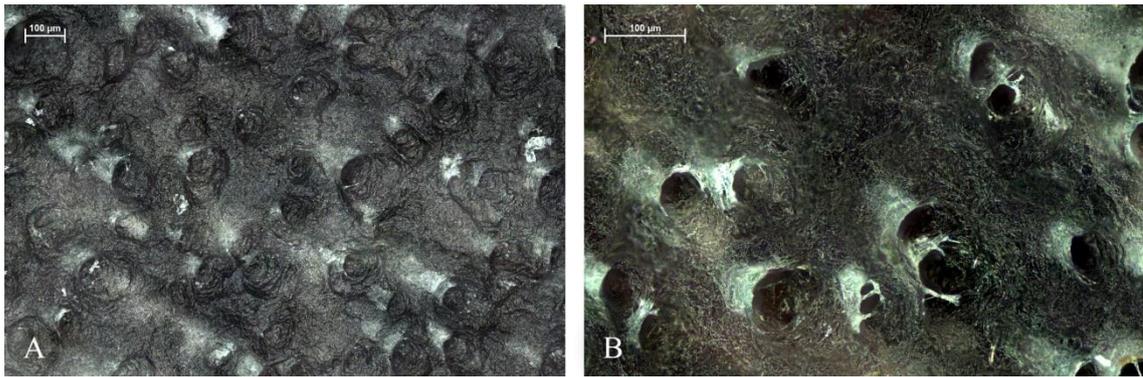


Abb. 53: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* für 82 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.1.16 *Trichoderma viride*

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Narbenseite (Abb. 54) der mit *T. viride* bewachsenen Oberfläche zeigt eine grün-braune Verfärbung des Prüfkörpers nach einer Inkubation von 60 Tagen. Myzelwachstum konnte vor allem im Bereich der Haarkanäle festgestellt werden. Die grünen Sporen waren deutlich zu erkennen.

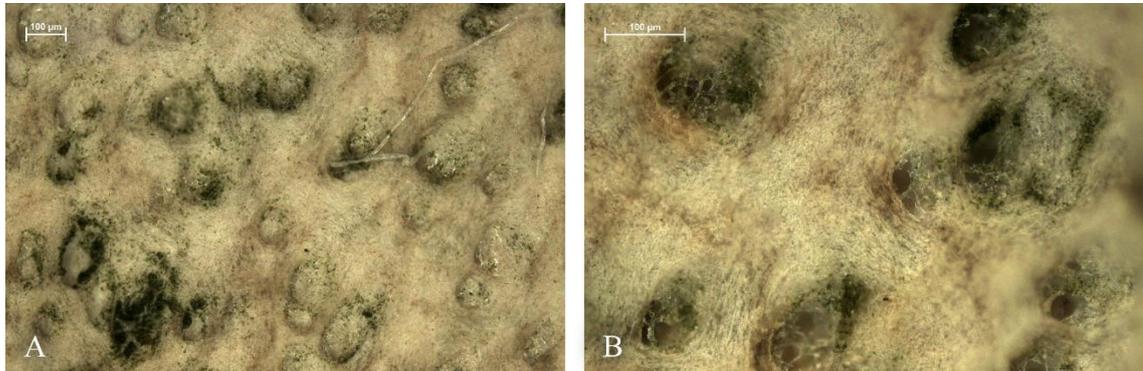


Abb. 54: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 60 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

Die mit *T. viride* bewachsene Oberfläche wies unter dem Mikroskop nach 89-tägiger Inkubation auf Narben- (Abb. 55) und Fleischseite (Abb. 104 (B)) einen Bewuchs des Prüfkörpers (vor allem im Bereich der Haarkanäle) mit Myzel auf. Die Prüflinge wurden grün bis beige verfärbt.

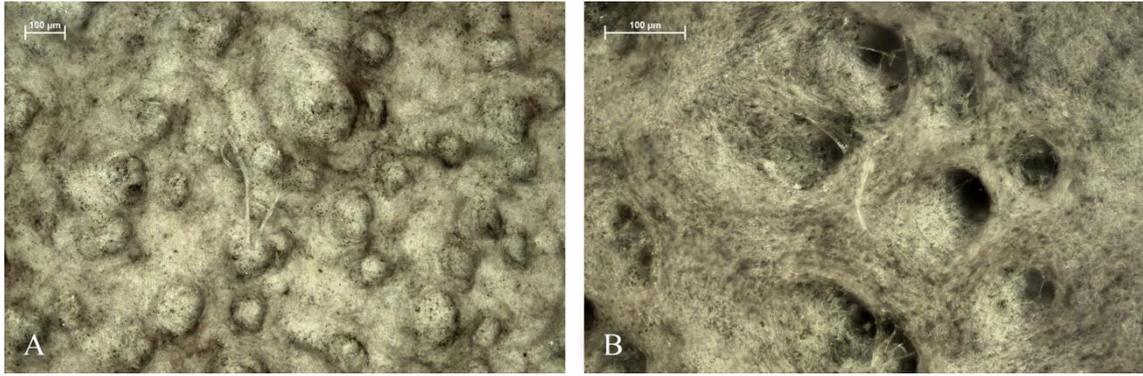


Abb. 55: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2 Mikroskopische Untersuchungen Feuchte Kammer

In den Abbildungen 56-71 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit Schimmelpilzen bewachsenen Narbenseiten aus der Kultivierung in der Feuchten Kammer dargestellt. Bei keinem Prüfling konnte eine Schädigung der Kollagenmatrix in Form von Löchern, Abschabungen der Materialoberfläche oder Ausfransungen der Haarkanäle erkannt werden.

Insgesamt wurden die Wet-Blue Prüflinge kaum bis gar nicht verfärbt.

5.5.2.1 *Alternaria tenuissima* KDA

Die mit *A. tenuissima* (KDA) kultivierten Proben wiesen unter dem Mikroskop auf der Narbenseite (Abb. 56) keinen Bewuchs mit Myzel auf. Auf der Fleischseite (Abb. 105 (A)) konnte ein leichtes Myzelwachstum festgestellt werden.

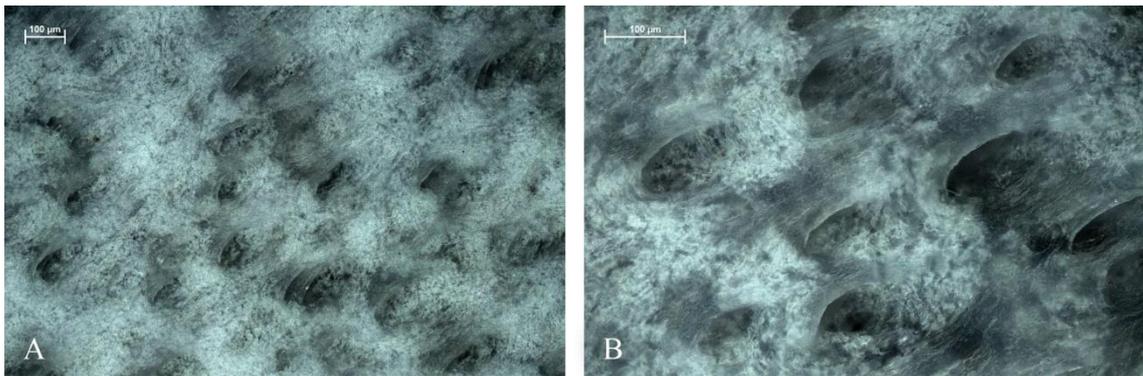


Abb. 56: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) für 83 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.2 *Alternaria tenuissima* V-8 Juice

Die mit *A. tenuissima* (V-8 Juice) kultivierte Proben zeigten auf Narben- (Abb. 57) und Fleischseite (Abb. 105 (B)) keinen unter dem Mikroskop erkennbaren Bewuchs mit Myzel.

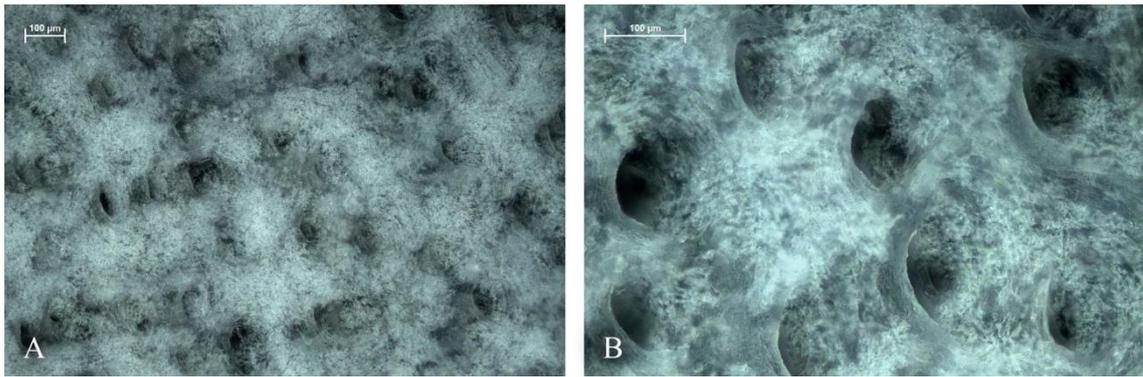


Abb. 57: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) für 83 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.3 *Aspergillus niger* DSM 1957

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit *A. niger* DSM 1957 bewachsenen Oberfläche verdeutlichen kein Myzelwachstum auf der Narbenseite (Abb. 58). Auf der Fleischseite (Abb. 106 (A)) konnten leichte Verfärbungen des Prüflings und Myzelwachstum festgestellt werden.

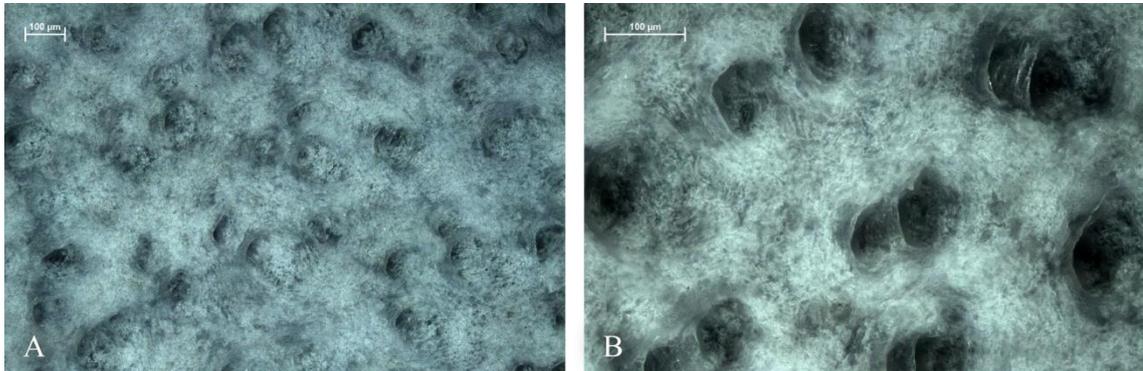


Abb. 58: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 für 90 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.4 *Aspergillus niger* DSM 2143

Die mit *A. niger* DSM 2143 bewachsene Oberfläche hatte unter dem Mikroskop auf der Narbenseite (Abb. 59) kein Myzelwachstum. Auf der Fleischseite (Abb. 106 (B)) konnte ein Bewuchs des Prüfkörpers mit Myzel nachgewiesen werden. Die Prüflinge waren leicht verfärbt.

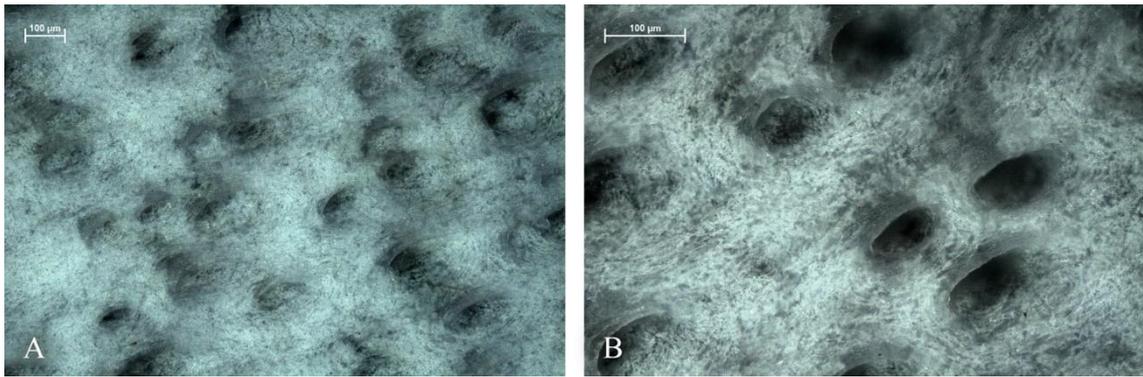


Abb. 59: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 2143 für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.5 *Aureobasidium pullulans*

Die mit *A. pullulans* bewachsene Oberfläche besaß kein Myzelwachstum auf der Narbenseite (Abb. 60). Auf der Fleischseite (Abb. 107 (A)) konnte ein sehr schwaches Myzelwachstum festgestellt werden.

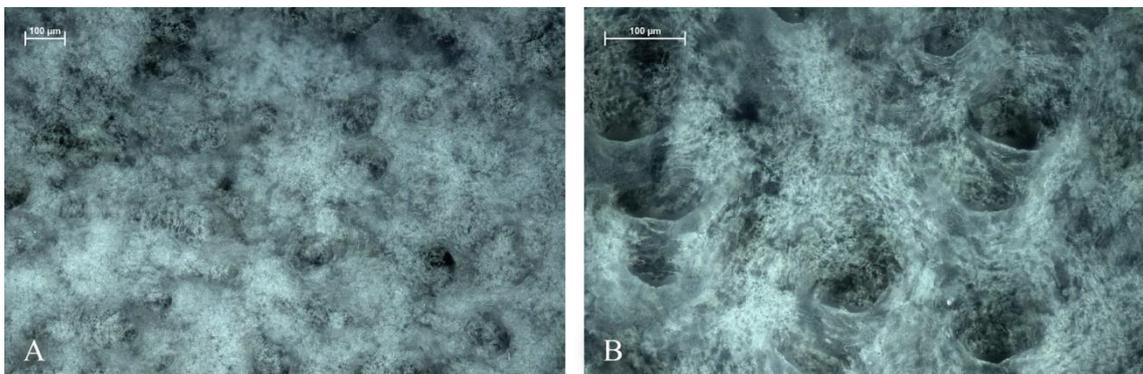


Abb. 60: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* für 102 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.6 *Cladosporium cladosporioides (montecillanum)*

Die mikroskopischen Oberflächenaufnahmen der Narben- (Abb. 61) und Fleischseite (Abb. 107(B)) zeigten keinen Bewuchs des Prüfkörpers durch den Schimmelpilz.

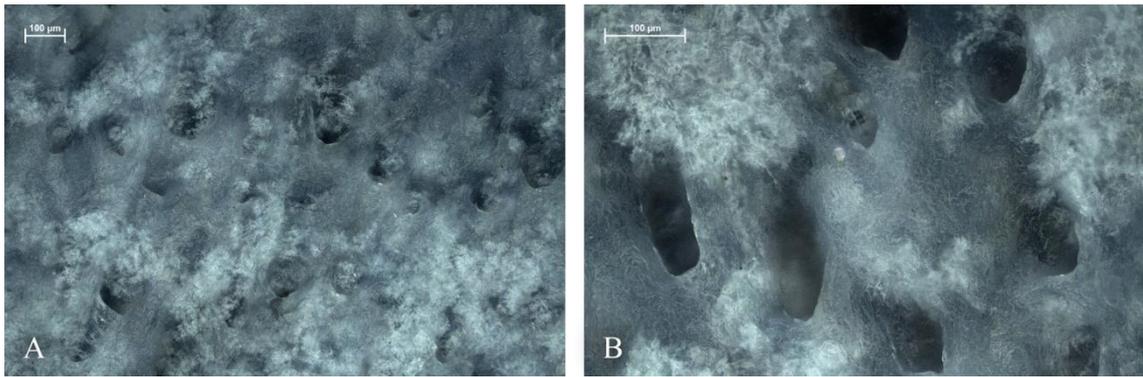


Abb. 61: Mikroskopische Aufnahme der mit *Cladosporium cladosporioides* für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.7 *Eurotium amstelodami* (= *Aspergillus hollandicus*)

Die mit *E. amstelodami* kultivierten Proben hatten kein Myzelwachstum auf der Narbenseite (Abb. 62). Auf der Fleischseite (Abb. 108 (A)) konnte ein sehr schwaches Myzelwachstum festgestellt werden.

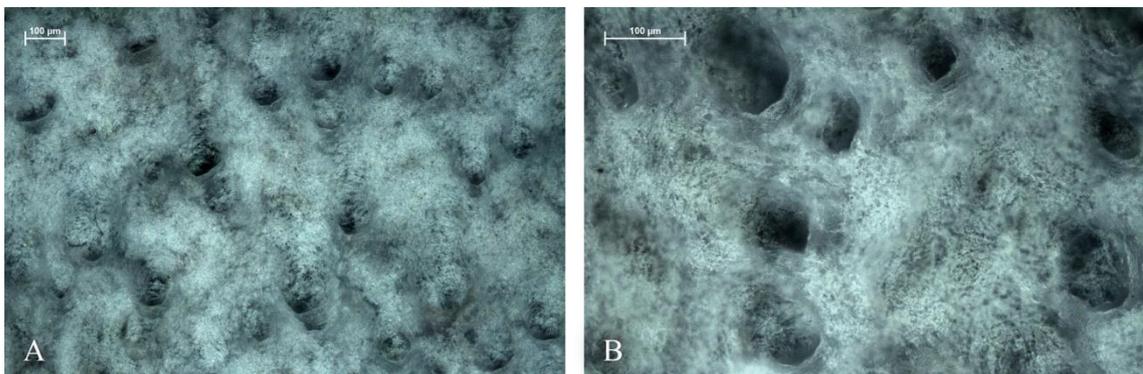


Abb. 62: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* für 102 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.8 *Fusarium verticillioides*

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit *F. verticillioides* kultivierten Proben zeigten kein Myzelwachstum auf der Narbenseite (Abb. 63). Auf der Fleischseite (Abb. 108(B)) konnte eine leichte Verfärbungen des Prüflings und Myzelwachstum beobachtet werden.

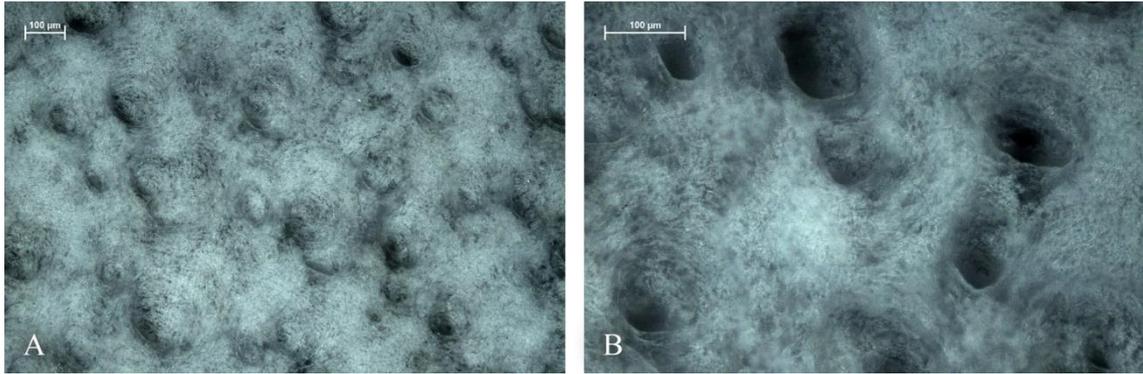


Abb. 63: Mikroskopische Aufnahme der mit *Fusarium verticillioides* für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.9 *Hormoconis resiniae*

Die mit *H. resiniae* bewachsenen Proben wiesen auf Narben- (Abb. 64) und Fleischseite (Abb. 109(A)) einen unter dem Mikroskop deutlich erkennbaren Bewuchs mit Myzel auf. Die Prüflinge haben sich braun verfärbt.



Abb. 64: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resiniae* für 104 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.10 *Mucor racemosus*

Auf der Narbenseite (Abb. 65) konnte kein Myzelwachstum beobachtet werden. Eine leichte Verfärbungen des Prüflings konnte auf der Fleischseite (Abb. 109(B)) festgestellt werden. Ein Myzelwachstum war mikroskopisch kaum erkennbar.

