

Energieforschungsprogramm

Publizierbarer Endbericht

Programmsteuerung:

Klima- und Energiefonds

Programmabwicklung:

Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mbH (FFG)

Endbericht

erstellt am

31/07/2019

Verbesserter Biomasseaufschluß für die Energieträger der Zukunft – Biotreibstoffe und Biogas

Projektnummer: 848780

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Ausschreibung	1. Ausschreibung Energieforschungsprogramm
Projektstart	01/10/2015
Projektende	31/03/2019
Gesamtprojektdauer (in Monaten)	42 Monate
ProjektnehmerIn (Institution)	AIT Austrian Institute of Technology GmbH; Universität für Bodenkultur
AnsprechpartnerIn	Monika Schmoll
Postadresse	Konrad Lorenz Straße 24
Telefon	0664 88390594
Fax	
E-mail	monika.schmoll@ait.ac.at
Website	www.ait.ac.at

Verbesserter Biomasseaufschluß für die Energieträger der Zukunft – Biotreibstoffe und Biogas

FUNGI4BIOENERGY

AutorInnen:

AIT

Monika Schmoll

Markus Gorfer

Clara Pogner

BOKU

Samira Basyouni-Khamis

Alexander Bauer

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	4
2	Einleitung	5
2.1	Aufgabenstellung	8
2.2	Schwerpunkte des Projektes	9
2.3	Einordnung in das Programm	9
2.4	Verwendete Methoden	10
2.5	Aufbau der Arbeit	13
3	Inhaltliche Darstellung	14
4	Ergebnisse und Schlussfolgerungen	16
4.1	Stammverbesserung von <i>Trichoderma reesei</i> mittels Kreuzung	16
4.2	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Weißfäulepilzen	20
4.3	Analyse der synergistischen Co-Inokulierung	26
4.4	Analyse der vorhandenen Mikroorganismen auf Maispflanzen	26
5	Ausblick und Empfehlungen	34
6	Literaturverzeichnis	36
7	Kontaktdaten	38

2 Einleitung

Wenn Biomasse einen relevanten Beitrag zur Lösung unserer Energie- und Klimazukunft leisten soll, darf ihre Produktion nicht auf Kosten unserer Ökosysteme und Landschaften gehen. Der Anbau von Energiepflanzen in Monokulturen und einseitigen Fruchtfolgen wäre ein Schritt in die falsche Richtung. Eine zukunftssträchtige und nachhaltige Erzeugung von Bioenergie kann auch nicht damit verbunden sein, Wälder zu roden und komplexe Ökosysteme in intensive Agrarflächen umzuwandeln. Ziel einer nachhaltigen Ressourcennutzung muss es sein, eine hohe Lebensmittel-, Stoff- und Energieproduktion auf bereits intensiv genutzten Flächen zu erzielen und deren Böden durch standortangepasste und vielfältige Bepflanzung gesund zu erhalten.

Die bestehenden landwirtschaftlichen Flächen sollten genutzt werden, um die gesamte Palette an Nahrungs- und Futtermitteln zu erzeugen. Intelligente Nutzungssysteme ermöglichen es, auf diesen **Flächen zusätzlich Rohstoffe für die Industrie sowie organische Dünger und Energie** zu gewinnen. Dies kann erreicht werden durch den Anbau von Kulturarten, die zur Erzeugung von Lebensmitteln, Stoffen und Energie dienen, bei der die vegetativen und generativen Teile ein und derselben Pflanze als Nahrungsmittel bzw zur Erzeugung technologischer Grundstoffe dienen.

Um möglichst schonend mit den natürlichen Ressourcen umzugehen, muss als oberstes Prinzip Kreislaufwirtschaft angestrebt werden. Wird Biomasse zur Wärme- oder Stromgewinnung verbrannt, müssen die entzogenen Nährstoffe durch mineralische Düngemittel ersetzt werden. Bei der Herstellung dieser Düngemittel werden große Mengen an fossiler Energie benötigt. In einem geschlossenen Nährstoffkreislauf hingegen werden die **Nährstoffe, die dem Boden bei der Ernte entzogen wurden, wieder zurückgeführt**. Ein solcher Kreislauf ist gegeben, wenn Biomasse für die Gewinnung technologischer Grundstoffe und/oder Biogas und Bioethanol vergoren wird und der Gärrückstand als hochwertiger Nährstoff- und Humusdünger wieder auf die Felder ausgebracht wird.

Ein großes Potential liegt in der Nutzung von lignozellulosehaltiger Biomasse wie zum Beispiel Stroh, welches beim Anbau von Getreide, Ölsaaten sowie verschiedenen anderen Kulturen anfällt. Stroh wird zurzeit in der Landwirtschaft als Einstreumaterial und in ersten Ansätzen stofflich als z.B. Baumaterial eingesetzt. In Bezug auf energetische Nutzung wird Stroh derzeit hauptsächlich zur Produktion von thermischer Energie genutzt. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedenste Technologien zur energetischen und stofflichen Nutzung von Biomasse entwickelt. Einzeln betrachtet weisen diese Technologien zum Teil nicht geschlossene Stoffflüsse und somit einen Anfall von nicht verwerteten Reststoffen auf. Durch eine Kombination dieser Technologien zu so genannten „Bioraffinerie-Systemen“ ist es allerdings möglich, die bei den Prozessen anfallenden Reststoffe und Energien optimal zu nützen. „Bioraffinerie-Systeme“ sind komplexe und integrierte Systeme aus nachhaltigen, umweltfreundlichen Prozessen und Technologien, in denen Biomasse in

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

verschiedene Produkte umgewandelt sowie Energie produziert wird. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, die einzelnen Bestandteile der Biomasse optimal zu nutzen.

Die Herausforderung für diese Nutzung liegt in der Widerstandsfähigkeit des Pflanzenmaterials: Stärke als Speicherkohlehydrat kann effizient auf- und abgebaut werden, steht aber in Konflikt mit Futter- und Lebensmitteln. Im Gegensatz dazu hat lignocellulosehaltige Biomasse in der Natur die Funktion die Pflanze zu stützen und möglichst nicht abgebaut zu werden. Aus diesem Unterschied ergeben sich die wesentlichen Herausforderungen für dieses Projekt.

Abbau pflanzlicher Biomasse

Primäres Ziel der Umsetzung von pflanzlicher Biomasse ist die Gewinnung von Grundstoffen (vor allem der Glukose aus Cellulose), die in anaerober Fermentation zu Ethanol und anderen Produkten umgewandelt werden können. Das Hauptproblem des anaeroben Abbaus liegt in der Vergärung des „Ligno-Cellulose-Komplexes“ in der Biomasse und in der optimalen Versorgung der Mikroorganismen mit Nährstoffen. Um die Effizienz der biochemischen Umwandlung von lignocellulosehaltiger Biomasse zu Biokraftstoffen zu steigern, ist eine Vorbehandlung des Materials erforderlich. Durch eine Vorbehandlung kann die im Substrat vorhandene Cellulose, Hemicellulose und z.T. Lignin teilweise aufgespalten werden, wodurch die Abbaubarkeit der Substrate und die Verzuckerung der Cellulose zu Glukose ermöglicht und verbessert wird. Zudem kann durch Vorbehandlungen bei cellulosehaltigem Ausgangsmaterial die Hydrolyse der Cellulose beschleunigt und somit die Abbaugeschwindigkeit erhöht werden. Die Effizienz des Gesamtprozesses wird dadurch verbessert und damit auch die wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit von Biotreibstoffen und Biogas.

Diese Vorbehandlungstechniken können physikalisch (z.B. Scherung, Prall und Druck), chemisch (z.B. Säuren, Basen, Oxidationsmittel, organische Lösungsmittel) oder physiko-chemisch (z.B. Steam Explosion, Ammonium Recycle Perkolation, CO₂-Explosion) sein oder eine Kombination daraus. Diese Methoden sind energie- und kostenintensiv, weshalb im Sinne der Nachhaltigkeit, aber auch der Wirtschaftlichkeit, Alternativen wünschenswert sind.

Biologische Vorbehandlung mit Pilzen

Biologische Verfahren gehen – wie auch alle anderen Vorbehandlungsverfahren – von der Grundidee aus, dass das komplexe Material so vorbehandelt werden sollte, dass die widerstandsfähige chemische Struktur der pflanzlichen Biomasse aufgelöst wird. Dafür ist es vor allem notwendig, den Ligninanteil abzubauen, damit die Zugänglichkeit zu den Cellulose- und Hemicellulosebestandteilen gewährleistet wird. Hierbei ist es zusätzlich wichtig, den Aufschluss von Hemicellulose und kristallinen Bereiche in der Cellulose zu fördern ohne jedoch den Anteil fermentierbarer Abbauprodukte zu sehr zu verringern. Das heißt, die Pilze, die für den Aufschluß eingesetzt werden, sollen möglichst viel Glukose aus dem Pflanzenmaterial freisetzen, aber nur wenig davon selber als Nahrung verwerten.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Typischerweise werden Pilze, die Lignin abbauen, zu den Weißfäulepilzen gezählt, weil nach dem Abbau vom dunklen Lignin eine weiße Substanz, nämlich Cellulose, und teilweise Hemicellulose übrigbleibt. Dies steht im Gegensatz zu den Braunfäulepilzen, die bevorzugt die Cellulose und Hemicellulose abbauen, wodurch ein dunkles bis braunes Restprodukt entsteht. Es ist allerdings auch zu beachten, dass auch die Weißfäulepilze Cellulasen und Hemicellulasen produzieren – und dadurch niedermolekulare Grundstoffe freisetzen. Weißfäulepilze bauen das Lignin ab, um an die energetisch hochwertige Cellulose mit ihren Glukoseeinheiten zu gelangen. Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass durch die Vorbehandlung mit Weißfäulepilzen die Ligninzersetzung und die Menge an fermentierbarer Glukose gesteigert wird, liegt die zukünftige Herausforderung darin, Verluste an Kohlenhydraten aufgrund des Stoffwechsels der Pilze zu minimieren. Dasselbe gilt für die gesamte Prozesslaufzeit. Es ist daher eine Selektion und Optimierung der verwendeten Pilze nötig um die Effizienz zu steigern.

Trichoderma reesei ist ein lange in der Industrie verwendeter Bodenpilz aus der Gruppe der Ascomyceten, der ursprünglich im Südpazifik isoliert wurde und aufgrund seiner effizienten Enzymproduktion – vor allem Cellulose abbauender Enzyme – weltweite Bedeutung erlangt hat (Bischof et al., 2016). Vor etwa 10 Jahren wurde die Möglichkeit der Kreuzung dieses Pilzes durch die Arbeitsgruppe der Projektleiterin Dr. Schmoll entdeckt (Seidl et al., 2009). Zu diesem Zeitpunkt war *T. reesei* der erste industriell breit angewendete Pilz, für den somit eine Züchtung ähnlich wie bei Pflanzen möglich wurde. *T. reesei* hat „GRAS“ status (generally regarded as safe) und seine sichere Verwendung hat mittlerweile jahrzehntelange Tradition (Nevalainen et al., 1994). Durch seine lange Verwendung in Forschung und Industrie ist die Physiologie von *T. reesei* bestens bekannt und es ist eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden für diesen Pilz verfügbar. Erste Versuche, *Trichoderma* speizes für die Vorbehandlung von Biomasse einzusetzen, wurden von anderen Arbeitsgruppen früher bereits erfolgreich durchgeführt.

Durch die Anwendung der Kreuzung bei *T. reesei* ist es nun möglich geworden, auch Eigenschaften von anderen natürlichen Isolaten derselben Spezies und somit neue natürliche Charakteristika in den Stamm einzubringen und damit einen *T. reesei* Stamm mit maßgeschneiderten Eigenschaften für die Vorbehandlung von Biomasse – auch von verschiedenen Substraten – zu züchten, wie dies für Pflanzen schon seit jeher gemacht wird. Der wesentliche Vorteil der Kreuzung liegt darin, dass hier keine gentechnisch veränderten Organismen eingesetzt werden, die verwendeten Pilze völlig unschädlich für die Umwelt sind und sich folglich keine Entsorgungsprobleme ergeben, im Gegenteil. *Trichoderma* Arten werden als biologische Pflanzenschutzmittel eingesetzt und können das Immunsystem von Pflanzen verbessern. Allerdings ist nach den Ergebnissen des Projekts „Hygienisierung von Biogasanlagen“ der Agentur für Ernährungssicherheit (AGES; <http://www.ages.at/ages/landwirtschaftliche-sachgebiete/saat-und-pflanzgut/projekte-und-studien/verbreitungsgefahr-von-unkraeutern-und-krankheitserreger-mit-endprodukten-aus-biogasanlagen/>) eher nicht damit zu rechnen, dass nach dem Prozeß lebensfähige Mycelien von *Trichoderma* zurückbleiben.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Die Kreuzung zur Züchtung von hocheffizienten Stämmen von *Trichoderma reesei* stellt daher ein Kernziel dieses Projekts dar. Neben der Verbesserung der Pilze selber können so auch wissenschaftliche Erkenntnisse von unschätzbarem Wert für weitere Entwicklungen gewonnen werden.