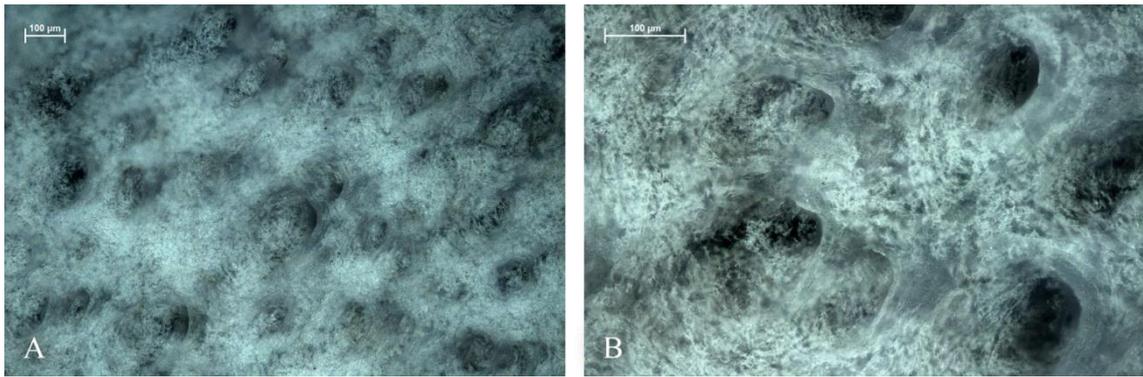


Abb. 65: Mikroskopische Aufnahme der mit *Mucor racemosus* für 90 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.11 *Paecilomyces variotii*

Die lichtmikroskopische Untersuchung der kultivierten Prüflinge ergab ein schwaches Myzelwachstum auf der Narben- (Abb. 66) und Fleischseite (Abb. 110(A)).

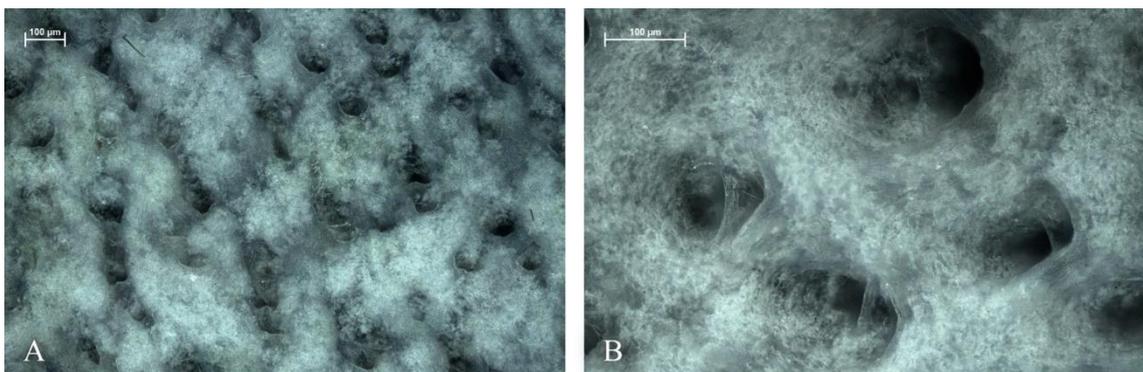


Abb. 66: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.12 *Penicillium chrysogenum*

Die mit *P. chrysogenum* kultivierten Proben zeigten unter dem Mikroskop kein Myzelwachstum auf der Narbenseite (Abb. 67). Auf der Fleischseite (Abb. 110 (B)) konnte ein sehr schwaches Myzelwachstum festgestellt werden.

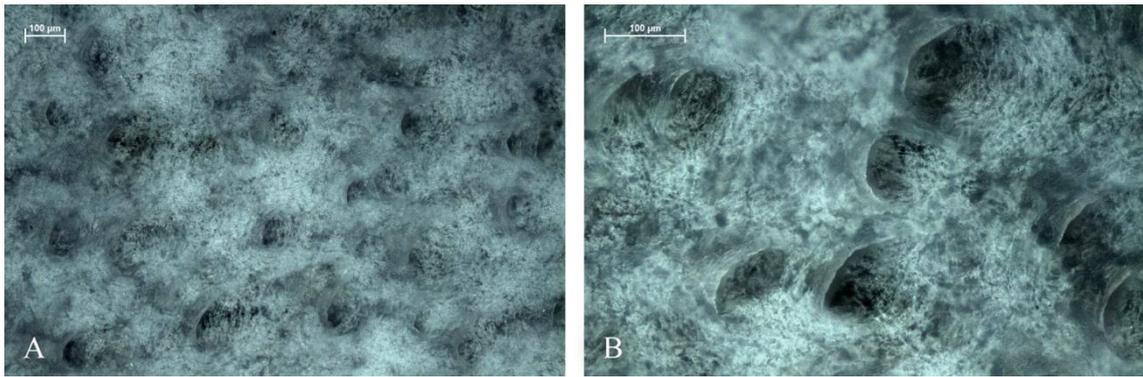


Abb. 67: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium chrysogenum* für 91 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.13 *Penicillium funiculosum*

Die mit *P. funiculosum* kultivierten Proben wiesen auf Narben- (Abb. 68) und Fleischseite (Abb. 111(A)) keinen unter dem Mikroskop erkennbaren Bewuchs mit Myzel auf.

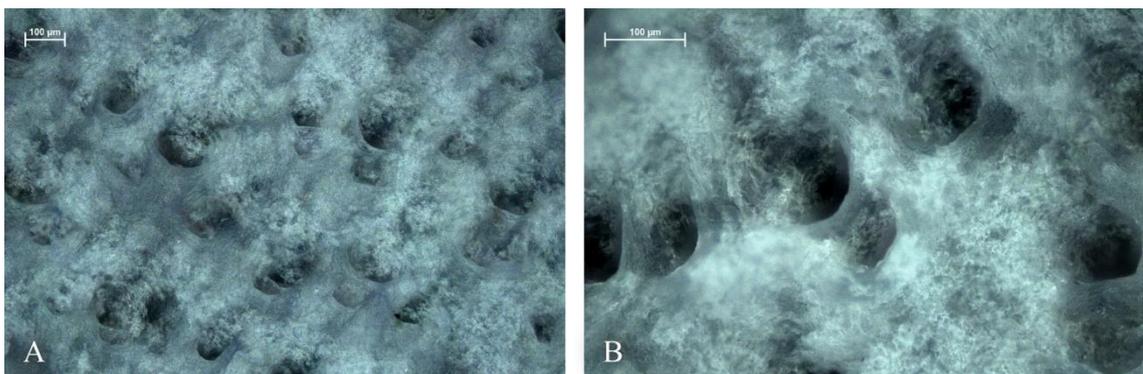


Abb. 68: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 102 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.14 *Rhizopus oryzae*

Die Narbenseite (Abb. 69) der kultivierten Proben zeigten unter dem Mikroskop kein Myzelwachstum. Auf der Fleischseite (Abb. 111(B)) konnte ein schwacher Bewuchs mit Myzel festgestellt werden.

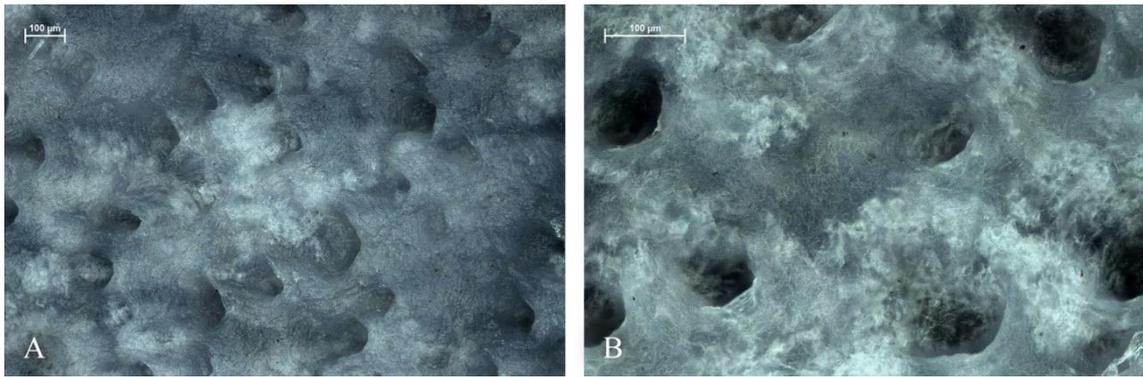


Abb. 69: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 104 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.15 *Scopulariopsis brevicaulis*

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit *S. brevicaulis* kultivierten Oberfläche wiesen kein Myzelwachstum auf der Narbenseite (Abb. 70) auf. Die Fleischseite (Abb. 112(A)) hingegen war stark bewachsen.

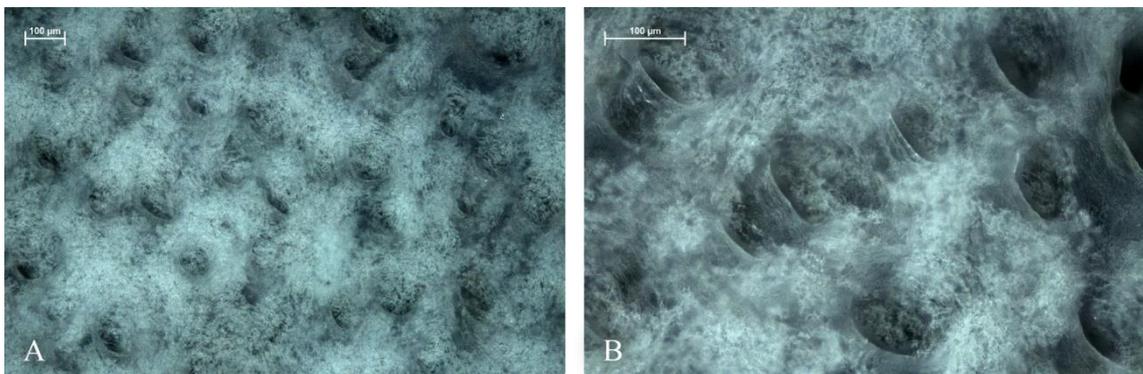


Abb. 70: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* für 91 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.2.16 *Trichoderma viride*

Die Narben- (Abb. 71) und Fleischseite (Abb. 112(B)) der kultivierten Proben zeigten ein starkes Myzelwachstum.



Abb. 71: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.5.3 Mikroskopische Untersuchungen Tropical Chamber-Test

In den Abbildungen 71 und 72 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit Schimmelpilzen bewachsenen Narbenseiten aus der Kultivierung in der Tropical Chamber dargestellt. Beispielhaft wurden zwei der fünf Prüflinge mikroskopisch untersucht. Bei keinem Prüfling war eine Schädigung der Kollagenmatrix in Form von Löchern, Abschabungen oder Ausfransungen erkennbar.

Prüfling 1

Die Oberfläche des in der Tropical Chamber kultivierten Wet-Blue Prüflings wies unter dem Mikroskop auf der Narbenseite (Abb. 72) ein sehr schwaches Myzelwachstum auf. Auf der Fleischseite (Abb. 113(A)) konnte ein Bewuchs des Prüfkörpers mit Myzel nachgewiesen werden. Der Prüfling wurde leicht hellbeige verfärbt.

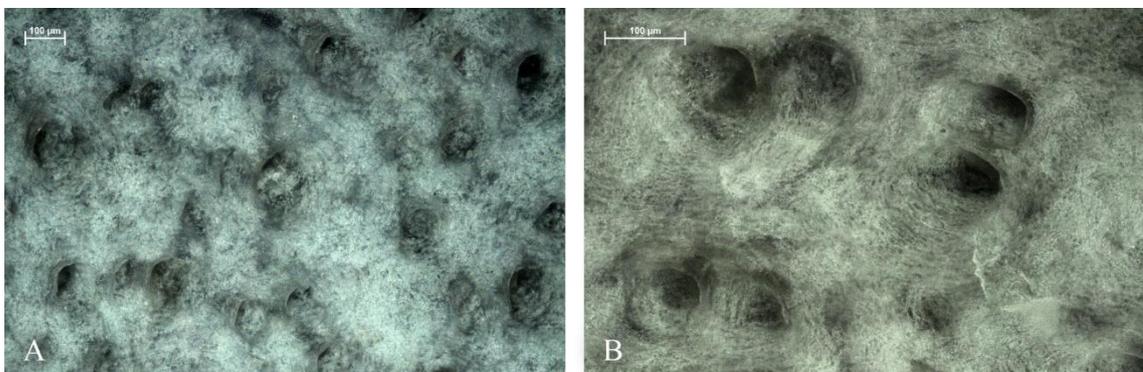


Abb. 72: Mikroskopische Aufnahme der Narbenseite des Prüflings 1 nach einer Kultivierung in der Tropical Chamber für 96 Tage bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

Prüfling 2

Die Mikroskopie des in der Tropical Chamber kultivierten Wet-Blue Prüflings ergab ein schwaches Myzelwachstum auf Narben- (Abb. 73) und Fleischseite (Abb. 113(B)). Der Prüfling wurde beige verfärbt.

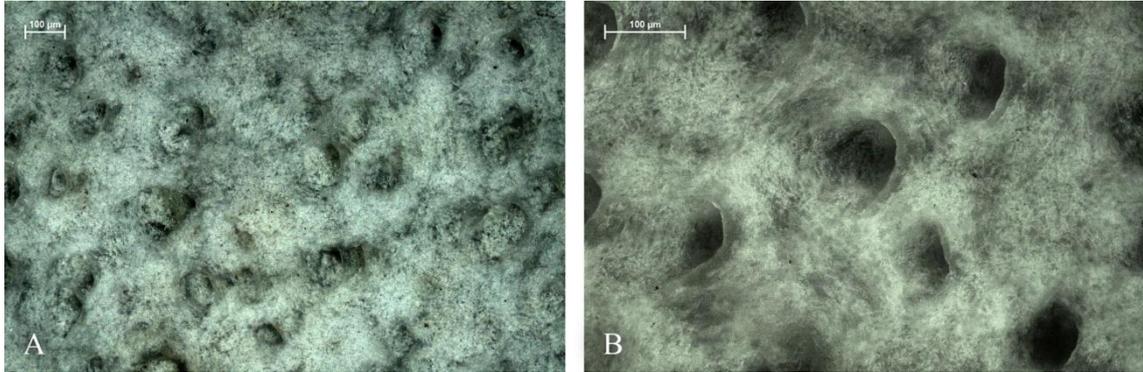


Abb. 73: Mikroskopische Aufnahme der Narbenseite des Prüflings 2 nach einer Kultivierung in der Tropical Chamber für 96 Tage bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

5.6 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen

In Tabelle 5 ist die Trockensubstanz der verwendeten Prüfkörper dargestellt.

5.6.1 Bestimmung der Trockensubstanz

Tabelle 5: Trockensubstanz ausgewählter Prüflinge nach Kultivierung

Probe	Einwaage in g	Trockensubstanz in %
Wet- Blue ¹	0,5501	37,18
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	0,5512	30,71
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	0,5738	31,23
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,6231	30,06
<i>Hormoconis resinae</i>	0,6065	33,50
<i>Paecilomyces variotii</i> (TEGEWA-Test)	0,6184	39,09
<i>Paecilomyces variotii</i> (Feuchte Kammer)	0,5181	31,05
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,5216	32,62
<i>Rhizopus oryzae</i>	0,5394	37,5
<i>Trichoderma viride</i>	0,5528	34,49

5.6.2 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen

Tabelle 6 verdeutlicht die Menge der in Dichlormethan löslichen Substanzen (vor allem Fette) anhand ausgewählter Prüflinge aus der Kultivierung nach dem TEGEWA-Test. Zum Vergleich wurde der mit *P. variotii* kultivierte Prüfling aus der Feuchten Kammer in Betracht gezogen. Bei Wet-Blue und *Paecilomyces variotii* (Feuchte Kammer) wurden exemplarisch Doppelbestimmungen durchgeführt. Diese sind mit 1) und 2) kenntlich gemacht. Die größte Fettreduzierung konnte bei *R. oryzae* mit 0,48 %/TS und *P. variotii* (TEGEWA-Test) mit 0,59 %/TS festgestellt werden.

¹ ohne Kultivierung mit Schimmelpilzen (Referenz)

Tabelle 6: Werte der in Dichlormethan löslichen Substanzen anhand ausgewählter Prüflinge

Probe	Einwaage in g	Auswaage in g	DCM-lösliche Substanzen in %/Trockensubstanz
Wet- Blue ¹	1) 2,5121 2) 2,7881	1) 0,0110 2) 0,0123	1) 1,18 2) 1,18
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	4,0230	0,0099	0,81
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	4,9240	0,0103	0,67
<i>Fusarium verticillioides</i>	4,4751	0,0120	0,90
<i>Hormoconis resinae</i>	5,4426	0,0122	0,66
<i>Paecilomyces variotii</i> (TEGEWA-Test)	4,1333	0,0095	0,59
<i>Paecilomyces variotii</i> (Feuchte Kammer)	1) 4,6664 2) 5,1129	1) 0,0154 2) 0,0098	1) 1,06 2) 0,61
<i>Penicillium funiculosum</i>	3,7061	0,0093	0,77
<i>Rhizopus oryzae</i>	4,4698	0,0080	0,48
<i>Trichoderma viride</i>	2,1433	0,0078	1,04

¹ ohne Kultivierung mit Schimmelpilzen (Referenz)

6 Diskussion

Für das Wachstum verschiedener Schimmelpilze auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue) wurden unterschiedliche Wachstumsbedingungen aus drei Bewuchstests herangezogen, um einen optimalen Bewuchs auf den Proben unter annähernd realen Bedingungen zu erreichen. Die Tests unterschieden sich dabei im Nährstoffangebot und der Umgebungsfeuchte. Die Prüflinge wurden innerhalb des Kultivierungszeitraumes von ca. 30 bis 90 Tagen unterschiedlich stark mit Schimmelpilzen bewachsen. Daraus resultieren Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden in Bezug auf das Schimmelpilzwachstum, welche in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

6.1 Einschätzung der Kultivierungsbedingungen des TEGEWA-Tests für das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue)

Die Schimmelpilze finden bei der Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test mit den in den Petrischalen vorgelegten Agar-Medien ein perfektes Nährmedium vor, demzufolge sind diese Kultivierungsparameter für die Schimmelpilze am attraktivsten. Dies verdeutlichen auch die Ergebnisse. Innerhalb des Kultivierungszeitraums von ca. 30 bis 90 Tagen bietet der Test die besten Kultivierungsbedingungen, um das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat zu fördern. Demzufolge ist das Agar-Medium ein Vorteil gegenüber anderen Kultivierungsmethoden. Durch die Verlängerung der Kultivierungszeit wuchsen alle Schimmelpilze auf der Narbenseite der Prüflinge. Die Fleischseite wurde ebenfalls von allen Schimmelpilzen bedeckt. Eine Ausnahme bildete *S. brevicaulis*. Er zeigte bei erster visueller Kontrolle keinen Bewuchs, der durch nachfolgende, genauere mikroskopische Untersuchungen widerlegt werden konnte. Das Halbfabrikat wurde somit nach einer Kultivierung von mindestens 60 Tagen von allen Schimmelpilzen besiedelt.

Die Agarplatten von *Cladosporium cladosporioides* und *Scopulariopsis brevicaulis* waren kontaminiert. Eine mögliche Ursache könnte sich aus der Tatsache ergeben, dass Lederhalbfabrikate nicht steril sind und sich auf dem Material verschiedene Mikroorganismen befinden [Orlita, 2004]. Grundsätzlich bietet die Kultivierungsmethode allerdings eine geringe Kontaminationsgefahr, da es sich bei dem adaptierten TEGEWA-Test um ein weitestgehend geschlossenes System handelt und keine Keime aus der Luft oder Umgebung auf den Agar oder den Prüfling gelangen können.

Außerdem können die Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, Nährstoffangebot) gezielt für jeden Schimmelpilz angepasst werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der Test für jeden Schimmelpilz einzeln durchgeführt wird und sich deshalb Aussagen darüber treffen lassen, ob Wet-Blue eine Nährstoffquelle für jeden einzelnen Hyphenpilz ist. Daraus lassen sich wiederum spezielle präventive Maßnahmen ableiten, vor allem dann, wenn es sich bei einem Bewuchs um Schimmelpilze handelt, die Resistenzen bzw. Wirkstofflücken gegenüber Wirkstoffen in Bioziden aufweisen.

Der Nachteil dieser Kultivierung besteht darin, dass diese Methode nicht der Realität entspricht:

- nur ein Schimmelpilz wird pro Prüfling getestet (realitätsnaher wären Mischkulturen), könnte aber auch angepasst werden, indem dem Agar eine Mischkultur zugesetzt wird
- zusätzlicher Einsatz eines Nährmediums zum Wet-Blue
- hohe Sporenanzahl entspricht nicht unbedingt den Realitätsbedingungen

Ein weiterer Nachteil ist die relativ zeitaufwendige Durchführung. Des Weiteren musste die Kultivierungszeit von 28 Tage auf mindestens 60 Tage verlängert werden.

6.2 Einschätzung der Kultivierungsbedingungen der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer für das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue)

Die Kultivierung nach den adaptierten Wachstumsbedingungen der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer weist eine geringe Kontaminationsgefahr durch die Kultivierung in Petrischalen auf. Des Weiteren kann durch die Befeuchtung der Filterpapierscheiben in den Petrischalen und dem Zusatz von Wasser in den Behältern (Dosen) ein humides und damit optimales Klima eingestellt werden. Die Einstellung der relativen Luftfeuchtigkeit ist hingegen nicht möglich. Auch eine optimale Wachstumstemperatur könnte pro Schimmelpilz eingestellt werden. Um gezielt ein Schimmelpilzwachstum zu fördern, musste die Kultivierungszeit für die, in dieser Arbeit eingesetzten Schimmelpilze auf mindestens 60 Tage verlängert werden. Ferner entspricht auch hier die eingesetzte, hohe Sporenkonzentration nicht unbedingt der Realität, wird aber in den Tests normalerweise eingesetzt, um ein Schimmelpilzwachstum zu provozieren. Das Wachstum der Schimmelpilze kann nur erfolgen, wenn der Schimmelpilz seine Nährstoffe aus dem Halbfabrikat bezieht, welches damit nur als Minimalmedium fungiert. Ein zusätzlicher Eintrag von Nährstoffen, wie im TEGEWA-Test entfällt. Damit kann eindeutig

festgestellt werden, ob Wet-Blue als Nahrungsgrundlage für jeden einzelnen Schimmelpilz dient.

Diese Testmethode spiegelt zwar durch den Verzicht auf zusätzliche Nährstoffe und der eingebrachten Feuchtigkeit realere Bedingungen wieder, ist aber in der Vorbereitung eher zeitaufwendig. Des Weiteren muss angenommen werden, dass die Luftfeuchtigkeit in der Feuchten Kammer zu hoch war und es deshalb zu keinem oder spätem Befall der Prüflinge durch Schimmelpilze kam [Sedlbauer, 2003]. Die meisten Schimmelpilzsporen sind allerdings in der Lage, unter ungeeigneten Bedingungen zu überleben. Sie breiten sich aus und beginnen ihren Wachstumszyklus, sobald sie sich in einer geeigneten Umgebung befinden [Rother, 1995]. Dies spiegeln die Ergebnisse wider. Bei erster visueller Betrachtung lag die Vermutung nahe, dass die Prüfkörper trotz längerer Kultivierung (länger als 30 Tage) nicht mit Schimmelpilzen bewachsen wurden. Dies konnte aber vor allem auf der Fleischseite durch mikroskopische Untersuchungen widerlegt werden.

6.3 Einschätzung der Kultivierungsbedingungen der Tropical Chamber für das Wachstum von Schimmelpilzen auf Lederhalbfabrikat (Wet-Blue)

Bei der Kultivierung in Anlehnung an den Tropical Chamber-Test wurden verschiedene Schimmelpilze direkt in die Erde eingebracht. Außerdem sind durch das Einlegen von Halbfabrikaten und Leder in die Erde zusätzliche auf dem Leder vorhandene Schimmelpilze in die Tropical Chamber eingetragen worden, um eine weitestgehend optimale Vielfalt von Schimmelpilzen zu haben, die Halbfabrikate und Ledermaterialien bewachsen [ASTM, 2010]. Die Proben hängen über der inokulierten Erde und haben keinen direkten Kontakt mit dem kontaminierten Boden. Dadurch werden reale Bedingungen bestmöglich simuliert, was auch der größte Vorteil dieser Methode ist. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass die Tropical Chamber jederzeit nutzbar ist und immer wieder Proben in den Test eingebracht werden können. Außerdem ist die Vorbereitungszeit im Vergleich zu den Kultivierungsbedingungen der beiden anderen Tests, nicht zeitaufwändig. Nachteilig ist, dass während des Tests an drei der fünf Proben eine augenscheinliche Austrocknung festgestellt wurde. Dies lässt in erster Linie darauf schließen, dass die Luftfeuchtigkeit in der Tropical Chamber zu niedrig waren und somit kein Bewuchs der Proben mit Schimmelpilzen erfolgen konnte (eine Bestimmung der relativen Luftfeuchtigkeit, wie eigentlich vorgesehen, erfolgte zu dieser Zeit nicht, da der

Sensor noch nicht installiert war). Somit konnte die Aussage von Sautour et al. (2002), dass die Wasseraktivität einen höheren Einfluss auf das Wachstum hat als die Temperatur, bestätigt werden. Wenn dieser anfängliche Feuchtigkeitsentzug nicht stattgefunden hätte, wäre der Bewuchs der Prüfkörper durch Schimmelpilze wahrscheinlich ausgeprägter gewesen. Außerdem erfolgte, trotz der Vielfalt der Schimmelpilze, vor allem in den ersten 30 Tagen kein übermäßig großer Bewuchs. Neben der zu geringen Feuchtigkeit, könnte eine fehlende Luftzirkulation der Grund sein. Ein weiterer Nachteil der Tropical Chamber liegt darin, dass die Temperatur nicht für jeden Schimmelpilz angepasst werden kann. Außerdem lässt sich nur schwer feststellen, welche Schimmelpilze den Prüfkörper bewachsen haben. Somit sind Vorhersagen über gezielte präventive Maßnahmen gegen einzelne Schimmelpilze nicht möglich.

6.4 Vergleich der Kultivierungsparameter der einzelnen Testmethoden und Schlussfolgerung

Hinsichtlich der Kultivierungsparameter erwies sich der TEGEWA-Tests als beste Methode einen optimalen Schimmelpilzbewuchs auf dem Halbfabrikat zu erzielen. Die Bedingungen entsprechen zwar keinen realen Bedingungen, doch ein starker Bewuchs auf den Prüfkörpern durch verschiedene, bekannte Schimmelpilze lies auf mögliche Schädigungen der Materialoberfläche hoffen. Die Direktbeimpfung / Feuchte Kammer bietet realere Bedingungen als der TEGEWA-Test, jedoch ist dieser in einem kurzen Kultivierungszeitraum aufgrund des mäßigen Bewuchses nicht zielführend. Die übertragenen Wachstumsparameter der Tropical Chamber simulieren die Realität am besten. Allerdings konnte ein Schimmelwachstum nur unzureichend durch den Feuchtigkeitsentzug gefördert werden. Des Weiteren ist es auch nicht möglich bei einer Schädigung des Materials, Rückschlüsse auf den Verursacher – die zerstörerische Schimmelpilzart – zu ziehen.

Die für die Untersuchungen verwendeten Schimmelpilze konnten bereits von Leder isoliert werden, daher handelt es sich um „ideale“ Testorganismen. Allerdings wachsen einzelne Schimmelpilze unterschiedlich schnell und unterscheiden sich in Bezug auf Nährstoffangebot, Temperatur und Luftfeuchtigkeit. *Trichoderma viride*, *Rhizopus oryzae* und *Paecilomyces variotii* könnten insgesamt eine Gefahr durch deren schnelles Wachstum gegenüber Lederhalbfabrikat sein. Möglicherweise könnte auch die Schädigung (wie die Verfärbungen) des Materials unterschiedlich schnell erfolgen.

Schimmelpilze, die das Lederhalbfabrikat nur langsam oder gering bewachsen haben, schädigen dieses möglicherweise auch nicht. Beispiele dafür wären nach ersten Erkenntnissen *Aureobasidium pullulans* oder *Cladosporium cladosporioides*. Die bewachsenen Proben wiesen eine Materialverfärbung auf, woraus folgt, dass eine indirekte Schädigung durch den Bewuchs mit Schimmelpilzen stattfindet.

Aufgrund der Vielzahl verwendeter Testorganismen und den anfangs nur teilweise oder gar nicht erfolgten Bewuchs, liegt die Vermutung nahe, dass das Lederhalbfabrikat, welches einer Sporenkontamination ausgesetzt war und kurzzeitig (max. 30 Tage) optimalen Wachstumsbedingungen erfahren hat, nur unter optimalen Bedingungen ein ideales Nährmedium für die Schimmelpilze darstellt.

Außerdem könnte der geringe Bewuchs der Probekörper mit suboptimalen Kultivierungsverhältnissen (Vertrocknung (Tropical Chamber) oder zu hohe Feuchtigkeitsverhältnisse (Feuchte Kammer)) einhergehen. Diese könnten eventuell noch vorteilhafter angepasst werden.

6.5 Mikroskopische Untersuchungen

Durch die mikroskopischen Untersuchungen lassen sich genauere Aussagen über mögliche Oberflächenschädigungen und Myzelwachstum bzw. Sporulation treffen. Generell ist die lichtmikroskopische Untersuchung der Fleischseite gegenüber der Narbenseite unvorteilhafter, da keine ebenmäßige Struktur, wie auf der Narbenseite, zu finden ist. Ein Vergleich mit einem Halbfabrikat, ohne Einwirkung von Schimmelpilzen, um Schädigungen in Form von Löchern oder Abschabungen festzustellen, ist nicht möglich. Jedoch konnte eine Verfärbung der Prüflinge und ein teilweise deutliches Myzelwachstum beobachtet werden. Für die Untersuchung auf die Zerstörung der Kollagenmatrix wurde nur die Narbenseite herangezogen. Die Kollagenmatrix der Halbfabrikate wurde auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen von keinem Schimmelpilz beschädigt, sodass die Vermutung naheliegt, dass die im Naturprodukt enthaltenen oder zusätzlich eingebrachten Fette als Nahrungsgrundlage für mikrobielles Wachstum genutzt werden.

6.5.1 Mikroskopische Untersuchungen TEGEWA-Test

Durch die Vorbereitung der Prüflinge auf die nachfolgenden mikroskopischen Untersuchungen aus dem TEGEWA-Test, sind einige Halbfabrikate dunkel bis schwarz

geworden. Ursachen dafür könnten bereits mit der Herstellung des Wet-Blues zusammenhängen. Natriumsulfid (Na_2S) wird im Herstellungsprozess als Äscher-Chemikalie genutzt. Reste könnten selbst nach dem Auswaschen im Material verblieben sein. Natriumsulfid ist gut löslich in niederen Alkoholen, wie z. B.: Ethanol, welches zur Reinigung der Prüflinge verwendet wurde. Flecken auf dem Naturprodukt entstehen durch versehentliche Verunreinigungen durch Eisen oder Kupfer während der Herstellung aber auch manchmal durch benötigte Metalle, wie z. B. Chrom (Chromgerbstoffe). Der Grund dafür sind die durch Ethanol frei gewordenen Schwefel-Ionen, welche mit freien Eisen-Ionen oder Kupfer-Ionen reagieren können. Potentielle Quellen der Eisenverunreinigung sind durch rostiges Wasser oder Einlassrohre, Maschinen, Lastwagen, kontaminierte Prozesschemikalien oder Blut in rohen Häuten zu finden. Das nun gebildete Eisensulfid besitzt eine schwarze Färbung. Ebenso könnte auch Kupfer mit Sulfid reagieren und dadurch Kupfersulfid bilden, was zu schwarzen Flecken auf dem Material führen kann. Diese sind sehr schwer zu entfernen, da sie in Wasser unlöslich sind. Die Behandlung mit einem Oxidationsmittel kann das unlösliche Kupfersulfid in das löslichere Kupfersulfat umwandeln, aber es besteht ein erhöhtes Risiko, dass dabei Chrom VI aus chromgegerbten Leder entsteht, welches stark krebserregend ist [URL-13]. Eine andere Möglichkeit wären exsudierte Stoffwechselprodukte verschiedener Schimmelpilze. Durch die übernommenen Wachstumsbedingungen aus dem TEGEWA-Test sind die Schimmelpilze am besten gewachsen. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch die meisten Stoffwechselprodukte durch die Schimmelpilze in diesem Test gebildet wurden und daher die Prüflinge nur beim TEGEWA-Test nach der Ethanolbehandlung dunkel bis schwarz geworden sind. Die mikroskopischen Untersuchungen verdeutlichen, dass alle Prüfkörper durch die Schimmelpilze verfärbt wurden. Dabei geht das größte Gefahrenpotential von *H. resinae*, *P. variotii*, *T. viride*, *R. oryzae*, *P. funiculosum*, *F. verticillioides* und *A. niger* DSM 1957 und *A. niger* DSM 2143 aus. Die Prüfkörper wurden deutlich durch den jeweiligen Schimmelpilz verfärbt (schwarze, braune, grüne Flecken) und haben sich teilweise schwer oder überhaupt nicht vom Halbfabrikat entfernen lassen. Trotz des scheinbar anfänglichen geringen Wachstums von *A. tenuissima* (KDA) und *S. brevicaulis* zeigten die mikroskopischen Untersuchungen, dass Wet-Blue von diesen Schimmelpilzen als Nahrungsgrundlage genutzt wird. Ein deutliches Myzelwachstum war vor allem im

Bereich der Haarkanäle und auf der Fleischseite zu erkennen. Bei längerer Kultivierung ist auch ein großer Schaden durch *E. amstelodami* anzunehmen. Dieser Schimmelpilz hat den Prüfling komplett durchwachsen und für seinen Metabolismus genutzt, weshalb der Prüfling nach 90-tägiger Kultivierung die doppelte Größe, sowie ein schwarzes und schleimiges Aussehen besaß. Ein geringerer Schaden wird vermutlich durch *P. chrysogenum*, *M. racemosus*, und *A. pullulans* verursacht, da diese Hyphenpilze relativ langsam im Gegensatz zu den anderen Schimmelpilzen gewachsen sind und ein verhältnismäßig geringes Myzelwachstum durch die mikroskopischen Untersuchungen erkennbar war.

6.5.2 Mikroskopische Untersuchungen Feuchte Kammer

Eine reine visuelle Betrachtung der Wet-Blue Prüflinge ist oft nicht ausreichend. Dies verdeutlichen die Ergebnisse. Nach ersten Erkenntnissen sind in der Feuchten Kammer auf der Fleischseite lediglich *A. niger* DSM 1957, *H. resinae*, *P. variotii* und *T. viride* gewachsen. Durch die mikroskopischen Untersuchungen konnte ein zusätzlicher Bewuchs der Fleischseiten durch *A. tenuissima* (KDA), *A. niger* DSM 2143, *F. verticillioides*, *R. oryzae* und *S. brevicaulis* festgestellt werden. Dieser Bewuchs war mit bloßem Auge nicht erkennbar. Da die typisch farbigen Sporen nicht zu sehen waren und das Myzel ein feines Geflecht ist, wurde vermutlich der Befall des Prüflings durch Schimmelpilze nicht festgestellt.

Das größte Gefahrenpotential geht anhand dieser Kultivierung von *P. variotii* aus. Dieser Schimmelpilz scheint sehr anpassungsfähig zu sein und ist bereits nach 30 Tagen trotz des minimalen Nährstoffangebotes und möglicherweise zu starken Feuchtigkeitsverhältnissen gewachsen. Weitere große Gefahren gehen von *T. viride* und *H. resinae* aus. *T. viride* wächst insgesamt sehr schnell und *H. resinae* scheint wie *P. variotii* sehr anpassungsfähig zu sein und hat den Prüfkörper auch verfärbt. Insgesamt wurden die Prüflinge im Gegensatz zum TEGEWA-Test nur schwach bis kaum verfärbt. Eine längere Kultivierung wirkte sich positiv auf das Wachstum der Schimmelpilze aus.

6.5.3 Mikroskopische Untersuchungen Tropical Chamber-Test

Die mikroskopischen Untersuchungen der in der Tropical Chamber kultivierten Prüflinge verdeutlichen eine Verfärbung der Halbfabrikate, welche vermutlich durch Schimmelpilzbefall verursacht wurde. Insgesamt wurden die Prüfkörper weniger verfärbt

als im TEGEWA-Test und es ist ein geringeres Myzelwachstum zu erkennen, was vermutlich mit der anfänglichen Vertrocknung einhergeht.

6.6 Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen

Mit der Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen sollte eine mögliche für das Schimmelpilzwachstum genutzte Nährstoffquelle untersucht werden. Normalerweise werden für diese Untersuchungen Doppelbestimmungen durchgeführt. Aufgrund der geringen Probenmenge war dies allerdings nicht möglich. Lediglich die Probe von *Wet-Blue* und *P. variotii* (Feuchte Kammer) konnte durch eine Doppelbestimmung untersucht werden. Die Differenzen (1,06 %/TS und 0,61 %/TS) bei *P. variotii* (Feuchte Kammer) können vermutlich damit begründet werden, dass der Schimmelpilz den Prüfling ungleichmäßig besiedelt hat und somit die Fettreduzierung an verschiedenen Stellen unterschiedlich stark war. Auch die zuvor stattgefundenene Behandlung der Halbfabrikate mit Ethanol entzieht dem Material möglicherweise etwas Fett. Dies ist aber unumgänglich, da der Pilz vor der Untersuchung abgetötet werden muss. Es ist möglich, dass auch andere Stoffe (Schwefel, Farbstoffe, Imprägnierungsmittel) aus dem Material herausgelöst werden, welches bei *Wet-Blue* irrelevant ist, da es noch nicht mit Farbstoffen oder ähnlichem behandelt wurde. Es ist davon auszugehen, dass vor allem natürliche Fette aus dem Material herausgelöst werden. Durch die mikroskopischen Untersuchungen konnte vorerst eine durch Schimmelpilze verursachte schädigende Wirkung der Kollagenmatrix im Sinne von Löchern oder Abschabungen ausgeschlossen werden. Der Trend der Ergebnisse zeigt, dass nicht wie postuliert die Kollagenmatrix angegriffen wird, sondern eher das Fett. Diese Aussage kann durch Zugno et al. (2010) bestätigt werden. Dabei wurde die größte Fettreduzierung durch *R. oryzae* und *P. variotii* (TEGEWA-Test) festgestellt. Möglicherweise hängt der kontinuierliche Bewuchs der Prüfkörper durch diese Schimmelpilze damit zusammen.

Im Herstellungsprozess von Leder werden Fette zusätzlich aufgetragen und im *Wet-Blue* ist nur das natürliche Fett vorhanden, daher würden die Schimmelpilze bei zusätzlicher Fettung vermutlich stärker und schneller wachsen.

6.7 Auswirkungen und Prävention

Um bessere Aussagen über das Wachstumsverhalten einiger Schimmelpilze und eine mögliche daraus resultierende Oberflächenschädigung treffen zu können, ist eine

Inkubation der Wet-Blue Prüflinge mit Schimmelpilzen von mindestens 60 bis 90 Tagen empfehlenswert. Da selbst unter geeigneten Wachstumsbedingungen, wie beim TEGEWA-Test, das Halbfabrikat Wet-Blue anfänglich nur teilweise von Schimmelpilzen genutzt wird.

Nach der Herstellung von Wet-Blue wird es zur Lagerung oder beim Transport nur teilweise abgedeckt über einen Bock gehangen oder auf Paletten gestapelt. Das hat zur Folge, dass zusätzliche Nährstoffe in Form von Schmutz oder Staub auf das Material gelangen können und ideale Wachstumsbedingungen für die Mikroorganismen bieten, auch wenn das Naturprodukt selbst nicht für ein Wachstum reichen würde. Dies verdeutlicht das verhaltene Wachstum der Schimmelpilze in der Feuchten Kammer.

Generell existieren zwei Arten von Materialzerstörung. Zum einen die Zerstörung des Wet-Blues durch Abbauprozesse und zum anderen Verfärbungen die durch exsudierte Stoffwechselprodukte hervorgerufen werden oder durch das Wachstum des Schimmelpilzes selbst. Letzteres (Verfärbung des Materials) konnte durch die eruierten Erkenntnisse aus den Versuchen nachgewiesen werden. Durch Materialverfärbungen können große Sachschäden entstehen und branchenübergreifende Schäden bedingen. Dunkel verfärbte Materialien können nicht mehr hell eingefärbt werden und Farbnuancen, die vom Kunden gefordert werden nicht mehr eingehalten werden. Möglicherweise wird der Farbstoff an den Stellen, die vom Schimmelpilz bewachsen waren, gar nicht mehr angenommen. Die Verarbeitung des Rohmaterials bis zum Lederhalbfabrikat Wet-Blue erfolgt nach Standardrezepturen in der Gerberei. Es gibt Gerbereien, die Leder ausgehend von der Rohhaut herstellen und es existieren Gerbereien, die sich das Halbfabrikat einkaufen und dann von da aus das Leder herstellen. Das bedeutet, es wird entweder das Halbfabrikat oder das Fertigerleder bzw. das Lederprodukt verschickt.