Enzyme von Pilzen

In derzeitigen industriellen Prozessen werden kommerziell erhältliche Enzymmischungen nach der Vorbehandlung zur Verzuckerung zugesetzt. Die effiziente Produktion dieser Enzyme ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung, vor allem mit *Trichoderma reesei* als meist verwendetem Produktionsorganismus. Vor allem sind dabei Enzyme relevant, die Cellulose, Hemicellulose oder Lignin abbauen. Für eine effiziente biologische Vorbehandlung sind daher Pilze erforderlich, die dieses Spektrum von Materialien mit den von ihnen produzierten Enzymen angreifen können.

Die wichtigsten Enzyme für den Celluloseabbau durch *T. reesei* sind dabei Cellobiohydrolasen, Endoglucanasen und beta-Glucosidasen. Daneben produziert *T. reesei* auch noch Hemicellulasen, Pektinasen und unterstützende Faktoren, die die Abbaueffizienz erhöhen.

Weißfäulepilze bewirken einen Anstieg der hydrophilen Eigenschaften des Lignins und eine Reduktion von Inhibitoren die unter anderem durch Vorbehandlung entstehen können. Sie produzieren eine Vielzahl ligninolytischer Enzyme, die oxidative Reaktionen während der Depolymerisation katalysieren. Daneben produzieren auch sie Cellulasen und Hemicellulasen. Ligninolytische Enzyme können auf zwei Familien aufgeteilt werden: Phenol-Oxidasen [Laccase (Lac)] und Peroxidasen [Lignin Peroxidase (LiP) und Manganese Peroxidase (MnP)] (33). Der Großteil der Weißfäulepilze produziert Manganperoxidasen und Laccasen. Ein geringer Anteil produziert Lignin-Peroxidasen. Auf diese natürliche Weise können die Weißfäulepilze Lignin Polymer-Strukturen zuerst zu Monomeren und schließlich teilweise zu den Endprodukten CO₂ und H₂O abbauen. Obwohl die ligninolytischen Enzyme direkt auf die lignocellulosehaltige Biomasse angewendet werden können, ist diese Art der Anwendung nicht so effizient wie eine direkte Kultivierung der Pilze in der Biomasse.

Um die wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit bei gleichzeitiger Nachhaltigkeit von Biotreibstoffen und Biogas zu erhöhen, sind hocheffiziente Enzyme in ausreichender Menge und die Organismen, die diese Enzyme produzieren sowie wissen über deren Regulation, erforderlich.

2.1 Aufgabenstellung

Ziel dieses Projekts war es, durch ein Screening von Mikroorganismen und deren natürliche Optimierung die Vorbehandlung von cellulosehaltiger Biomasse effizienter zu gestalten und wesentlich zu vereinfachen. Dadurch sollte ein erster Schritt für eine Vorbehandlung ohne großen technologischen oder energetischen Aufwand dezentral in kleinen Anlagen gemacht werden. Besonders wichtig war es uns in diesem Projekt, dass der gesamte Prozess umweltverträglich gestaltet wird damit nicht durch die Lösung eines Problems ein anderes

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

geschaffen wird. Daher wollten wir ausschließlich Bodenpilze verwenden, die nicht als pathogen bekannt sind und keine gefährlichen Toxine produzieren. In diesem Hinblick war unser Kernziel auch, natürliche sexuelle Kreuzung zur Stammverbesserung einzusetzen anstatt die Pilze gentechnisch zu verändern. Dadurch entstehen keine Reststoffe, die nur durch energieintensive Sterilisierung einer weiteren Verwertung als Futtermittel oder Dünger zugeführt werden können. Durch die Produktion von abbauenden Enzymen durch die eingesetzten Pilze schon während der Vorbehandlung soll eine Verringerung der notwendigen Enzymmenge zur Verzuckerung nach der Vorbehandlung erreicht werden.

Durch die Unterstützung schon bisher bekannter Vorbehandlungsmethoden mit biologischer Vorbehandlung sollte eine beträchtliche Verbesserung der Umweltbilanz und der CO₂ Bilanz ermöglicht werden.

Als Modells substrat für unsere Arbeit hatten wir Maisstroh ausgewählt, da es in großer Menge anfällt und durch Entfernen des Stroh vom Feld auch die Entwicklung des Maiszünslers gebremst werden soll.

2.2 Schwerpunkte des Projektes

Im Rahmen des FUNGI4BIOENERGY-Projektes wurden zwei neue Ansätze zur Weiterentwicklung der Vorbehandlung von Biomasse mit Pilzen verfolgt: Einerseits sollten durch gezielte Veränderung und Kreuzung neue *Trichoderma*-Stämme mit optimierter Enzymproduktion und selektiver Zuckerverwertung gezüchtet werden, andererseits sollte durch Kokultivierung gemeinsam mit Weißfäulepilzen, eine weitere Optimierung der Vorbehandlung untersucht werden.

Die Möglichkeit der Kreuzung von *Trichoderma reesei* wurde erst vor kurzem entdeckt. Daher war noch nicht bekannt, welche Verbesserungen in der Enzymproduktion durch diesen natürlichen Weg überhaupt erreicht werden können und ob eine Effizienzsteigerung des Systems durch Ko-Kultivierung mit einem Lignin-abbauenden Pilz erreicht werden kann. Daher sollte vor allem für die Züchtung von *Trichoderma reesei* zur erhöhten Enzymproduktion ein Proof of principle erreicht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auch darauf, das Modells substrat zu charakterisieren um Anhaltspunkte zu gewinnen, mit welchen Herausforderungen bei biologischer Vorbehandlung (vor allem ohne vorhergehende Sterilisierung) zu rechnen ist. Dazu sollten von verschiedenen natürlichen Standorten Proben gezogen werden, und auf die Anwesenheit von Mikroorganismen und deren Eigenschaften getestet werden.