Während Leder mit einer Materialfeuchte unter 12% keine Nährstoffquelle für Schimmelpilze ist, kann das feuchte Halbfabrikat von Schimmelpilzen bewachsen werden [Falkiewicz-Dulik et al., 2015], [Coote et al., 1998], [Paulus, 2005]. Daher wird es für die Herstellung, aber mittlerweile auch für den Transport konserviert. Während alle Fertigungsschritte in der Wasserwerkstatt hintereinander erfolgen, kann das Halbfabrikat gelagert werden, d. h. es kann eine Pause gemacht werden, bevor es weiterverarbeitet wird. Auch da wird es konserviert. Als präventive Maßnahme kann das Halbfabrikat mit

Biozid und speziell gegen Schimmelpilze mit Fungizid ausgerüstet werden. In Europa finden vor allem die Biozide TCMTB, OPP, PCMC, OIT, MBT, BCM und DIMTS Verwendung [Kleban, 2008], [Falkiewicz-Dulik et al., 2015], [Paulus, 2005], [Gattner, 1988]. Der antimikrobielle Schutz ist dabei abhängig von der Auswahl und der Konzentration an Biozid. Zum Beispiel könnte das Wachstum von Penicillium-Arten normalerweise mit niedrigeren Konzentrationen als Aspergillus- oder Trichoderma-Arten unterbunden werden [Rother, 2005]. Die Verwendung von Bioziden ist beim fertigen Leder nicht mehr erlaubt. Im Leder dürfen keine Rückstände von Biozid mehr vorhanden sein. Dabei müssen Grenzwerte im Leder hinsichtlich des Umweltzeichens Blauer Engel eingehalten werden [Kleban, 2008], [Gattner, 1988]. Nur physikalische (trockene Lagerung/trockener Transport) und keine chemischen präventiven Maßnahmen dürfen zum Einsatz kommen, um das hygroskopische Leder zu schützen. Allerdings ist diese Prozedur zu teuer, da die Container beispielsweise entsprechend klimatisiert oder große Mengen Trockenmittel verwendet werden müssten. Aus diesem Grund ist es einfacher, das nasse Wet-Blue zu verschicken. Des Weiteren lässt es sich auch besser verarbeiten, da das Material noch relativ weich und geschmeidig ist.

Einige der in den Versuchen verwendeten Schimmelpilze weisen Wirkstofflücken auf, d. h. das Wet-Blue verschimmelt, obwohl das Material mit gängigem Biozid ausgerüstet wurde. Auf Grund der innerbetrieblichen Geheimhaltung laufender Projekte, können die betreffenden Schimmelpilze nicht genannt werden. Entsprechende Schimmelpilze sind aber bereits auf Halbfabrikaten vorgekommen. Mögliche Gründe bestehen darin, dass Fungizide von Schimmelpilzen abgebaut werden können oder während der Herstellung ausgewaschen werden oder auch aus dem Material diffundieren können [Meyer et al., 2016], [Gattner et al., 1988]. Dadurch kann es sein, dass das Wet-Blue unzureichend bzw. ungleichmäßig ausgerüstet ist und der Schimmelpilze in der Lage war, sich anzupassen und Resistenzen zu entwickeln. Ferner kann es sich um Schimmelpilze handeln, die von vornherein resistent gegenüber Wirkstoffen in den Bioziden sind. Deshalb sollte vorausschauend und gezielt gegen das Wachstum verschiedener Schimmelpilze vorgegangen werden. Vor allem der Einsatz von Breitbandbioziden sollte überdacht werden. Es existiert kein Wirkstoff, der sich auch unabhängig von seiner Einsatzkonzentration, gegen alle Schimmelpilze richtet [Gattner et al., 1988]. Deshalb ist es umso wichtiger gezielt zu schauen, welcher Schimmelpilz schädigt und welche

Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen gegen welchen Schimmelpilz wirken. Durch falsche Zusammensetzung und Konzentration an Wirkstoffen ist die Selektion bestimmter Arten von Schimmel möglich und kann zu einer schnellen Vermehrung dieser Arten führen. Das Problem der Resistenzbildung gegenüber Bioziden kann jedoch gelöst werden, indem man die Konzentration an Biozid anpasst oder auf ein anderes Konservierungsmittel auf Basis einer anderen Wirkstoffzusammensetzung ausweicht. Ein regelmäßiger Wechsel der Biozide verhindert die Adaptation an die Wirkstoffe und damit die Ausbildung von Resistenzen. Außerdem werden neben dem Einsatz von Kombinationsprodukten darauf geachtet, dass die Biozide chemisch stabil sind und die Umwelt nicht schädigen [Rother, 1995], [Gattner et al., 1988].

Chemikalien sollen durch ihre Herstellung und Anwendung keinerlei negative Auswirkungen für Tiere, Umwelt und die menschliche Gesundheit haben. Darum ist es besser die Konzentration und die Wirkstoffe der Biozide insgesamt zu reduzieren. Durch bereits auftretende Resistenzen und einem unzureichenden Wissen über den Wirkmechanismus vieler bereits auf dem Markt vorkommender Chemikalien wurde im Jahr 2006 eine grundlegende Reform über das europäische Chemikalienrecht eingeführt, welche am 01.06.2007 in Kraft trat. Diese europäische Chemikalienverordnung REACH zielt darauf ab, Gefahren und Risiken der Chemikalien für den Menschen und die Umwelt besser abschätzen können. Auch im Jahr 2012 wurde eine neue Biozid-Verordnung durch das Umweltbundesamt verabschiedet, um eine potentielle Gefährdung für Beschäftigte, Verbraucher, Tiere und Umwelt auszuschließen und um eine entsprechende Wirksamkeit der verwendeten Biozide sicherzustellen. Die Anwendung und das europaweite Inverkehrbringen der Biozide sollen streng kontrolliert und reguliert werden. Außerdem sollen Einsparungen getroffen werden. Einzelne Wirkstoffe sollen verschwinden bzw. substituiert werden, da diese auf dem Markt bereits nicht mehr zugelassen sind. Auch die Konzentrationen der Wirkstoffe soll reduziert werden. Biozidprodukte unterliegen einem aufwendigen Zulassungsverfahren. Die Genehmigung eines bioziden Wirkstoffs muss durch ein europäisches Verfahren genehmigt werden und dürfen nur bei bestimmten Produktarten (z. B. Holz, Leder, Gummi) angewendet werden. Außerdem werden bestimmte Biozide nur zugelassen, wenn der darin enthaltene Wirkstoff genehmigt wurde. Das bedeutet, dass nicht jedes Produkt mit dem gleichen Biozid ausgerüstet werden darf. Für jedes Produkt muss eine eigene Genehmigung stattfinden, um ein

entsprechendes Biozid verwenden zu dürfen. Die Zulassung für bestimmte Wirkstoffe gilt außerdem nur noch für fünf statt zehn Jahre. Die zugelassenen Wirkstoffe dürfen beispielsweise keine mutagenen (mutationsauslösende), karzinogenen (krebsauslösende) oder reproduktionstoxischen Eigenschaften haben [URL-10], [URL-11], [URL-12].

Die wichtigste präventive Maßnahme ist die Lagerung unter für den Schimmelpilz ungünstigen Bedingungen, da vor allem der Entzug von Feuchtigkeit auf das Pilzwachstum limitierend wirkt [Bockmühl et al., 2006]. Idealerweise sollten Halbfabrikate, Leder und Produkte aus Leder in einer sauberen, gut belüfteten Umgebung, in der die Temperatur konstant und mäßig im Bereich von 18-22 °C liegt, gelagert werden. Wenn dies nicht eingehalten werden kann, sollte die maximale Temperatur 25 °C nicht überschritten werden. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Bereich zwischen 45-55% liegen [Coote et al., 1998].

7 Ausblick

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass durch eine längere Kultivierung der Prüflinge mit Schimmelpilzen bessere Wachstumserfolge erzielt werden können. Generell sollte eine Austrocknung der Proben durch eine regelmäßige Befeuchtung, möglicherweise auch in kürzeren Abständen, vermieden werden. Bauliche Veränderungen zur Optimierung der TC sind während der Tests nicht möglich, wurden aber mit dem Betreuer besprochen und werden nach Abschluss der Versuche vorgenommen. Die TC ist eine Hausmethode, die sich noch in der Optimierungsphase befindet. Beispielsweise könnte mit einem Ventilator eine bessere Luftzirkulation und somit günstigere Verteilung der Luftfeuchtigkeit und der Sporen in der TC erreicht werden. Um die Luftfeuchtigkeit zu überprüfen, wäre ein Sensor empfehlenswert. Auch in der Feuchten Kammer sollten die Kultivierungsbedingungen von Anfang an besser überprüft werden, um zu hohe Feuchtigkeitsverhältnisse als Ursache für die geringen Wachstumserfolge ausschließen zu können.

Die Firma Memmert GmbH + Co. KG bietet Klimaschränke für Umweltsimulationen. Dabei können Temperaturen von 0 °C bis 70 °C und relative Luftfeuchtigkeitsverhältnisse von 10% bis 90% eingestellt werden. Eventuell wäre dies eine weitere Option für einen Bewuchstest mit angepassten Wachstumsbedingungen [URL-14].

Bei den mikroskopischen Untersuchungen sollte ein anderes Desinfektionsmittel z. B. auf Basis von Phenolen oder Aldehyden zum Waschen der Prüflinge getestet werden, um Aussagen darüber treffen zu können, ob Ethanol bzw. andere niedere Alkohole eventuell für die dunklen Verfärbungen der Prüflinge verantwortlich sind.

Durch die Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Stoffe konnte festgestellt werden, dass die Schimmelpilze vermutlich die Fette für ihr Wachstum nutzen. Diese Erkenntnis lässt sich möglicherweise durch Untersuchungen mit Farbstoffen, welche spezielle Proteine und Fette anfärben und weitere andere chemische Analysemethoden zur Fettgehaltsbestimmung und Kollagenbestimmung bestätigen. Außerdem wäre ein größerer Probenumfang nach der Kultivierung mit ausgewählten Schimmelpilzen zur Absicherung der Ergebnisse zur Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen empfehlenswert.

Ein einfacher Test, zur Bestimmung in welchem Umfang Fette für das Wachstum nötig sind, wäre ein unbehandeltes Halbfabrikat, ein entfettetes Halbfabrikat und ein zusätzlich (mit Fettungsmittel) gefettetes Halbfabrikat mit einer definierten Sporensuspension zu beimpfen und das Wachstum innerhalb eines definierten Zeitraumes gezielt zu beobachten. Wenn eine zusätzliche Fettaugabe das Wachstum der Schimmelpilze verbessern würde bzw. das Wachstum bei Entfettung gehemmt werden würde, wäre dies ein zusätzlicher Beweis dafür, dass Fette aus dem Halbfabrikat und zusätzliche Fettungsmittel als Nahrungsgrundlage für mikrobielles Wachstum dienen.

Für weitere Untersuchung hinsichtlich der Nährstoffquelle für Schimmelpilze könnten Dünnschnitte hergestellt und verschiedene Färbemethoden angewendet werden. Eine signifikante Fettreduzierung des Materials könnte mit dem Farbstoff Sudan IV nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um einen fettlöslichen Farbstoff, mit dem die Präsenz von natürlichem Fettmaterial oder die Durchdringung von Fettungsmitteln nachgewiesen werden könnte. Fette, Öle und Lipide erscheinen dabei rötlich bis orange. Für den Nachweis von freien Fettsäuren, Seifen und neutralen Fetten könnte Nilblau Sulfat genutzt werden. Dabei erscheinen neutrale Fette pink, Seifen dunkelblau und freie Fettsäuren hellblau [Tancous, 1986]. Zum Anfärben von Kollagen könnte die Pikro-Siriusrot-Färbung eingesetzt. Dabei binden die Sulfonsäuregruppen von dem Farbstoff an die basischen Gruppen der Kollagenfasertypen. Die Färbelösung besteht dabei aus dem Azofarbstoff Siriusrot F3BA (0,1%) und einer gesättigten, wässrigen Lösung von Pikrinsäure. Durch den Farbstoff Siriusrot soll die Doppelbrechung verstärkt werden, wenn sich das Farbstoffmolekül längs von den Kollagenfasern anlagert. Die Pikrinsäure verhindert wahrscheinlich das Anfärben von nicht kollagenem Material. Wobei der Wirkmechanismus von Pikrinsäure bislang noch relativ unerforscht ist. Die Färbung des Gewebes erfolgt für ca. 1 Stunde nachdem das Material in Paraffin eingebettet und auf 5 µm geschnitten wurde. Kollagenfasern erscheinen in der Lichtmikroskopie rot. Bei der Polarisationsmikroskopie könnte es möglich sein, die verschiedenen Kollagentypen noch zusätzlich zu differenzieren. Die einzelnen Kollagenfasertypen weisen eine unterschiedliche Farbe und Intensitäten der Doppelbrechung auf. Kollagentyp I weist eine sehr starke Doppelbrechung auf, die Fasern erscheinen gelb bis rot. Bei Kollagentyp III hingegen erscheinen die Fasern grünlich bei einer eher schwachen Doppelbrechung [Montes et al., 1991], [Junqueira et al., 1979].

Die Untersuchung des Kollagens vor und nach dem Befall der Probe durch Schimmelpilze, könnte durch Farbabstufungen einen weiteren Aufschluss darüber geben, ob Kollagen für das Wachstum des Schimmelpilzes genutzt wird, auch wenn mikroskopisch keine direkten Narbenschäden zu erkennen sind.

8 Zusammenfassung

Schimmelpilze sind in unserer Umwelt und in vielen industriellen Herstellungsprozessen von zentraler Bedeutung. Allerdings können durch diese Mikroorganismen auch große Schäden angerichtet werden. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen ist eine Kontamination bestimmter Produkte mit Schimmelpilzsporen meist unvermeidbar. Schimmelpilze sind sehr anpassungsfähig. Ein geringes Nährstoffangebot, Temperaturen zwischen 15 und 40 °C, ein leicht saurer pH-Bereich zwischen 4,5 und 6,5 sowie ein a_w -Wert (frei verfügbares Wasser) von 0,80 bieten ideale Wachstumsbedingungen für Schimmelpilze. Die verschiedenen Kultivierungsbedingungen aus TEGEWA-Methode, Direktbeimpfung/ Feuchte Kammer und Tropical Chamber-Test sollten Aufschluss darüber geben, ob und wie gut verschiedene Schimmelpilze das Lederhalbfabrikat (Wet-Blue) als Nährstoffquelle für ihr Wachstum nutzen können.

Mittels der verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurde versucht, die in der Praxis vorkommenden Bedingungen nachzubilden, die ein Schimmelpilzwachstum auf den Lederhalbfabrikaten bedingen könnten. Die Kultivierungsbedingungen aus dem TEGEWA-Test entsprechen dabei am wenigsten der Realität, gefolgt von der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer. Die Tropical Chamber simuliert die in der Praxis vorkommenden Bedingungen hingegen am besten.

Die verschiedenen, getesteten Schimmelpilze zeigten erhebliche Unterschiede im Wachstumsverhalten, wobei sich die Kultivierungsparameter des TEGEWA-Tests als am effektivsten erwiesen haben. Die Wachstumsbedingungen der Direktbeimpfung / Feuchten Kammer erschienen ungeeignet, wenn für Untersuchungszwecke angestrebt wird, dass Schimmelpilze das Halbfabrikat innerhalb eines kurzen Kultivierungszeitraumes als Nahrungsgrundlage nutzen sollen. Durch die anfänglich suboptimalen Bedingungen in der Tropical Chamber kam es zu einem verzögerten Bewuchs des Wet-Blue.

Die auftretenden Unterschiede im Wachstum können wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückgeführt werden. Die Kultivierungsbedingungen der TEGEWA-Methode bilden mit dem Agar und dem mit Sporen beimpften Nährboden eine perfekte Grundlage für das Wachstum von Schimmelpilzen. Wohingegen bei einer Kultivierung nach dem Prinzip der

Direktbeimpfung / Feuchten Kammer das Halbfabrikat als Minimalwachstumsmedium anzusehen ist, was ein geringes Schimmelpilzwachstum zur Folge hat. Die Anzucht in der Tropical Chamber bietet allgemein gute Wachstumsbedingungen. Jedoch führte ein anfänglicher, unbeabsichtigter Feuchtigkeitsentzug zu einem verminderten Wachstum.

Durch die mikroskopischen Untersuchungen in Kombination mit der Untersuchung der in Dichlormethan löslichen Substanzen konnte bestätigt werden, dass Fette in den Halbfabrikaten Nahrungsgrundlage für mikrobielles Wachstum sein können und die Kollagenmatrix vorerst nicht angegriffen wird. Außerdem wurde festgestellt, dass ein Schimmelpilzbefall immer eine Materialverfärbung bedingt. Letzteres konnte vor allem durch die Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test bestätigt werden. Alle Wet-Blue Prüflinge wurden stark bewachsen und verfärbt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine mikroskopische Untersuchung unumgänglich ist, da das Wachstum mancher Hyphenpilze auf dem Halbfabrikat mit bloßem Auge schwer erkennbar ist. Dies verdeutlicht insbesondere die Testergebnisse in der Feuchten Kammer.

Nach ganzheitlicher Betrachtung aller Ergebnisse wurde festgestellt, dass das größte Gefahrenpotential vermutlich von *P. variotii*, *H. resinae*, *T. viride*, *R. oryzae*, *A. niger* DSM 1957, *F. verticillioides* und *P. funiculosum* ausgeht. Nach längerer Kultivierung stellt auch *E. amstelodami* eine potentielle Gefahr für Wet-Blue dar. Das Wachstum von *S. brevicaulis* und *A. tenuissima* wurde unterschätzt und erst nach mikroskopischen Untersuchungen des Prüfkörpers deutlich erkannt. Speziell für die aufgeführten Mikroorganismen sollten präventive Maßnahmen erarbeitet werden, um Folgeschäden, wie beispielsweise die Fleckenbildung auf dem Naturprodukt, rechtzeitig zu vermeiden.

9 Summary

Fungi are indispensable in our environment and very important for many industrial manufacturing processes. However, these microorganisms can also cause various damages. Due to their ubiquitous occurrence, contamination of certain products with moulds is still unavoidable. Moulds are highly adaptable. Low nutrient supply, temperatures between 15 to 40 °C, slightly acidic pH range between 4.5 and 6.5 and an a_w -value of 0.80 are ideal growth conditions for fungi.

Cultivation parameters of different testing methods like TEGEWA method, Direct Inoculation / Humidity Chamber and Tropical Chamber test are used to determine whether and how different moulds can use the semi-finished leather as a nutrient source for its growth. These varied cultivation parameters simulate the conditions occurring in practice.

Finally, we found that the TEGEWA test did not reflect reality to reproduce real conditions. The Direct Inoculation / Humidification Chamber method is more suitable. The Tropical Chamber Test simulates the real conditions at the best.

Various examined fungi indicated differences in growth patterns. The cultivation parameters of the TEGEWA test seemed to be most effective. The growth conditions of the Moist Chamber / Direct Vaccination appeared inappropriate for purposes that moulds should use the semi-finished leather as a foodstuff within a short cultivation period. Due to the initially suboptimal conditions in the Tropical Chamber, a delayed growth of the wet blue occurred. The differences in growth can be attributed to different cultivation conditions.

The cultivation conditions of the TEGEWA method with nutrient agar and inoculation of high concentrated spores are favourable for the growth of moulds. Whereas cultivation based on Direct Inoculation / Moist Chamber method without further nutrients provides a minimal medium which affects lower mildew growth. Generally good conditions are offered growing moulds in the Tropical Chamber. But an initially unintended dehydration caused diminished growth at the beginning.

At microscopic examinations combined with substances soluble in dichloromethane confirmed that fats serve as nutritional source for microbial growth. Initially, a collagen degradation could not be observed. In addition, mildew growth is always associated with

material discoloration. This has been confirmed mainly by the cultivation according to the TEGEWA test. In this case, all Wet Blue specimens were strongly discoloured and had been overgrown by fungi. Microscopic examination is unavoidable since the growth of hyphae on semi-finished product is often not visible to the naked eye. This has been confirmed by test results in the Humidity Chamber.

According to holistic view of all results, the highest danger came from *P. variotii*, *H. resinae*, *T. viride*, *R. oryzae*, *A. niger* DSM 1957, *F. verticillioides* and *P. funiculosum*. After sufficient cultivation, *E. amstelodami* is also a potential danger to Wet Blue. The growth of *S. brevicaulis* and *A. tenuissima* has been underestimated. After microscopic examinations, a deterioration of Wet Blue specimen has been clearly recognized. Preventative measures should be developed for these microorganisms in order to avoid the consequential damage, like spotting on the natural product.

Anhang

Beispiele für Oberflächenschädigungen am Material Leder



Abb. 74: Beschädigte Lederoberfläche [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009]

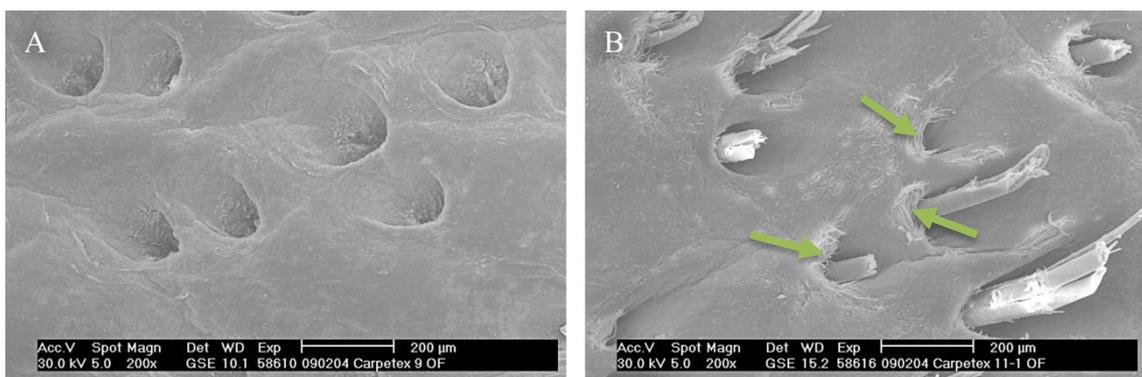


Abb. 75: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer intakten (A) und beschädigten (B) Lederoberfläche [Carpetex Lederhilfsmittel GmbH et al., 2009]

Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test nach 27-30

Tagen

Tabelle 7: Ergebnisse TEGEWA-Test nach 27-30Tagen

Spezies	Kultivierungs-Zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	28 Tage	NS/FS: kein Wachstum (nur auf Agarplatte)

Spezies	Kultivierungs-Zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> V-8 Juice	28 Tage	NS/FS: kein Wachstum (nur auf Agarplatte bis an den Prüfkörper)
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	29 Tage	NS: ansatzweises Wachstum mit Sporen überwiegend am Rand, ca. 20-25% FS: Wachstum mit Sporen überwiegend am Rand, ca. 20%
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2143	27 Tage	NS: Wachstum von ca. 80-95% mit Sporen FS: nur Randbewuchs mit Sporen
<i>Aureobasidium pullulans</i>	28 Tage	NS/FS: kein Wachstum (nur auf Agarplatte, bis an den Prüfkörper)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	29 Tage	NS: kein Wachstum (nur auf Agarplatte) Ausbildung einer Art Hemmhof um Prüfkörper von ca. 0,5 cm FS: kein Wachstum (nur auf Agarplatte) Ausbildung einer Art Hemmhof um Prüfkörper von ca. 0,5 cm, 1 Prüfling wies Kontaminationen auf
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	28 Tage	NS/FS: kein Wachstum (nur auf Agarplatte, bis an den Prüfkörper)
<i>Fusarium verticillioides</i>	27 Tage	NS/FS: Prüfkörper ca. zu 40% bewachsen

Spezies	Kultivierungs-Zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Hormoconis resiniae</i>	30 Tage	NS/FS: leichter Randbewuchs, ca. 10%
<i>Mucor racemosus</i>	29 Tage	NS: ansatzweiser Randbewuchs von ca. 5% FS: Bewuchs bis an den Prüfkörper
<i>Paecilomyces variotii</i>	27 Tage	NS: Bewuchs mit Sporen, ca. 50-80% FS: Wachstum mit Sporen, ca. 80-90% der Probenoberfläche
<i>Penicillium chrysogenum</i>	28 Tage	NS/FS: kein Wachstum, (nur auf Agarplatte, bis an den Prüfkörper)
<i>Penicillium funiculosum</i>	28 Tage	NS/FS: ca. 85% der Oberfläche bewachsen
<i>Rhizopus oryzae</i>	30 Tage	NS/FS: vollständig bewachsen (100%), ohne Sporulation
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	28 Tage	NS/FS: kein Bewuchs, scheinbarer Hemmhof von ca. 0,5- 1,0 cm, 1 Probe (FS) wies Kontaminationen auf
<i>Trichoderma viride</i>	29 Tage	NS: 90% der Oberfläche bewachsen, mit Sporulation FS: 1 Probe nicht bewachsen, 2 Proben zu 50% bewachsen, teilweise Sporulation

Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test nach 61-70 Tagen

Tabelle 8: Ergebnisse TEGEWA-Test nach 61-70Tagen

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	63 Tage	NS: 1x zu ca. 70%, 2x zu ca. 5-10% bewachsen FS: 1x 40% Wachstum, 2x 5-10% bewachsen
<i>Alternaria tenuissima</i> V-8 Juice	63 Tage	NS: 2x zu 30-40% bewachsen (am Rand), 1x ca. 20% Randbewuchs FS: 1x 10%, 2x 40% bewachsen
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	70 Tage	NS: Wachstum von ca. 50-60% mit Sporen FS: Wachstum von ca. 40-50% mit Sporen
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2143	68 Tage	NS: Wachstum von ca. 80-95% mit Sporen FS: Wachstum von ca. 70% mit Sporen
<i>Aureobasidium pullulans</i>	61 Tage	NS: Wachstum von 30-40% auf Prüfkörper FS: leichter Randbewuchs von ca. 10-20%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	62 Tage	NS: Bewuchs auf Prüfkörper, ca. 15%, Ausbildung einer Art Hemmhof um Prüfkörper von ca. 0,5 cm

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
		FS: 2x leichter Bewuchs von ca. 5%, Ausbildung einer Art Hemmhof um Prüfkörper von ca. 0,5 cm, 1 Prüfling wies Kontaminationen auf
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	61 Tage	NS/FS: vollständig bedeckt mit starken Verfärbungen des Prüfkörpers, 1x FS Bildung von Exsudaten
<i>Fusarium verticillioides</i>	68 Tage	NS: Prüfkörper ca. zu 80% bewachsen FS: 1x 70%, 2x 30-50% bewachsen
<i>Hormoconis resiniae</i>	63 Tage	NS: Wachstum von ca. 60% FS: Wachstum von ca. 30-40% auf Prüfkörper
<i>Mucor racemosus</i>	70 Tage	NS: Wachstum zu ca. 50% auf Prüfkörper FS: ca. 20% bewachsen
<i>Paecilomyces variotii</i>	68 Tage	NS: Bewuchs mit Sporen, ca. 60-80% FS: Wachstum mit Sporen, ca. 80-90% der Probenoberfläche
<i>Penicillium chrysogenum</i>	69 Tage	NS: Wachstum zu ca. 40% auf Prüfkörper FS: Wachstum zu ca. 20-30% auf Prüfkörper

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Penicillium funiculosum</i>	61 Tage	NS/FS: ca. 85-90% der Oberfläche bewachsen
<i>Rhizopus oryzae</i>	63 Tage	NS/FS: vollständig bewachsen (100%), leichte Sporulation
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	69 Tage	NS/FS: nachträglicher vom Prüfkörper ausgehender Bewuchs (ca. 1mm), 1x NS leicht zu 5% bewachsen, scheinbarer Hemmhof von ca. 0,5- 1,0 cm, 1 Probe (FS) wies starke Kontaminationen auf
<i>Trichoderma viride</i>	62 Tage	NS: 90-100% der Oberfläche bewachsen, mit Sporulation FS: 1 Probe nicht bewachsen, 2 Proben zu 55% bewachsen, teilweise Sporulation

Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an den TEGEWA-Test nach 76-90

Tagen

Tabelle 9: Ergebnisse TEGEWA-Test nach 76-90Tagen

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	76 Tage	NS: 1x zu ca. 70%, 2x zu ca. 5-10% bewachsen FS: 1x 70% Wachstum, 2x 10-20% bewachsen

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> V-8 Juice	76 Tage	NS: 2x zu 30-40% bewachsen (am Rand), 1x ca. 20% Randbewuchs FS: 1x 30%, 2x 40% bewachsen
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	83 Tage	NS: Wachstum von ca. 60-70% mit Sporen FS: Wachstum von ca. 60% mit Sporen
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2143	81 Tage	NS: Wachstum von ca. 95% mit Sporen FS: Wachstum von ca. 85% mit Sporen
<i>Aureobasidium pullulans</i>	88 Tage	NS: Bewuchs von ca. 50% auf Prüfkörper FS: Randbewuchs von ca. 10-20%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	89 Tage	NS: leichter Bewuchs auf Prüfkörper ca. 20%, Ausbildung einer Art Hemmhof um Prüfkörper von ca. 0,3-0,5 cm FS: 2x leichter Bewuchs von ca. 5- 10%, 3x Ausbildung einer Art Hemmhof um Prüfkörper von ca. 0,5 cm, 1 Prüfling wies Kontaminationen auf

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	88 Tage	NS/FS: vollständig bedeckt mit starken Verfärbungen des Prüfkörpers, Anschwellung auf doppelte Größe, 1x FS starke Bildung von Exsudaten
<i>Fusarium verticillioides</i>	81 Tage	NS: Prüfkörper ca. zu 85-90% bewachsen FS: 1x 70%, 2x 30-50% bewachsen
<i>Hormoconis resiniae</i>	90 Tage	NS: Wachstum von ca. 70% FS: Wachstum von ca. 45-50% auf Prüfkörper
<i>Mucor racemosus</i>	83 Tage	NS: Prüfling zu ca. 50% bewachsen FS: 20% Randbewuchs
<i>Paecilomyces variotii</i>	81 Tage	NS: 2x Bewuchs mit Sporen von ca. 80-90%, 1x 60% FS: Wachstum mit Sporen, ca. 85-95% der Probenoberfläche
<i>Penicillium chrysogenum</i>	82 Tage	NS: 45-55% bewachsen FS: 20-30% bewachsen
<i>Penicillium funiculosum</i>	88 Tage	NS/FS: ca. 90% der Oberfläche bewachsen
<i>Rhizopus oryzae</i>	90 Tage	NS/FS: vollständig bewachsen (100%), teilweise Sporulation

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	82 Tage	NS/FS: nachträglicher vom Prüfkörper ausgehender Bewuchs (ca. 1mm), scheinbarer Hemmhof von ca. 0,5 cm, 1x NS zu 30% bewachsen, 1 Probe (FS) wies starke Kontaminationen auf
<i>Trichoderma viride</i>	89 Tage	NS: 95-100% der Oberfläche bewachsen, mit Sporulation FS: 1 Probe nicht bewachsen, 2 Proben zu 60% bewachsen, teilweise Sporulation

Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an die Feuchte Kammer nach 27-30 Tagen

Tabelle 10: Ergebnisse Direktbeimpfung / Feuchte Kammer nach 27-30 Tagen

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	28 Tage	0%
<i>Alternaria tenuissima</i> V-8 Juice	28 Tage	0%
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	29 Tage	0%
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2143	27 Tage	0%

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	28 Tage	0%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	29 Tage	0%
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	28 Tage	0%
<i>Fusarium verticillioides</i>	27 Tage	0%
<i>Hormoconis resinae</i>	30 Tage	0%
<i>Mucor racemosus</i>	29 Tage	0%
<i>Paecilomyces variotii</i>	27 Tage	Prüfkörper beidseitig ca. 30% bewachsen
<i>Penicillium chrysogenum</i>	28 Tage	0%
<i>Penicillium funiculosum</i>	28 Tage	0%
<i>Rhizopus oryzae</i>	30 Tage	0%
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	28 Tage	0%
<i>Trichoderma viride</i>	29 Tage	0%

Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an die Feuchte Kammer nach 61-70 Tagen

Tabelle 11: Ergebnisse Direktbeimpfung / Feuchte Kammer nach 61-70 Tagen

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	63 Tage	0%
<i>Alternaria tenuissima</i> V-8 Juice	63 Tage	0%
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	70 Tage	1x FS zu ca. 10% bewachsen
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2143	68 Tage	0%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	61 Tage	0%
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	62 Tage	0%
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus</i> <i>hollandicus</i>)	61 Tage	0%
<i>Fusarium verticillioides</i>	68 Tage	0%
<i>Hormoconis resinae</i>	63 Tage	Prüfkörper beidseitig ca. 40% bewachsen
<i>Mucor racemosus</i>	70 Tage	0%
<i>Paecilomyces variotii</i>	68 Tage	Prüfkörper beidseitig ca. 45-50% bewachsen
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	69 Tage	0%
<i>Penicillium funiculosum</i>	61 Tage	0%
<i>Rhizopus oryzae</i>	63 Tage	0%

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	69 Tage	0%
<i>Trichoderma viride</i>	62 Tage	1x FS zu ca. 10% bewachsen

**Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an die Feuchte Kammer nach 83-104
Tagen**

Tabelle 12: Ergebnisse Direktbeimpfung / Feuchte Kammer nach 83-104 Tagen

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Alternaria tenuissima</i> KDA	83 Tage	0%
<i>Alternaria tenuissima</i> V-8 Juice	83 Tage	0%
<i>Aspergillus niger</i> DSM 1957	90 Tage	1x FS zu ca. 20% bewachsen
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2143	92 Tage	0%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	102 Tage	0%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	103 Tage	0%
<i>Eurotium amstelodami</i> (= <i>Aspergillus hollandicus</i>)	102 Tage	0%
<i>Fusarium verticillioides</i>	92 Tage	0%

Spezies	Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
<i>Hormoconis resiniae</i>	104 Tage	Prüfkörper beidseitig ca. 50-60% bewachsen
<i>Mucor racemosus</i>	90 Tage	0%
<i>Paecilomyces variotii</i>	92 Tage	Prüfkörper beidseitig ca. 60-70% bewachsen
<i>Penicillium chrysogenum</i>	91 Tage	0%
<i>Penicillium funiculosum</i>	102 Tage	0%
<i>Rhizopus oryzae</i>	104 Tage	0%
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	91 Tage	0%
<i>Trichoderma viride</i>	103 Tage	1x NS zu ca. 5% bewachsen 1x FS zu ca. 15% bewachsen

Ergebnisse der Kultivierung in Anlehnung an den Tropical Chamber-Test nach 28-96 Tagen

Tabelle 13: Ergebnisse Tropical Chamber-Test nach 28-96 Tagen

Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
28 Tage	2x NS/FS zu ca. 30-35% bewachsen 3x NS/FS: starker Feuchtigkeitsentzug, Aushärtung der Prüflinge und kein Myzelwachstum
62 Tage	3x NS zu 70% bewachsen 2x NS zu 5% bewachsen 3x FS zu 5% bewachsen 2x FS zu 40% bewachsen

Kultivierungs- zeitraum	Myzelwachstum und Sporenbildung auf Narbenseite (NS) und Fleischseite (FS)
96 Tage	3x NS zu 75-85% bewachsen 2x NS zu 10% bewachsen 3x FS zu 5-10% bewachsen 2x FS zu 40% bewachsen

Verwendete unterwachsene Narbenseiten aus dem adaptierten TEGEWA-Test

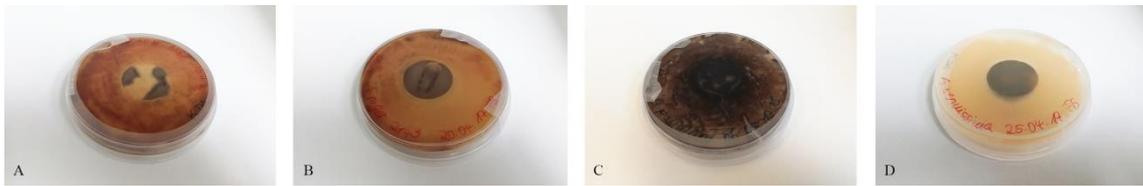


Abb. 76: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Aspergillus niger* DSM 1957 (A), *Aspergillus niger* DSM 2143 (B), *Aureobasidium pullulans* (C) und *Alternaria tenuissima* (KDA) (D)

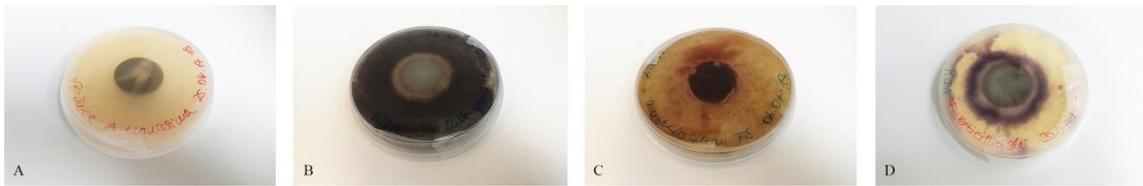


Abb. 77: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) (A), *Cladosporium cladosporioides* (B), *Eurotium amstelodami* (C) und *Fusarium verticillioides* (D)

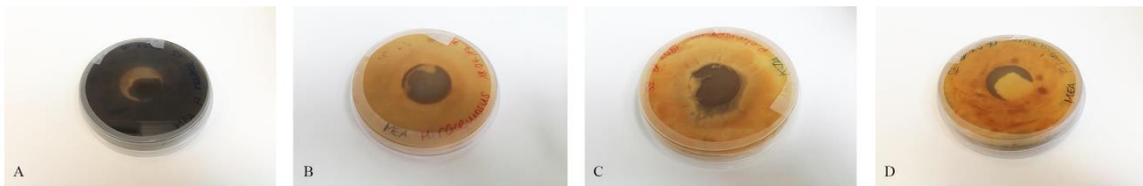


Abb. 78: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Hormoconis resinae* (A), *Mucor racemosus* (B), *Penicillium chrysogenum* (C) und *Penicillium funiculosum* (D)

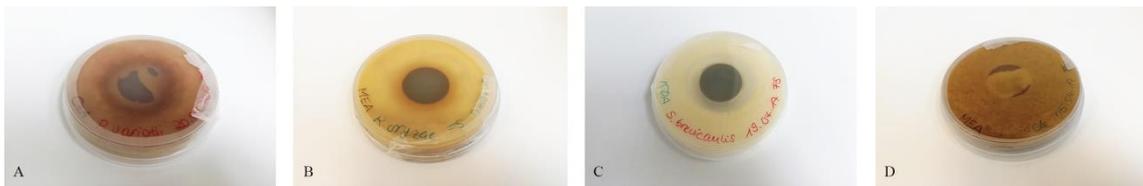


Abb. 79: Verwendete unterwachsene Narbenseiten von *Paecilomyces variotii* (A), *Rhizopus oryzae* (B), *Scopulariopsis brevicaulis* (C) und *Trichoderma viride* (D)

Mikroskopische Untersuchungen Fleischseite Wet-Blue

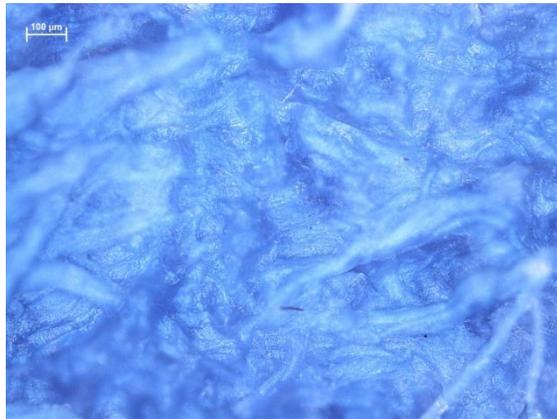


Abb. 80: Mikroskopische Aufnahme der Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Mikroskopische Untersuchungen TEGEWA-Test