2.3 Einordnung in das Programm

Für die Erreichung der Klimaziele für 2030 und 2050, die von der österreichischen Bundesregierung gesetzt wurden um das Pariser Klimaschutzabkommen zu erfüllen sind Alternativen zur Verwendung fossiler Energieträger von besonderem Interesse und entsprechende Technologien Ziel verstärkter Forschung. Der kürzlich erschienene

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Expertenbericht des ÖAMTC (<https://www.oeamtc.at/club/oeamtc-expertenbericht-mobilitaet-klimaschutz-2030-25873728>) beschäftigte sich mit Strategien, um die Klimaziele zu erreichen. Dieser Bericht kommt zu dem Schluß, dass es entscheidend sein wird, sich nicht nur auf eine Technologie zu konzentrieren, sondern mehrere alternative Antriebstechnologien für verbesserte Nachhaltigkeit weiterzuentwickeln. Einen Teil davon stellen Biotreibstoffe dar. Vor allem der mögliche Einsatz in der schon bestehenden Fahrzeugflotte ist dabei zu sehen, aber auch die Anwendung im Langstreckentransport z. B. in Flugzeugen oder im Schiffsverkehr, wo Hybrid- oder Elektroantrieb in absehbarer Zeit nicht erreichbar sind.

Die Nutzung agrarischer Rohstoffe zur Energieproduktion steht in direkter Konkurrenz zur menschlichen Ernährung. Diese Konkurrenz spiegelt sich in der Preisentwicklung von Lebensmitteln wider. Dabei kommt es durch eine Verringerung des Angebots zu einer gewissen Preissteigerung, die jedoch durch Rohstoffspekulationen problematisch verstärkt wird. Eine nachhaltige Energieversorgung sollte also nicht allein auf Energie aus Energiepflanzen basieren, sondern auch die Verwertung von agrarischen Reststoffen beinhalten. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass aus Biomasse auch technologische Grundstoffe gewonnen werden können, die die Erzeugung aus fossilen Rohstoffen ersetzen können.

Unsere Forschung im Zuge dieses Projekts beschäftigte sich mit dem Thema „Bioenergiekonversion der nächsten Generation“ und im Speziellen mit dem Screening und zusätzlich einer nachfolgenden natürlichen Anpassung von Mikroorganismen zur Erschließung neuer Substrate aus landwirtschaftlichen und industriellen Reststoffen. Diese Reststoffe können derzeit meist aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit nicht kosteneffizient verwertet (verzuckert) werden. Daher waren neue Ansätze notwendig, um einen einfachen, dezentral realisierbaren Prozess zu ermöglichen, der weder die Umwelt noch die CO₂ Bilanz noch die Lebensmittelsicherheit beeinträchtigt. Unser Ziel, eine neuartige, biologische Vorbehandlungsmethode für pflanzliche Biomasse zu erforschen, stellt einen wichtigen Schritt zur Verbesserung der CO₂ Bilanz von Biotreibstoffen der zweiten Generation dar.

Die Ergebnisse des Projekts können einen wichtigen Beitrag zur Erfüllung der energie-, klima- und technologiepolitischen Vorgaben der österreichischen Bundesregierung leisten, insbesondere im Hinblick auf die Leistbarkeit nachhaltig produzierter Energieträger.

2.4 Verwendete Methoden

Im Rahmen dieses Projekts wurden sowohl mikrobiologische und molekularbiologische als auch chemische Methoden verwendet.

Isolierung natürlicher Pilze und Charakterisierung

Um die Nachhaltigkeit unserer entwickelten Methode zu gewährleisten, wurden natürliche Pilze aus der Umgebung (Österreich) aus Bodenproben gesammelt. Die Selektion erfolgte unter anderem durch Siebtrennung und Kultivierung auf Rose Bengal hähligem Agar in

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

verschiedenen Konzentrationen. Die erhaltenen Pilze wurden auf molekularer Basis identifiziert (Sequenzierung diagnostischer genomischer Bereiche; ITS, *tef1*).

Stammverbesserung durch Kreuzung

Die *Trichoderma* Stämme wurden nach der Untersuchung auf Kompatibilität (komplementäre Mating-Types) entsprechend miteinander gekreuzt (Schmoll, 2013). Die daraus erhaltenen Ascosporen wurden auf selektivem Agar-Medium ausgestrichen um individuelle Nachkommen zu isolieren. Diese wurden jeweils auf Cellulase und Xylanase Aktivität untersucht und basierend darauf wurden die Kreuzungspartner für die nächste Verbesserungsrunde selektiert. Insgesamt wurden 3 Kreuzungsrunden zur Verbesserung durchgeführt und jeweils ca. 400 individuelle Nachkommen getestet.

*Enzymaktivitätsanalyse von *T. reesei* im Hochdurchsatz*

Um die hohe Anzahl an Nachkommen der Kreuzungen von *T. reesei* bezüglich ihrer Enzymaktivität zu analysieren wurden die Nachkommen (3 Generationen, F1, F2, F3) in 24 well Platten in drei biologischen Replikaten, jeweils mit interner Kontrolle (*T. reesei* Referenzstämme RutC30 und QM6a) auf Cellulose angezüchtet. Dadurch sollte ein Rückschluß auf die Kapazität der Stämme für die Freisetzung von Glukose aus Pflanzenmaterial (Cellulose-Anteil), die in anschließenden Fermentation von Hefe weiterverwertet werden kann, ermöglicht werden. Die Überstände wurden auf ihre Cellulase- und Xylanaseaktivität im Überstand untersucht.

Dazu wurde eine Methode, die mit Farbreaktionen arbeitet (Mellitzer et al., 2012) für die Verwendung mit dem High throughput Equipment der Forschungseinrichtung *Bioactive Microbial Metabolites* (BiMM) etabliert und optimiert.

Eine Analyse der β -Glucosidase Aktivität und der Gesamtproteinmenge in den Überständen wird derzeit gerade durchgeführt.

Effizienzanalyse von Weißfäulepilzen

Verschiedene Farbassays wurden getestet und optimiert, um Isolate aus der AIT-eigenen Stammsammlung sowie neue Isolate zu testen. Dadurch konnten eine Reihe von potenziellen Kandidaten mit guten Ligninabbauraten identifiziert werden.

Um geeignete Weißfäulepilze für den Ligninabbau in der Biomasse zu finden wurden folgende Farbstoffe in Plattenassays getestet: Azure B, Methylenblau, Remazol Brilliant Blue R und Solvent Blue 38 (Archibald, 1992; Arora and Gill, 2001; Bandounas et al., 2011; Picart et al., 2016). Die Pilze wurden entweder auf Malzextrakt Agar (MEA) oder modifiziertem Moser Medium (Pardo et al., 2002) angezüchtet. Außerdem wurde den Medien wahlweise fein vermahlene Maisstroh oder getrocknete und vermahlene Rückstände aus der Biogasfermentation zugegeben.

Außerdem konnten durch eine Kombination eines Anreicherungsschrittes von Basidiomyceten bei der Isolierung von Bodenpilzen mit den oben beschriebenen Farbtests eine effiziente Methode zur Isolierung neuer potenzieller Kandidaten entwickelt werden.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Insgesamt wurden elf Bodenproben von Äckern, Futterwiesen, Gärten und Wäldern sowie Luftproben von Schimmelpilz-belasteten Innenräumen analysiert. Die molekularbiologische Identifizierung potenzieller Kandidaten ergab neben den dominierenden Ascomyzeten für die Bodenisolate sowie den Großteil der Isolate aus den Luftproben auch einige Basidiomyzeten mit Potenzial zum Ligninabbau. Es wurde auch gezielt Myzel aus Fruchtkörpern von Totholz-bewohnenden Pilzen in Kultur genommen und getestet.

Synergistische Co-Inokulation

Eine Auswahl von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzisolaten wurde zur Vorbehandlung von Maisstroh in einem Laborversuch getestet. Dazu wurden Inokulierungen von einigen Wochen bis zu drei Monaten mit zerkleinertem Maisstroh und kontrollierter Feuchtigkeit durchgeführt. In diesen ersten Versuchen wurde das Maisstroh einer trockenen Hitzebehandlung unterzogen, um die Konkurrenz durch am Substrat vorhandene Mikroorganismen zu mindern. Gleichzeitig waren diese Bedingungen aber auch wesentlich milder als z. B. eine Autoklavierung oder andere Vorbehandlungstechniken, die das Ergebnis verfälscht hätten. Die Zersetzung der Biomasse wurde über ein dafür optimiertes HPTLC-Verfahren (Zweckmair et al., 2016) analysiert.

Durch die lange Dauer des Experiments konnte die Optimierung der Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen nicht abgeschlossen werden und wesentliche Erhöhungen der Effizienz sind durch weitere Kombinationen und Optimierungen zu erwarten. Die entwickelten Methoden und Stämme stellen allerdings eine wertvolle Grundlage für diese Optimierung dar.

Analyse der Produktion von Sekundärmetaboliten

Es war uns sehr wichtig, dass wir durch die Verbesserung der *T. reesei* Stämme wesentliche Vorteile im Abbau von Pflanzenmaterial erreichen, dabei aber nicht unwissentlich ökologische Probleme verursachen. Daher haben wir die erzeugten Stämme nicht nur auf ihre enzymatische Leistung untersucht. Die leistungsfähigsten Stämme wurden zusätzlich auf die Produktion bekannter Mykotoxine (IFA Tulln, Screeninganalyse) untersucht (Malachova et al., 2014) um die Verbreitung problematischer Metabolite in der Natur hintanzuhalten.

Molekularbiologische Arbeiten und Omics-Analysen

Um die natürliche Besiedelung des Substrates und die enzymatische Leistung der am Substrat vorhandenen Mikroben zu charakterisieren, wurden Omics Analysen durchgeführt. Dazu wurden Proben von Maispflanzen verschiedener Standorte und Pflanzenteile an zwei Zeitpunkten (Wachstum und Kolbenreifung; Absterben der Pflanze vor der Ernte) gesammelt, Gesamtnukleinsäuren isoliert und die Qualität der Nukleinsäure bestimmt. Entscheidend war dabei, dass wir die Proben sofort an Ort und Stelle konserviert haben, um eine Verfälschung der Ergebnisse (Genregulation) durch die Reaktion der Pflanze auf die Probennahme, Temperaturveränderung oder Transport zu verhindern.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Um festzustellen, welche Organismen unter natürlichen Bedingungen auf den Maispflanzen zu finden sind, wurde die Pilz- und Bakterien-DNA der Proben mittels PCR vervielfältigt und mittels illumina MiSeq sequenziert und bioinformatisch ausgewertet.

Total RNA dieser Proben wurde eine Metatranskriptomanalyse unterzogen, um für den Abbau des natürlichen Substrats – Maisstroh – notwendige Enzyme, für deren Produktion die jeweils nötigen Gene gerade transkribiert wurden zu eruieren. Eine vollständige Auswertung der Daten zur Metatranskriptomanalyse war während der Projektlaufzeit nicht mehr möglich, ist aber in nächster Zeit gemeinsam mit dem Sequenzierdienstleister geplant.

2.5 Aufbau der Arbeit

Die Arbeit am Projekt FUNGI4BIOENERGY wurde in fünf Arbeitspaketen organisiert.

Arbeitspaket 1: Projektleitung

Dieses Arbeitspaket beschäftigte sich vorwiegend mit dem Projektmanagement, Koordination zwischen den Partnern, Projektmeetings und Organisation der Dissemination.

Arbeitspaket 2: Stammverbesserung von Trichoderma reesei

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde die Stammverbesserung von Trichoderma reesei durchgeführt. Dies beinhaltete auch die Selektion von Nachkommen aus der Kreuzung, Hochdurchsatzanalyse auf Enzymaktivitäten sowie die Analyse auf toxische Sekundärmetaboliten.

Arbeitspaket 3: Auswahl von Weißfäulepilzen

Hier wurden Weißfäulepilze aus der Natur isoliert und auch schon in der AIT Stammsammlung befindliche Pilze gescreent. Die Arbeit an diesem Paket beinhaltete auch die Verbesserung der Isolierungs- und Screeningmethoden bezüglich Ligninabbauleistung der Pilze.

Arbeitspaket 4: Vorbehandlung von Biomasse

In diesem Arbeitspaket wurde vor allem die Analyse des Effekts der Pilze auf den Aufschlußgrad des natürlichen Substrats Maisstroh durchgeführt.

Arbeitspaket 5: Molekulare Analyse

Dieses Arbeitspaket war auf die Isolierung von Nukleinsäureproben aus natürlichen Substraten (Teile von Maispflanzen verschiedener Standorte und Reifezustände der Pflanze) fokussiert. Die erhaltenen Proben wurden mittels Mikrobiom und Metatranskriptomanalyse untersucht.