Unterwachsene Narbenseiten aus TEGEWA-Test

***Alternaria tenuissima* KDA**

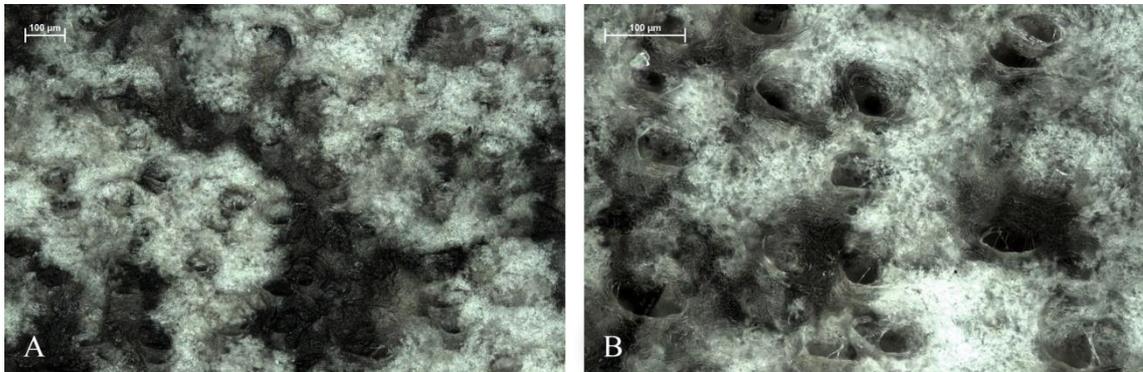


Abb. 81: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) für 76 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

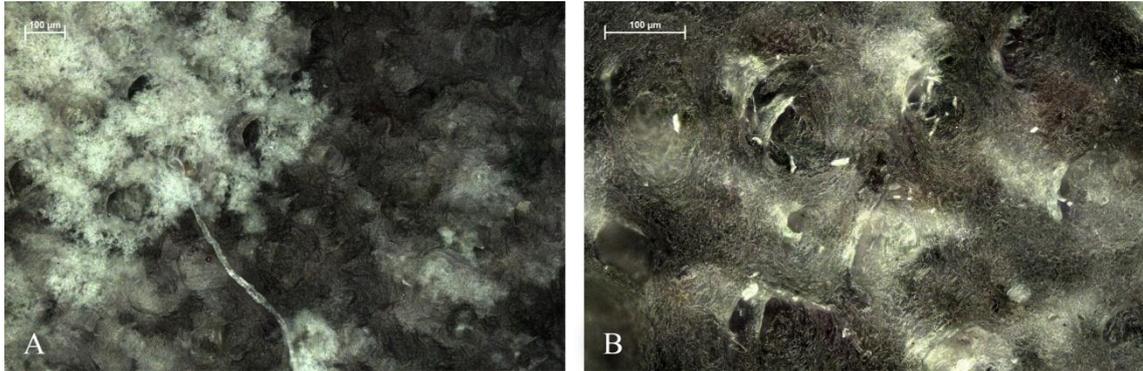
Alternaria tenuissima V-8 Juice

Abb. 82: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) für 76 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

Aspergillus niger DSM 1957

Abb. 83: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 für 83 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

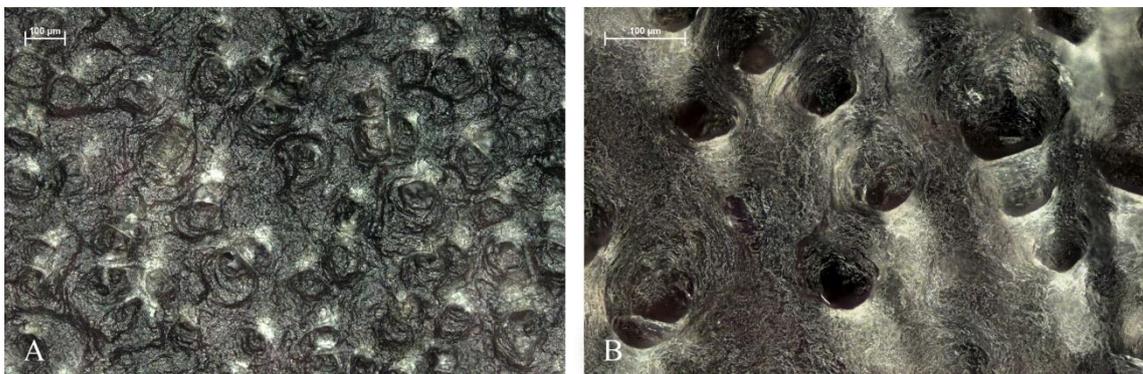
Aspergillus niger DSM 2143

Abb. 84: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 2143 für 81 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

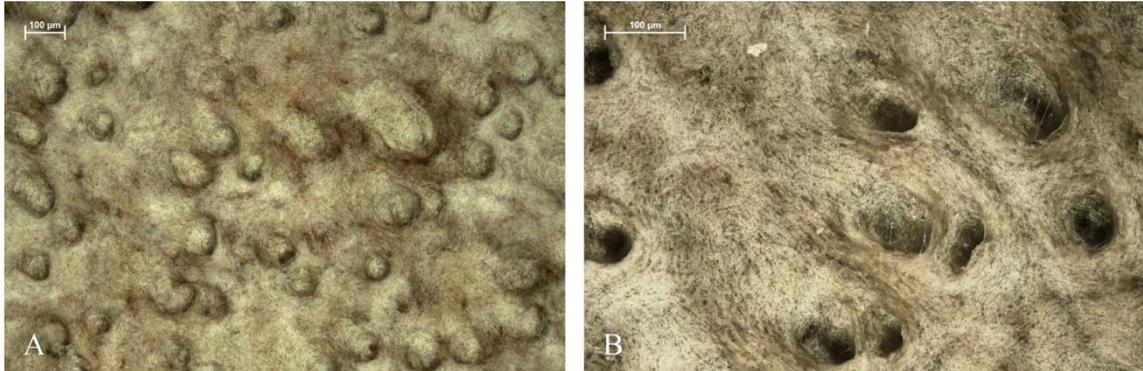
Aureobasidium pullulans

Abb. 85: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* für 88 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

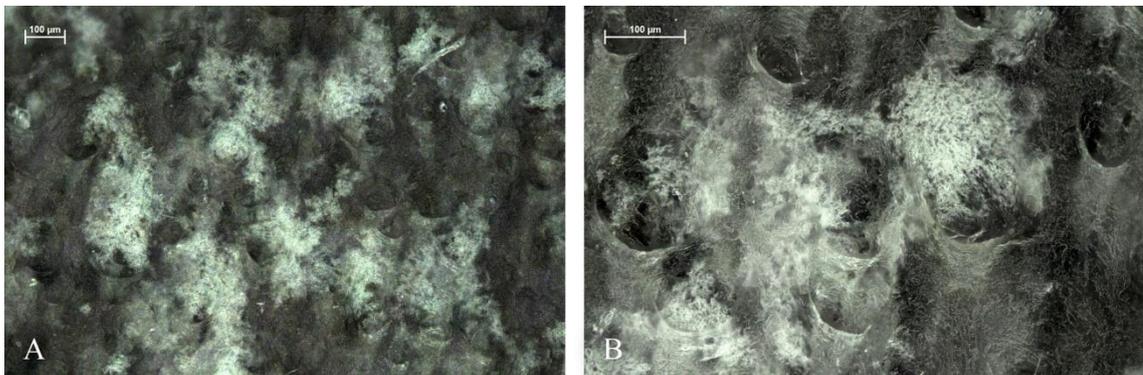
Cladosporium cladosporioides (montecillanum)

Abb. 86: Mikroskopische Aufnahme der mit *Cladosporium cladosporioides* für 89 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

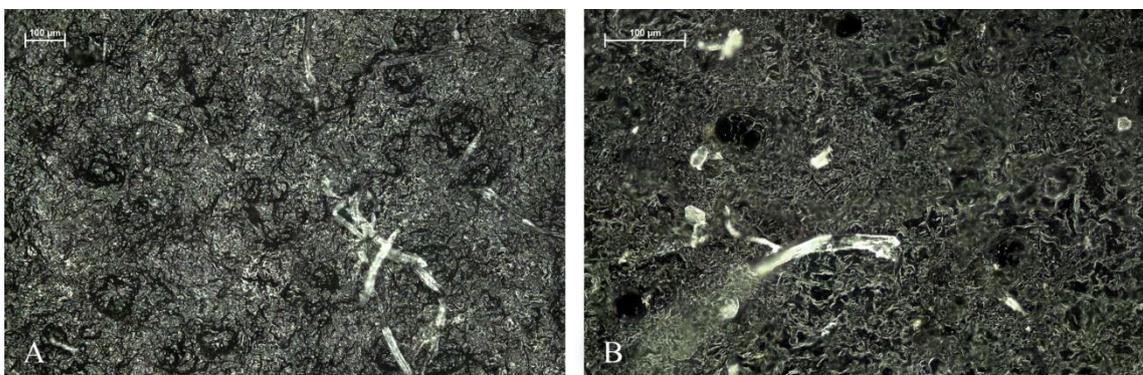
Eurotium amstelodami (= Aspergillus hollandicus)

Abb. 87: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* für 88 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

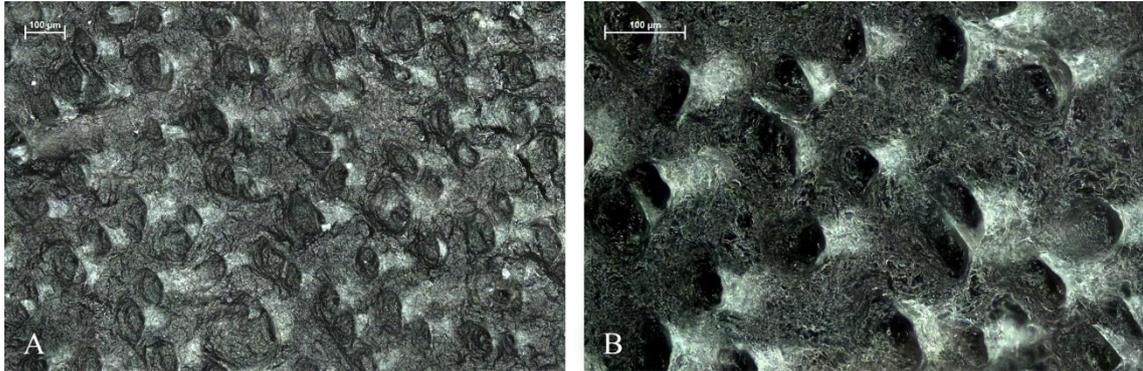
Fusarium verticillioides

Abb. 88: Mikroskopische Aufnahme der mit *Fusarium verticillioides* für 81 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

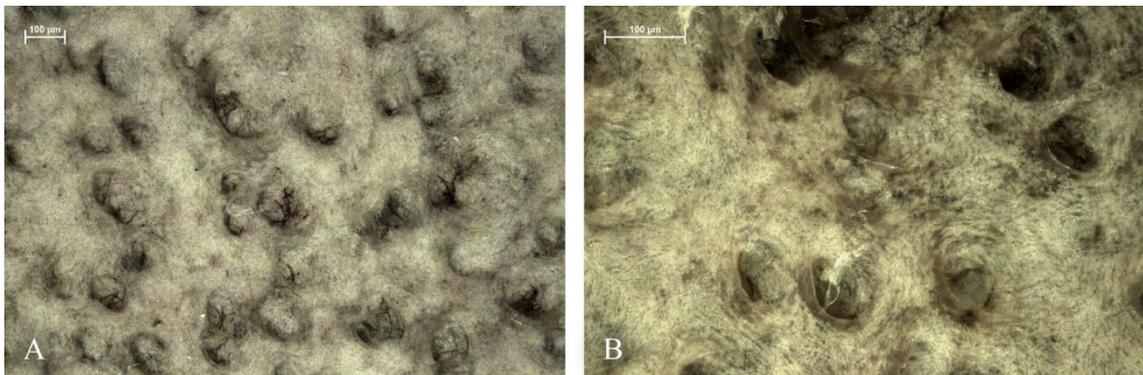
Hormoconis resinae

Abb. 89: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resinae* für 90 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

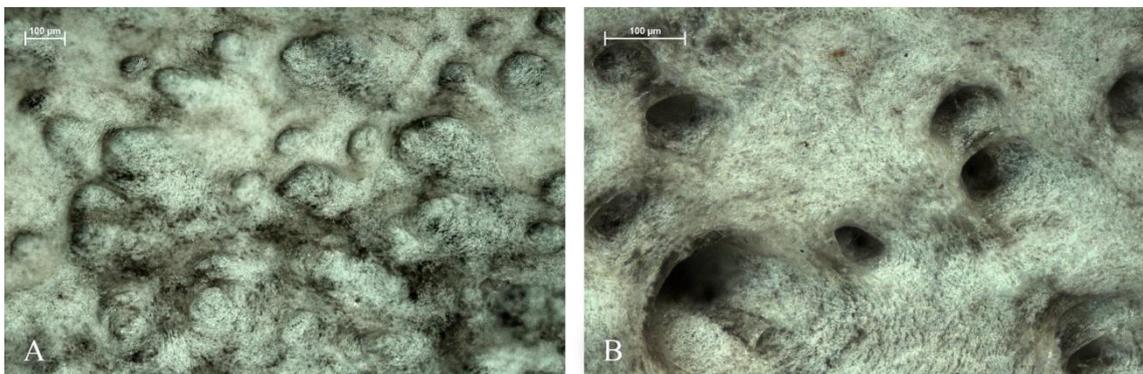
Mucor racemosus

Abb. 90: Mikroskopische Aufnahme der mit *Mucor racemosus* für 83 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

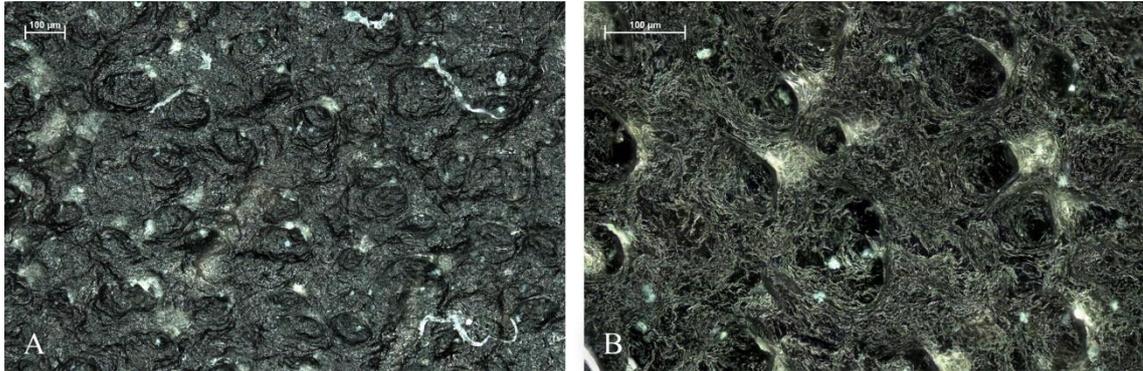
Paecilomyces variotii

Abb. 91: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* für 81 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

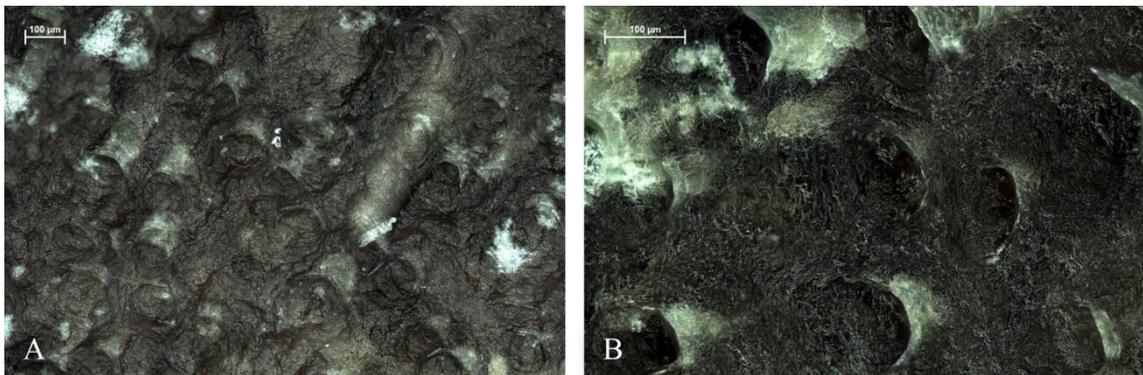
Penicillium chrysogenum

Abb. 92: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium chrysogenum* für 82 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

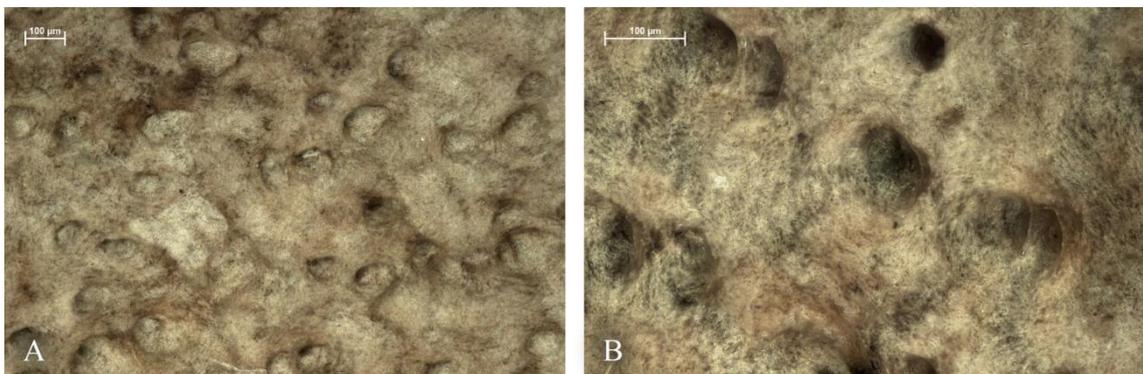
Penicillium funiculosum

Abb. 93: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* für 88 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

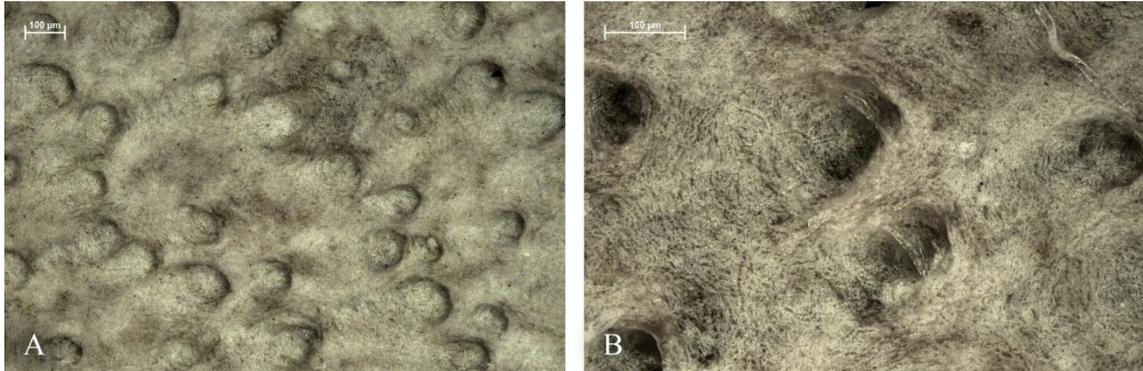
Rhizopus oryzae

Abb. 94: Mikroskopische Aufnahme der mit *Rhizopus oryzae* für 90 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

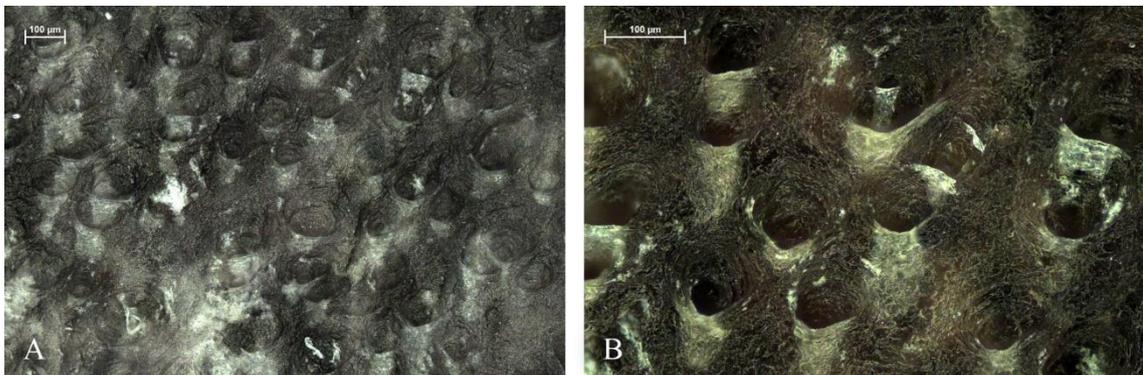
Scopulariopsis brevicaulis

Abb. 95: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* für 82 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