3 Inhaltliche Darstellung

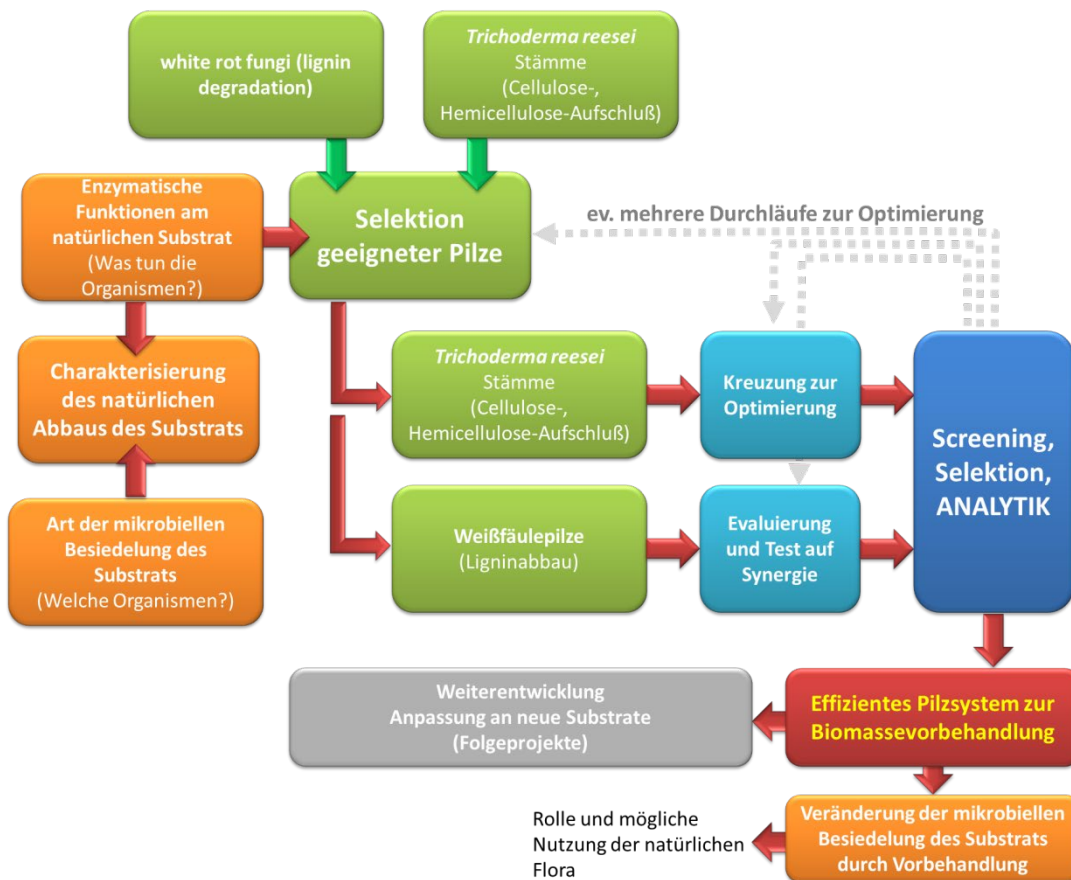


Abbildung 1 - Schematische Darstellung des Projektablaufs

Kern unseres Projektes FUNGI4BIOENERGY war die Entwicklung und Generierung von zusätzlichem Knowhow für die biologische Vorbehandlung pflanzlicher Biomasse (Abbildung 1). Obwohl ähnliche Ansätze schon früher getestet wurden, blieb die Effizienz des erreichten Biomasseaufschlusses dennoch unter den Erwartungen für eine wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit zurück.

Die Möglichkeit, einen der besten Pilze zum Abbau von Cellulose zu kreuzen und damit eine Züchtung wie bei Pflanzen zu erreichen, war allerdings bis vor kurzem nicht verfügbar. Da diese Methode durch die Projektleiterin entdeckt und seither weiter erforscht wird, erwarteten wir uns einen entscheidenden Fortschritt in der Effizienz. Anfänglich hatten wir geplant, mit vorhandenen Stämmen der Spezies *Trichoderma reesei* zu arbeiten, da ein Vorkommen dieser Spezies in Österreich nicht bekannt war. Während der Projektvorschlag allerdings in Begutachtung war, konnten wir tatsächlich 12 *Trichoderma reesei* Stämme in Österreich isolieren und charakterisieren. Daher brachten natürlich diese Stämme in das Projekt ein, wodurch die Nachhaltigkeit des Ansatzes wesentlich verbessert werden konnte. Die sexuelle Kreuzung kommt natürlich ebenso vor wie wir sie im Labor durchführen und daher ist für die von uns erzeugten Stämme keine negative Auswirkung auf die Natur oder das Mikrobiom in Österreich zu erwarten.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Als Partnerorganismus für den Abbau sollten Weißfäulepilze dienen, die als Ligninabbauer bekannt sind. Damit ergänzen sie die vorwiegende Zersetzung von Cellulose und Hemicellulose durch *Trichoderma reesei* ideal. Zusätzlich zu schon vorhandenen Kandidaten in der AIT Stammsammlung wurden weitere Stämme aus natürlichen Proben verschiedener Quellen isoliert und untersucht. Wichtig ist dabei, dass die isolierten Weißfäulepilze nicht als Pathogene bekannt sind – weder für Pflanzen noch für den Menschen. Ansonsten wäre eine Ausbringung in der Natur, wie es für eine Anwendung in der biologischen Vorbehandlung langfristig geplant ist, nicht möglich. Es bestünde das Risiko, angrenzende Baumbestände zu gefährden und im Extremfall ernste Krankheiten auszulösen. Aus demselben Grund sollten die erhaltenen *Trichoderma* Stämme auf ihre eventuelle Produktion von Mykotoxinen untersucht werden. Generell ist *Trichoderma reesei*, der schon lang in der Industrie und auch für Lebensmittelzusatzstoffe verwendet wird, nicht als Mykotoxinproduzent bekannt (Frisvad et al., 2018). Da jedoch die Forschung zu diesem Thema im wesentlichen auf dem einen Isolat, dessen Nachkommen heute in Industrie und Forschung verwendet werden, beschränkt ist, bestand durch die natürlichen Stämme ein Restrisiko, das wir ausschließen wollten. Gleichzeitig wollten wir aber auch das Potential für die Produktion neuer, eventuell pharmazeutisch interessanter Metaboliten ausloten.

Die jeweils besten Stämme aus der Züchtung von *Trichoderma reesei* und der Selektion von Weißfäulepilzen sollten kombiniert werden um einen effizienten Aufschluß zu erreichen. Dafür war es wiederum wichtig, dass die ausgewählten Pilze auch gemeinsam wachsen konnten und sich nicht gegenseitig beeinträchtigen würden. Auch diese Interaktion wurde untersucht und Kombinationen ausgewählt, die eine mögliche Koexistenz zeigten.

Als übergeordnetes Thema sollte auch untersucht werden, welche Organismen allgemein auf Maispflanzen vorkommen und welche Gene diese beim Wachstum auf diesem Substrat exprimieren. Damit sollte auch ein Hintergrund geschaffen werden um einschätzen zu können, welcher Konkurrenz unsere verbesserten Pilze in der natürlichen Umgebung und schließlich bei der Anwendung ausgesetzt sein würden. Außerdem sollten damit auch Hinweise auf Enzymaktivitäten gewonnen werden, die bei der Besiedelung und schließlich beim Abbau von Maispflanzen und dem daraus entstehenden Maisstroh besonders relevant sind. Um diese Ziele zu erreichen wurden eine Mikrobiomanalyse und eine Metatranskriptomanalyse durchgeführt.

4 Ergebnisse und Schlussfolgerungen

4.1 Stammverbesserung von *Trichoderma reesei* mittels Kreuzung

Der für die biologische Vorbehandlung wichtige Abbau von cellulosehaltigem Pflanzenmaterial zu Glukose wird wesentlich von der Enzymaktivität bezüglich Cellulasen aber auch Xylanasen beeinflusst. Um den Abbau dieses Materials zu optimieren, sollten die neu isolierten *Trichoderma reesei* Stämme durch Kreuzung und Selektion auf erhöhte Enzymaktivität verbessert bzw. gezüchtet werden.

Strategie zur Kreuzung und Stammauswahl

Basierend auf den 12 isolierten und beschriebenen *Trichoderma reesei* Stämmen wurden durch induzierte sexuelle Reproduktion (Kreuzung) in Summe über 1200 unterschiedliche Nachkommen analysiert. Durch die Selektion auf reduzierte Glukose- und vorwiegender Xylanverwertung konnten 400 F1, 470 F2 und 360 F3 Nachkommen erzeugt werden (siehe Abbildung 2).

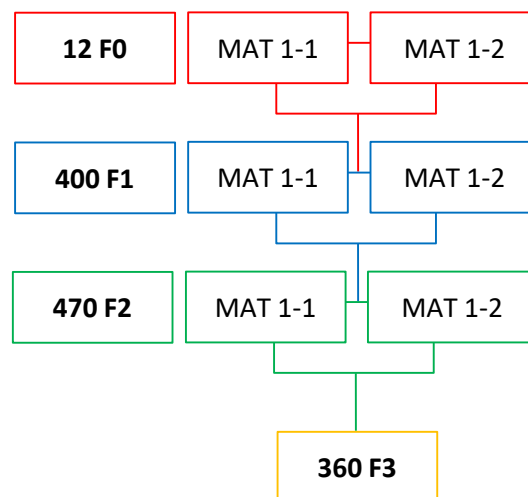


Abbildung 2: Generationenbaum von den 12 isolierten *Trichoderma reesei* zu den herangezüchteten F1, F2 und F3 Generationen. Die F3 Generation ist aus drei aufeinanderfolgenden Kreuzungen der jeweils am besten produzierenden Stämme der vorherigen Generationen entstanden. Dabei wurden aus den jeweils besten Enzymproduzenten kompatible Stämme (mit komplementären Mating types – MAT1-1 und MAT1-2) ausgewählt für die nächste Kreuzung.

All diese Nachkommen wurden auf ihre enzymatischen Aktivitäten mittels einer Hochdurchsatz-Methode untersucht und die Nachkommen zur weiteren Züchtung verwendet, die hohe Enzymaktivitäten zeigen. Hierfür wurden die besagten Stämme erneut auf Platten angezüchtet, ihre DNA isoliert und ihre Mating-Typen mittels PCR bestimmt. Passende Exemplare wurden dann zur Kreuzung verwendet (Abbildung 2).

Einerseits durch die Möglichkeit der sexuellen Reproduktion von *Trichoderma reesei*, andererseits durch eine strikte Selektionsmethode, konnte auf einem der Natur sehr nahen,

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Weg eine Stammverbesserung durchgeführt werden, ohne einen gezielten Eingriff in das natürliche Genom vorzunehmen. Die erhaltenen Stämme sind daher keine GVO (genetisch veränderte Organismen) und können daher in die Natur ausgebracht werden.

Enzymatische Analyse im Hochdurchsatz

Ausgehend von der von Mellitzer et al in 2011 publizierten Methode zur Detektion von reduzierenden Zuckern im Hochdurchsatz, konnten wir die Messung der enzymatischen Aktivität in den Überständen unserer Pilzstämme analysieren. Hierfür wurden die zu untersuchenden Stämme in 24 Well Platten unter Schütteln angezüchtet und der Überstand nach 72h Stunden Wachstum untersucht.

Es wurden immer 28 unterschiedliche österreichische *Trichoderma reesei* Stämme, QM6a (als Wildtyp Kontrollstamm) und RUTC30 (ein bereits durch Zufallsmutagenese verbesserter Stamm) in 4 24 Well Platten verwendet. Alle Versuche wurden mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die 10^5 CFU der Pilze wurden in 2mL flüssigen Minimalmedium (MA + 1% Cellulose) für 72h in Dunkelheit (die Platten wurden mit Aluminiumfolie umwickelt) unter Schütteln (200RPM) in einem Orbitalschüttler bei 28°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das gebildete Myzel mit einer Pinzette entfernt und die Überstände mit Hilfe der Pipettierroboter in eine 96 Well Platte überführt.

Um die enzymatische Aktivität zu messen, wurden 20µL der Überstände, wenn nötig auch in verdünnter Form gemessen. Diese Methode wurde auch für Überstände verwendet, die aus Anzuchten in einem größerem Maßstab stammen (100mL Kolben). Um entsprechende Vergleichswerte zu bekommen.

Ergebnisse für ausgewählte *Trichoderma reesei* Stämme der F0 bis F3 Generationen sind in Abbildung 3 angeführt. Generell konnten wir feststellen, dass durch die Kreuzung die Enzymaktivitäten in den Nachkommen unter sonst gleichen Bedingungen erheblich schwanken. Es ist daher anzunehmen, dass die Fähigkeit zum Abbau von pflanzlicher Biomasse in der Evolution sehr wichtig ist und deshalb auch Gegenstand der Rekombination wird. Wir konnten auch beobachten, dass eine sehr effiziente Cellulaseproduktion in den beiden gekreuzten Stämmen nicht notwendigerweise zu einer weiteren Verbesserung in allen Nachkommen führte. Auch eine Verringerung in manchen Nachkommen kam vor.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