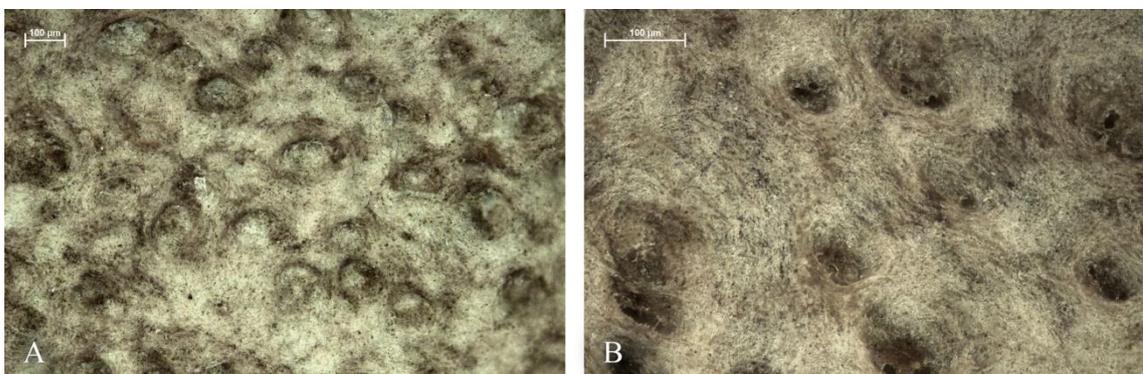
Trichoderma viride

Abb. 96: Mikroskopische Aufnahme der mit *Trichoderma viride* für 89 Tage kultivierten unterwachsenen Narbenseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung (A) und 200-facher Vergrößerung (B), MS: 100 µm

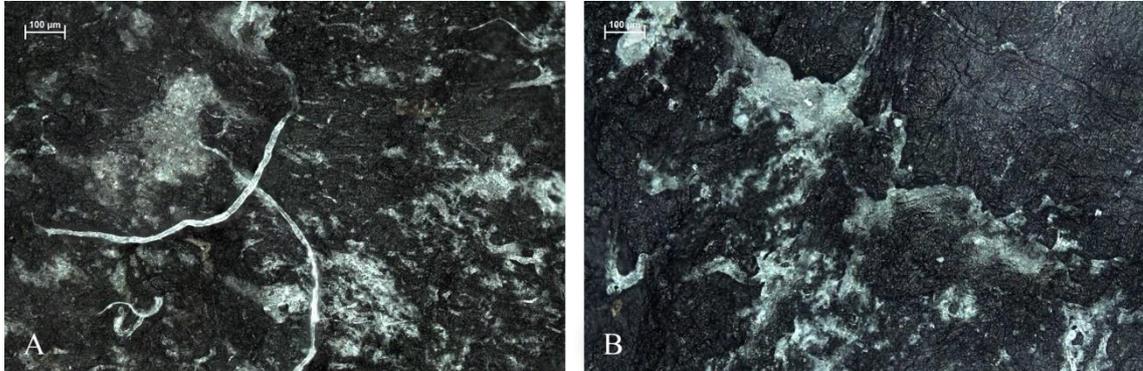
Fleischseiten aus TEGEWA-Test***Alternaria tenuissima* KDA und *Alternaria tenuissima* V-8 Juice**

Abb. 97: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) (A) für 76 Tage und *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) (B) für 76 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

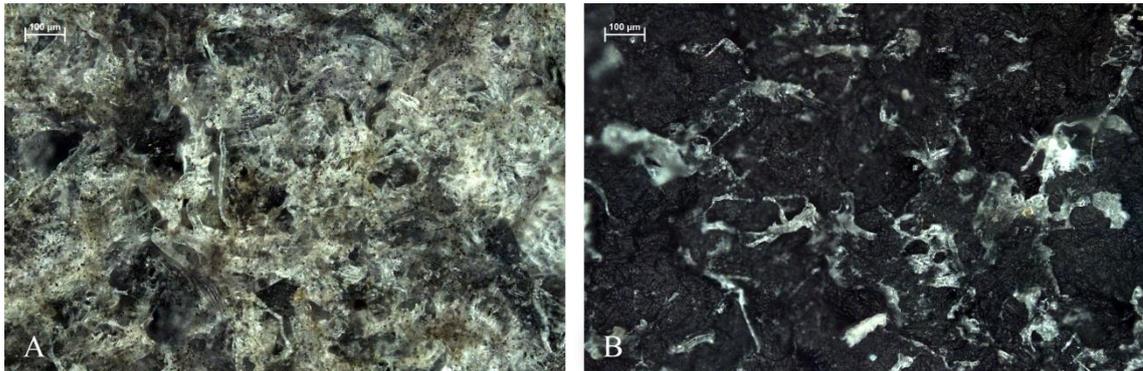
***Aspergillus niger* DSM 1957 und *Aspergillus niger* DSM 2143**

Abb. 98: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 (A) für 83 Tage und *Aspergillus niger* DSM 2143 (B) für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

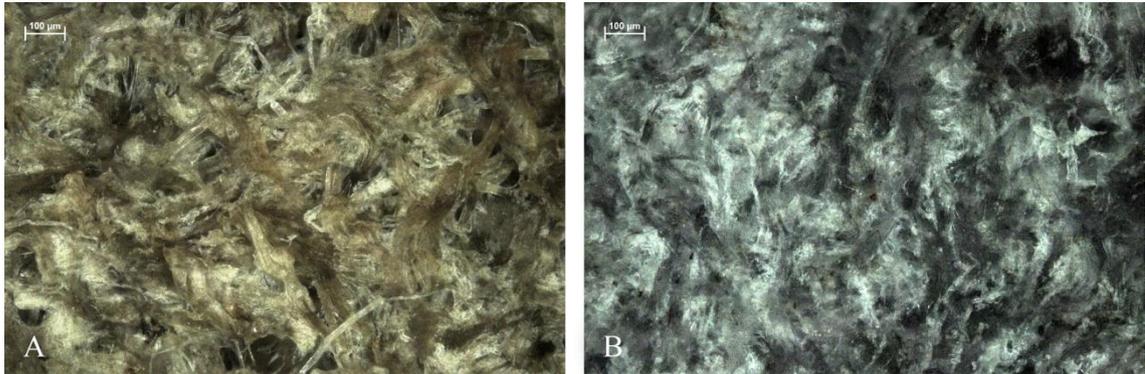
Aureobasidium pullulans und *Cladosporium cladosporioides* (*montecillanum*)

Abb. 99: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* (A) für 88 Tage und *Cladosporium cladosporioides* (B) für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

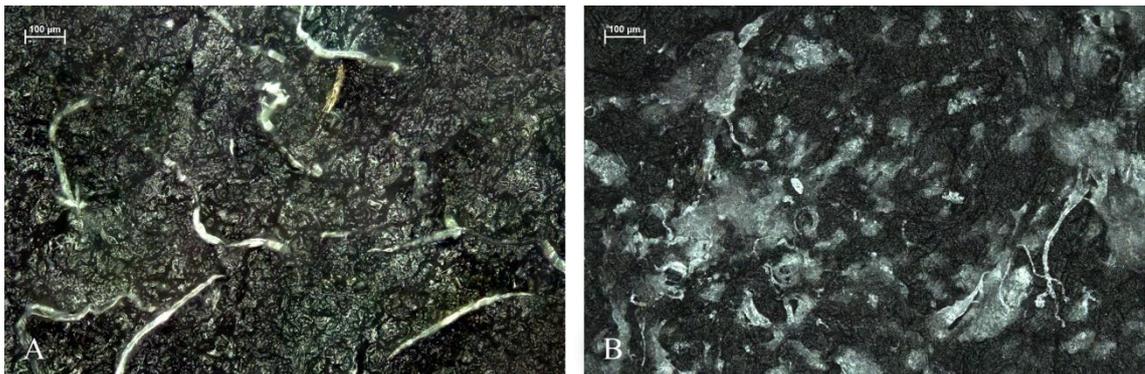
Eurotium amstelodami (= *Aspergillus hollandicus*) und *Fusarium verticillioides*

Abb. 100: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* (A) für 88 Tage und *Fusarium verticillioides* (B) für 81 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

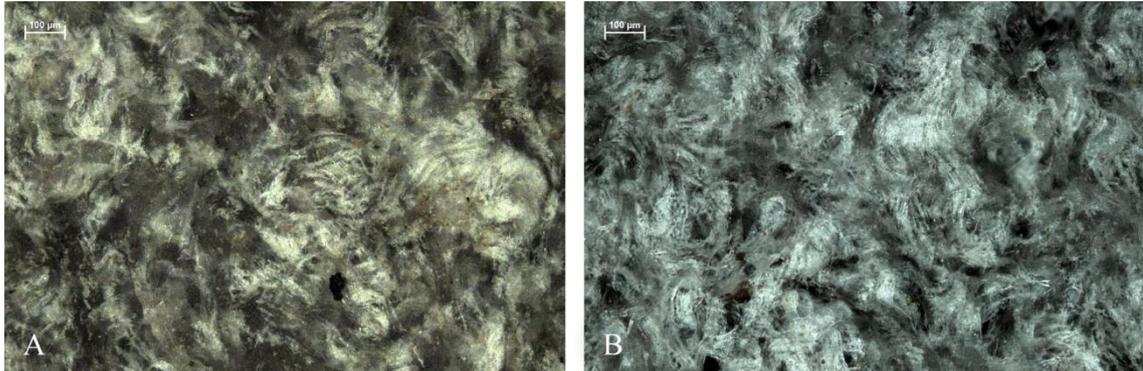
Hormoconis resiniae und *Mucor racemosus*

Abb. 101: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resiniae* (A) für 90 Tage und *Mucor racemosus* (B) für 83 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

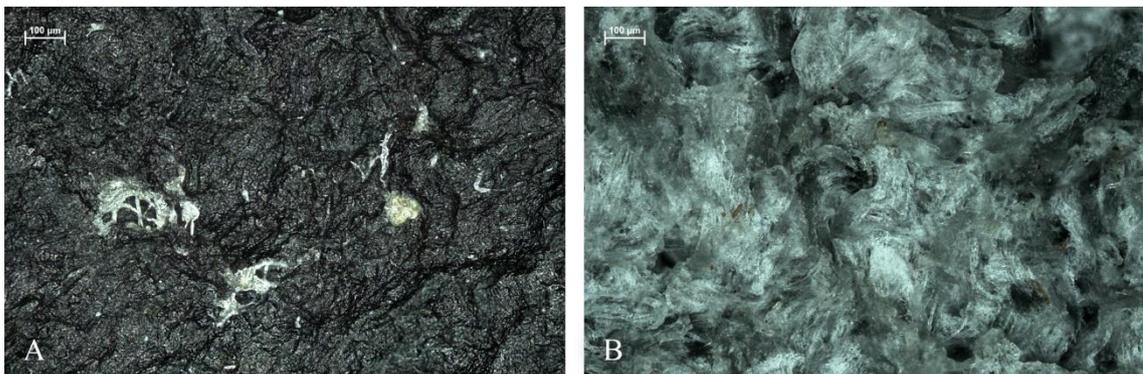
Paecilomyces variotii und *Penicillium chrysogenum*

Abb. 102: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* (A) für 81 Tage und *Penicillium chrysogenum* (B) für 82 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

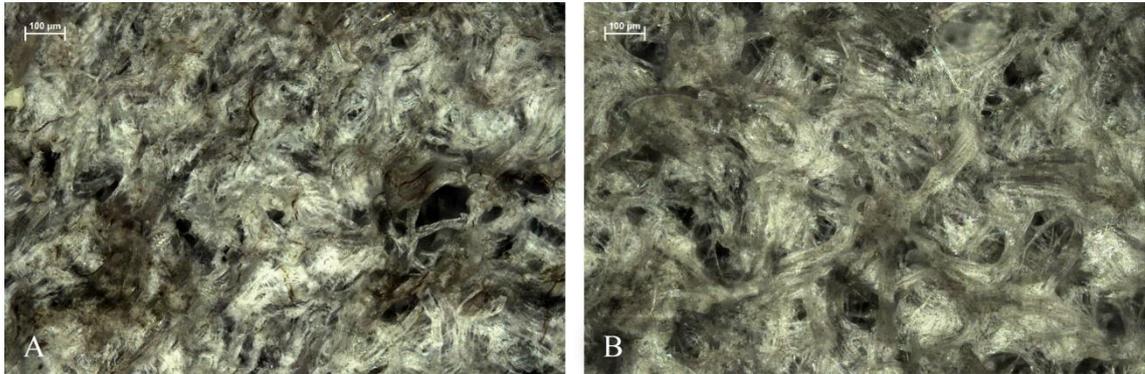
Penicillium funiculosum und *Rhizopus oryzae*

Abb. 103: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* (A) für 88 Tage und *Rhizopus oryzae* (B) für 90 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

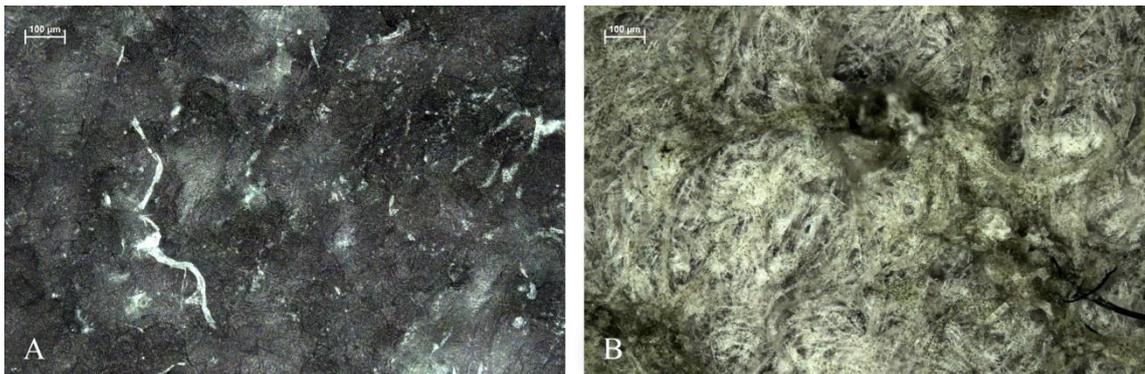
Scopulariopsis brevicaulis und *Trichoderma viride*

Abb. 104: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* (A) für 82 Tage und *Trichoderma viride* (B) für 89 Tage im TEGEWA-Test kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Mikroskopische Untersuchungen Feuchte Kammer
Fleischseiten aus Feuchte Kammer

Alternaria tenuissima KDA und *Alternaria tenuissima* V-8 Juice

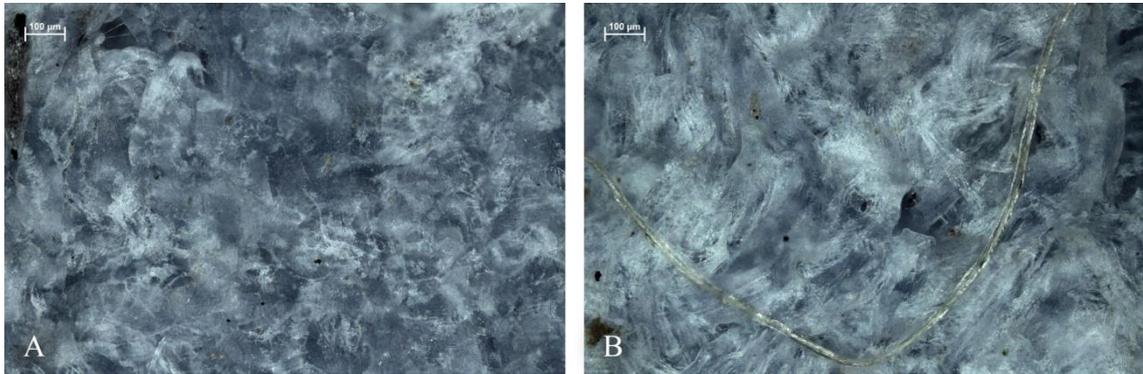


Abb. 105: Mikroskopische Aufnahme der mit *Alternaria tenuissima* (KDA) (A) für 83 Tage und *Alternaria tenuissima* (V-8 Juice) (B) für 83 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Aspergillus niger DSM 1957 und *Aspergillus niger* DSM 2143

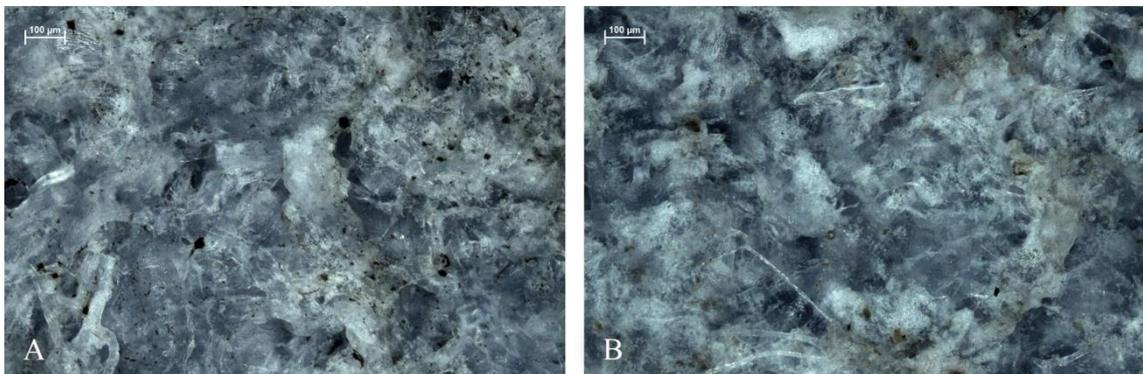


Abb. 106: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aspergillus niger* DSM 1957 (A) für 90 Tage und *Aspergillus niger* DSM 2143 (B) für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Aureobasidium pullulans und *Cladosporium cladosporioides* (*montecillanum*)

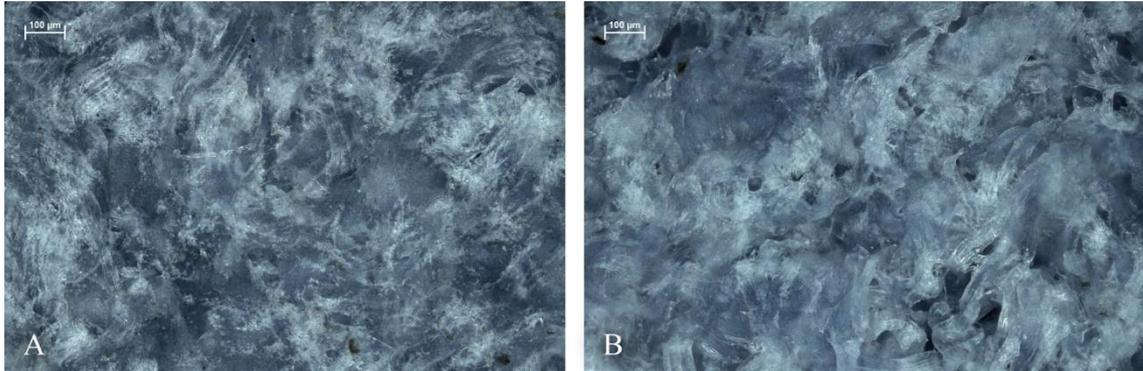


Abb. 107: Mikroskopische Aufnahme der mit *Aureobasidium pullulans* (A) für 102 Tage und *Cladosporium cladosporioides* (B) für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Eurotium amstelodami (= *Aspergillus hollandicus*) und *Fusarium verticillioides*

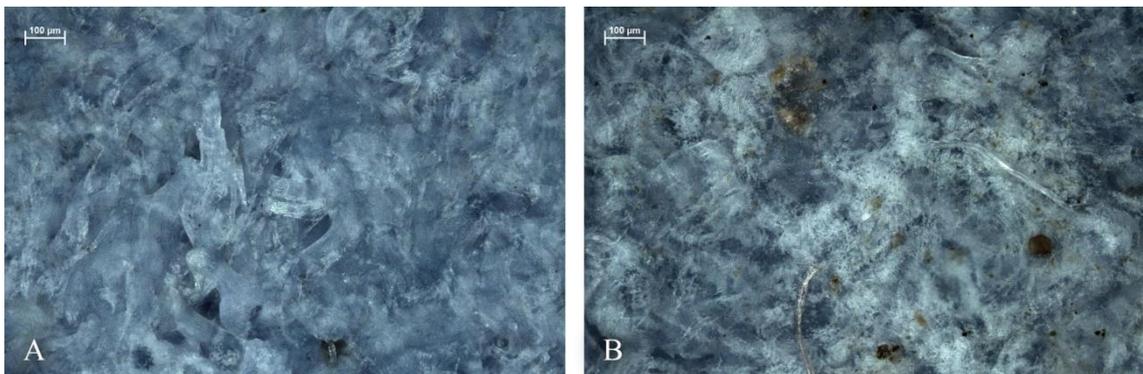


Abb. 108: Mikroskopische Aufnahme der mit *Eurotium amstelodami* (A) für 102 Tage und *Fusarium verticillioides* (B) für 92 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Hormoconis resinae und *Mucor racemosus*

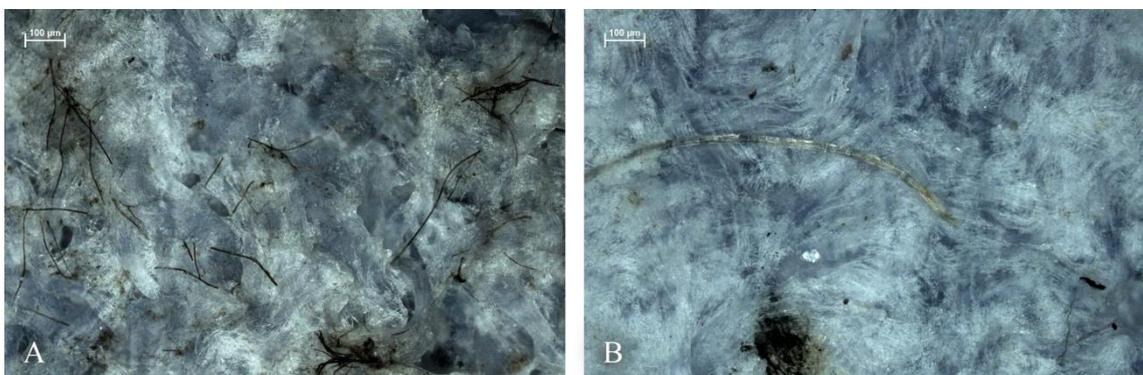


Abb. 109: Mikroskopische Aufnahme der mit *Hormoconis resinae* (A) für 104 Tage und *Mucor racemosus* (B) für 90 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

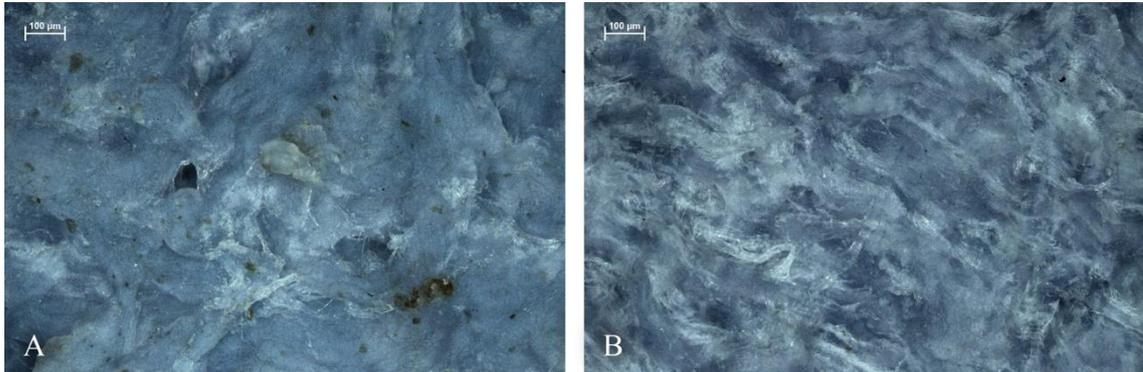
Paecilomyces variotii und *Penicillium chrysogenum*

Abb. 110: Mikroskopische Aufnahme der mit *Paecilomyces variotii* (A) für 92 Tage und *Penicillium chrysogenum* (B) für 91 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

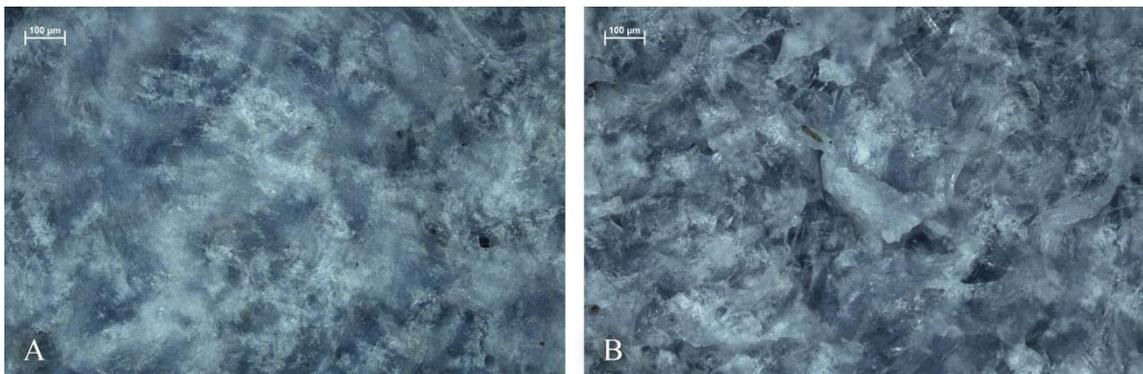
Penicillium funiculosum und *Rhizopus oryzae*

Abb. 111: Mikroskopische Aufnahme der mit *Penicillium funiculosum* (A) für 102 Tage und *Rhizopus oryzae* (B) für 104 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

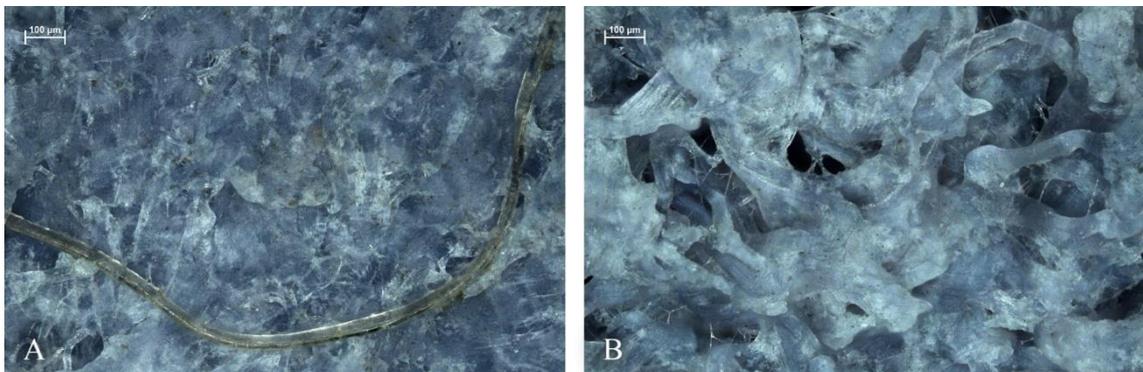
Scopulariopsis brevicaulis und *Trichoderma viride*

Abb. 112: Mikroskopische Aufnahme der mit *Scopulariopsis brevicaulis* (A) für 91 Tage und *Trichoderma viride* (B) für 103 Tage in der Feuchten Kammer kultivierten Fleischseite von Wet-Blue bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Mikroskopische Untersuchungen Tropical Chamber-Test

Fleischseiten aus Tropical Chamber

Prüfling 1 und Prüfling 2

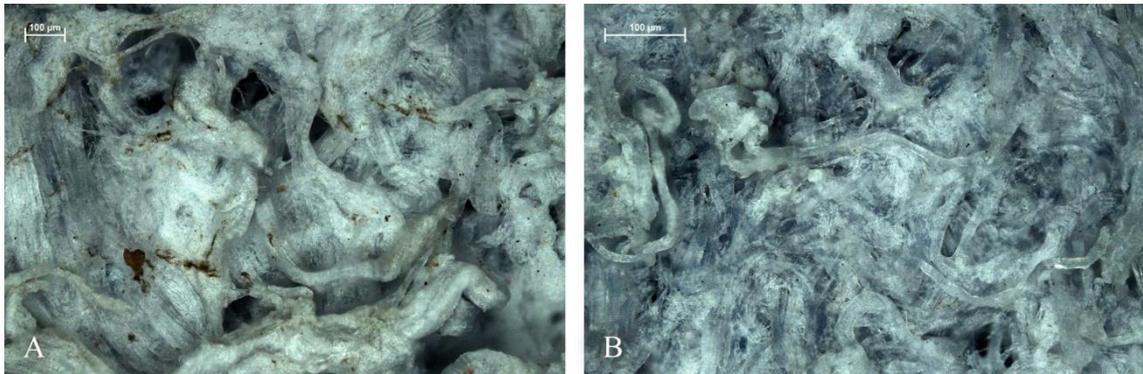


Abb. 113: Mikroskopische Aufnahme der Fleischseite Prüfling 1 (A) und Prüfling 2 (B) nach einer Kultivierung in der Tropical Chamber für 96 Tage bei 100-facher Vergrößerung, MS: 100 µm

Literaturverzeichnis

Zeitschriftenartikel:

Anand, P.; Isar, J. et al. (2006): Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*. 97(8): 1018-1025

ASTM (2010): Standard test method for evaluating the resistance of the surface of wet blue to the growth of fungi in an environmental chamber D7584 – 10: 10p

Battestin, V.; Macedo, G.A. (2007): Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10(2): 191-199

Bockmühl, D.; Weyer, C. (2006): Bekämpfung und Prävention mikrobieller Schäden an Lederoberflächen durch herkömmliche Methoden der Lederreinigung. *VDR Schriftenreihe* 2. 126-130

Bothast, R. J.; Lancaster, E. B. et al. (1975): *Scopulariopsis brevicaulis*: effect of pH and substrate on growth. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 1(1): 55-66

Brown, D. E.; Zainudeen, M. A. (1977): Growth kinetics and cellulase biosynthesis in the continuous culture of *Trichoderma viride*. *Biotechnology and bioengineering*. 19(7): 941-958

Carpetex Lederhilfsmittel GmbH; Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen gGmbH (2009): Schlußbericht: Industrielle Anwendung oxidativer Äschersysteme

Christner, J.; Eberle, R. et al. (1996): TEGEWA-Methode zur Prüfung der Schimmelpilzfestigkeit von Wet-blue. Sonderdruck aus der Fachzeitschrift *Das Leder*. 7/8

Coral, G.; Arikan, B. et al. (2002): Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. Turkish Journal of Biology. 26(4): 209-213

Dantigny, P.; Mansur, C. S. et al. (2002): Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology. 35(5): 395-398

DIN EN ISO 4048 (2008): Leder- Chemische Prüfungen- Bestimmung der in Dichlormethan löslichen Substanzen und des freien Fettsäuregehalts (ISO 4048:2008); Deutsche Fassung EN ISO 4048:2008

Flaherty, J.E.; Pirttilä, A.M. et al. (2003): *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. Applied and Environmental Microbiology. 69(9): 5222-5227

Gattner, H.; Lindner, W. et al. (1988): Mikrobieller Befall bei der Lederherstellung und seine Kontrolle mit modernen Konservierungsmitteln. Das Leder. 39(4): 66-73

Horn, W.S.; Smith, J.L. et al. (1992): Sphingofungins e and f: novel serinepalmitoyl transferase inhibitors from *Paecilomyces variotii*. The Journal of Antibiotics-Nature. 10: 1692-1696

Junqueira, L. C. U.; Bignolas, G. et al. (1979): Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochemical Journal. 11: 447-455

Kernegger, L.; Hinzmann, B. (2015): Giftiges Leder- Die Auswirkungen der Lederproduktion auf Mensch und Umwelt. INKOTA-netzwerk (Berlin) & SÜDWIND e.V. (Bonn). Infoblatt

Kleban, M. (2008): Preserving agents in the leather production process. World Leather. 21(3): 20-24

Kleinloh, W.; Katzenstein, E. et al. (2012): Mould problems on leather and leather products. *Leather International*. 213(4806): 24-26

Kumar, S.; Sharma, N. S. et al. (2005): Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*. 40(5): 1701-1705

Leathers T. D. (1986): Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(5): 1026-1030

Leppchen-Fröhlich, K. (2017): Bestimmung des Potenzials für Schimmelpilzwachstum nach PV 3970 (171440 Mario Levi Italia srl)

Magan, N.; Lacey, J. (1984): Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 82(1): 71-81

Marin, S.; Sanchis, V. et al. (1995): Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology*. 41(12): 1063-1070.

Mettler-Toledo AG (2011): Moisture Analyzer HB43-S. Lernen Sie Ihren Moisture Analyzer kennen. Bedienungsanleitung: 6

Meyer, M.; Leppchen-Fröhlich, K.; et al. (2016): Untersuchungen zum ressourcenschonenden Einsatz von antimykotischen Wirkstoffen in der Lederproduktion (BG04521/14. FILK gGmbH, Freiberg

Milala, M. A.; Shugaba, A. et al. (2005): Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 1(4): 325-328

Montes, G. S.; Junqueira, L. C. U. (1991): The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86: 1-11

Orlita, A. (2004): Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 53: 157-163

Qi, B.; Moe, W. et al. (2002): Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 58(5): 684-689

Rother, H.J. (1995): Micro-organisms: the source of the leather industry. *World Leather.* 5: 48-50

Sautour, M.; Soares Mansur, C. et al. (2002): Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 28(6): 311-315

Seifert, K. A.; Hughes, S. J. (2007): Taxonomy, nomenclature and phylogeny of three cladosporium-like hyphomycetes, *Sorocybe resinae*, *Seifertia azalea* and the *Hormoconis* anamorph of *Amorphotheca resinae*. *Studies in Mycology.* 58: 235-245

Skirdal, I. M.; Eklund, T. (1993): Microculture model studies on the effect of sorbic acid on *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Ulocladium atrum* at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology.* 74(2): 191-195

Tai, C.; Li, S. et al. (2010): Chitosan production from hemicellulose hydrolysate of corn straw: impact of degradation products on *Rhizopus oryzae* growth and chitosan fermentation. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology.* 51: 278-284

Volkman, F.; Petzold, J. D. et al. (2009): Schimmelvermeidung durch prozessspezifische Risikoanalyse (HACCP) bei Herstellung, Lagerung und Transport von

Packgut aus Leder und Verpackungen aus Wellpappe. Gemeinsamer Schlussbericht zum AiF-Forschungsvorhaben NR. 15210 BG. Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie

Volkswagen AG (2009) Konzernnorm: Bestimmung des Potenzials für Schimmelpilzwachstum PV 3970: 16p

Walker, J. D.; Cooney, J. J. (1973): Pathway of n-alkane oxidation in *Cladosporium resinae*. Journal of Bacteriology. 115(2): 635-639

Wheeler, K. A.; Hurdman, B. F. et al. (1991): Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology. 12(2-3): 141-149

Zugno, L.; Hurlow, E. et al. (2010): Fungal growth on wetblue: methods to measure impact on leather quality. XXX IULTCS Congress in Beijing

Bücher:

Berghuber, P. (2005): Skriptum zur Technologie der Lederherstellung. Höhere Bundes-Lehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie: 24-107

Coote, K.; Fernandez, K. et al. (1998): recollections caring for collections across australia, caring for cultural material 2. 2: Heritage Collections Council: 31-46

Cypionka, H. (2005): Grundlagen der Mikrobiologie. 3: Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 37-42

De Hoog, G. S.; Guarro, J. et al. (2000): Atlas of clinical fungi. 2: Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira I Virgili

Ellner, R. (2015): Milchwirtschaftliche Mikrobiologie für Ausbildung und Praxis. 4: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG Hamburg: 22

Falkiewicz-Dulik, M.; Janda, K.; Wypych, G. (2015): Handbook of Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization. 2: ChemTec Publishing, Toronto: 153

Kück, U.; Nowrousian, M. et al. (2009): Schimmelpilze Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 3: Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Pauligk, K.; Hagen, R. (1983): Lederherstellung. 2: VEB Fachbuchverlag Leipzig

Paulus, W. (2005): Directory of microbiocides for the protection of materials. 1: Springer Netherlands: 317-324

Pfleiderer, E., Reiner, R. (1988): Biotechnology: special microbial processes v. 6b (Rehm/Reed: biotechnology). 6b: VCH Verlagsgesellschaft Weinheim: 734

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009): Fungi and food spoilage. 3: Springer Dordrecht Heidelberg London New York: 11-17

Samson, R. A.; Hoekstra, E.S. et al. (2004): Introduction to food- and airborne fungi. 7: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands

Samson, R. A.; Houbraken, J. et al. (2010): Food and indoor fungi. 2: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands

Sedlbauer, K.; Krus, M. (2003): Schimmelpilz aus bauphysikalischer Sicht. Beurteilung durch a_w -Werte oder Isoplethensysteme?. Selbstverlag, München: 23-65

Singh, A.; Shahid, M. et al. (2014): Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. Virology & Mycology. 3(1)

Stather, F. (1967): Gerbereichemie und Gerbereitechnologie. 4: Akademie-Verlag Berlin

Tancous, J. J. (1986): Skin, hide and leather defects. 2: Leather Industries of America Laboratory. 2: 323-349

Quellen aus dem Internet:

URL-1 (30.04.2017) Dipl.-Ing.(FH) Paatsch, T., info@sachverstaendigenbuero-hoenge.de: *Alternaria tenuissima*. URL: <http://www.schimmelschimmelpilze.de/alternaria-tenuissima.html>

URL-2 (26.04.2017) Rausch, J.; Beuck, M. et al., www.lederzentrum.de. Gerbung. URL: <https://www.leder-info.de/index.php/Gerbung>

URL-3 (10.05.2017) Leibnitz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: *Alternaria tenuissima* (Kunze: Fries) Wiltshire URL: https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-63360.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

URL-4 (08.05.2017) Leibnitz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: *Hormoconis resinae* (Lindau) von Arx & de Vries. URL: https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-63423.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

URL-5 (08.05.2017) Dipl.-Ing.(FH) Paatsch, T., info@sachverstaendigenbuero-hoenge.de: *Penicillium chrysogenum*. URL: <http://www.schimmelschimmelpilze.de/penicillium-chrysogenum.html>

URL-6 (26.05.2017) Dr. Nagl, G.: Wachstum der Mikroorganismen. (<http://nagl.netzreport.com/index.htm>). URL: <http://nagl.netzreport.com/dokumente/fh/03fh.pdf>

URL-7 (25.05.2017) Bry-Air Organization: Leather Storage, Packaging and Shipping.
URL: <http://www.bryair.com/application/detail/leather-storage-packaging-and-shipping-1-235-109-12>

URL-8 (23.07.2017) Meinhold, U. (WeltN24 GmbH): redaktion@welt.de: Warum Pilze weder Pflanzen noch Tiere sind. URL: <https://www.welt.de/wissenschaft/article13402584/Warum-Pilze-weder-Pflanzen-noch-Tiere-sind.html>

URL-9 (19.06.2017) Schwetje, S., support@n-tv.de: Die größten Lebewesen der Welt- Rekorde zu Wasser, zu Land und in der Luft. URL: <http://www.n-tv.de/mediathek/bilderserien/wissen/Rekorde-zu-Wasser-zu-Land-und-in-der-Luft-article19423116.html>

URL-10 (26.07.2017) Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin: Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien in der EU. URL: <http://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/de/REACH/REACH.html;jsessionid=982453972D513D45DEBA81B10084853A.s2t1>

URL-11 (30.07.2017) Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin: Biozid-Verfahren. URL: <http://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/de/Biozide/Biozide.html;jsessionid=E8C19EA7844B8F7B8FE5E7777BF8D6FB.s1t2>

URL-12 (30.07.2017) Umweltbundesamt
(<http://www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien-in-der-umwelt/biozide-in-der-umwelt>.): Die neue Biozid-Verordnung-Was ist neu?. URL: http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/pdfs/biozidvo_was_ist_neu.pdf

URL-13 (30.07.2017) leather INTERNATIONAL. URL:

<http://www.leathermag.com/features/featureproblems-with-staining/>

URL-14 (01.08.2017) Memmert GmbH + Co. KG. URL:

<https://www.memmert.com/de/produkte/klimaschraenke/konstantklimakammer/#!filters=%7B%7D>

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Limbach-Oberfrohna, den 16.08.2017

Franziska Waldenburger