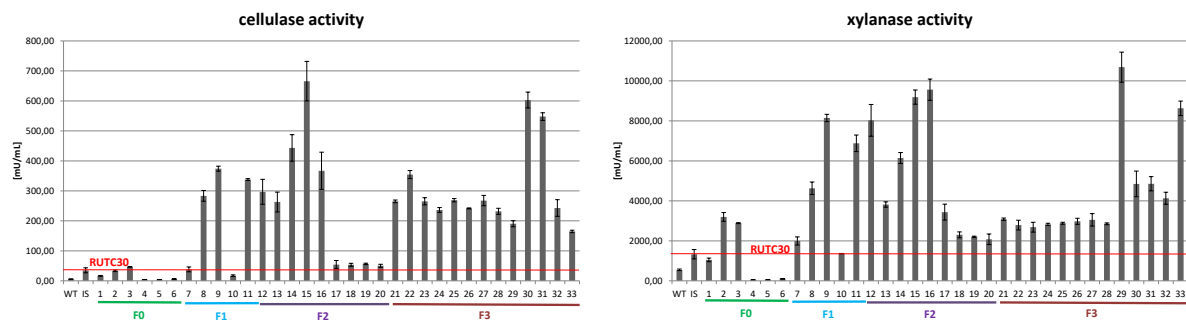


Abbildung 3: ausgewählte *Trichoderma reesei* Stämme der F0 bis F3 Generationen. Im Vergleich zu QM6a und RUTC30 konnten ähnliche und auch wesentlich erhöhte Cellulase bzw Xylanase Aktivitäten erzielt werden.

Um die Effizienz unserer Naturisolate von *Trichoderma reesei* sowie die Relevanz der erzielten Verbesserungen einschätzen zu können, verwendeten wir zwei häufig verwendete *T. reesei* Stämme als Benchmarks. QM6a ist der ursprünglich im Südpazifik isolierte Wildstamm auf den fast alle derzeit in der Forschung und in der Industrie verwendeten Stämme zurückgehen. Das Genom von QM6a ist vollständig sequenziert und die Regulation der Enzymproduktion dieses Pilzes ist sehr gut erforscht (Schmoll et al., 2016). Durch seine sehr hohe Enzymproduktion war QM6a schon relativ kurz nach seiner Entdeckung Gegenstand von Stammverbesserungsprogrammen durch Zufallsmutagenese. Ein Ergebnis dieser Programme ist RutC30 (Peterson and Nevalainen, 2012), dessen Genom beträchtlich verändert ist und der schon wesentlich mehr Cellulasen produziert als QM6a. RutC30 gilt aufgrund seiner hohen Produktion auch als Vorläuferstamm vieler industrieller Produktionsstämme, die weiter verbessert wurden. Da diese Industriestämme als Benchmark nicht erhältlich sind, verwendeten wir zusätzlich zu QM6a auch RutC30 als Benchmark.

Im Vergleich mit unseren Naturisolaten zeigte sich schon, dass diese eine erfreulich gute Enzymproduktion aufwiesen und zum Teil sogar an RutC30 herankamen. Durch die Kreuzungen konnten wir die Stämme noch weiter verbessern so daß wir mehrere Stämme erhalten konnten, die ein Vielfaches des bereits sehr effizienten RutC30 produzieren. Diese Stämme sind daher nicht nur für die geplante Verwendung zur biologischen Vorbehandlung, sondern auch generell im Hinblick auf die industrielle Verwendung wertvoll.

Analyse der Sekundärmetabolitenproduktion der verbesserten Stämme

Ausgewählte Stämme wurden einer Analyse auf die Produktion von Mykotoxinen unterworfen.

Ein erstes screening einiger Nachkommen im Vergleich zu dem Wildtyp QM6a mittels HPTLC (high performance thin layer chromatography) wurde durchgeführt um das Ausmaß möglicher Veränderungen der Sekundärmetabolitenpatterns durch die Kreuzung einschätzen zu können. Hierfür wurden die ausgewählten Pilze wie oben beschrieben in 100mL MA+1%

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

(w/v) Cellulose für 96h bei 28°C inkubiert. Die Sekundärmetabolite wurden mittels Aceton und Chloroform extrahiert und entsprechend der gebildeten Biomasse aufgetragen.

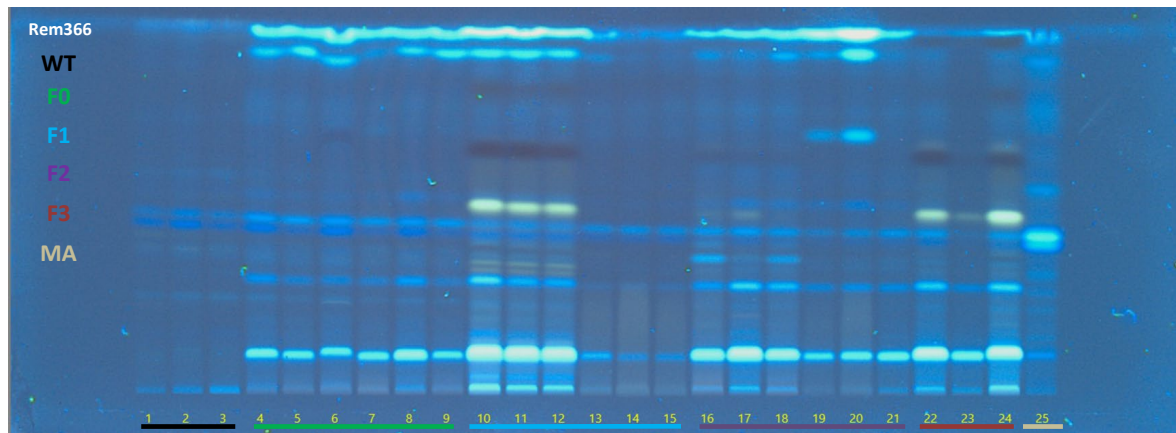


Abbildung 4: HPTLC Messung von ausgewählten *Trichoderma reesei* Stämmen und der Wildtypkontrolle QM6a (WT, 1,2,3). Es wurden Vertreter aller Generationen analysiert. Spur 25: Extrahiertes Minimalmedium (MA) als Kontrolle des Hintergrundes, ein Set von 3 Sequenzen stellt 3 biologische Replikate eines Stammes dar (BSP.: Sequenzen 1-3: 3 Replikate des Wildtyps QM6a)

Die Analyse ergab, dass von den verschiedenen Generationen spezifische Metabolite hergestellt werden, die nicht im Wildtyp oder in anderen Generationen zu finden sind (siehe Abbildung 4).

Es sind Unterschiede im Sekundärmetabolitmuster erkennbar. Die F0 Stämme zeigen ähnliche Muster, wohingegen einer der F1 Stämme spezifische Metabolitbanden zeigt, die sonst nur im F3 Stamm zu finden sind. Im Vergleich zur Wildtypkontrolle zeigen alle *Trichoderma reesei* Stämme ausgeprägte Sekundärmetabolitmuster.

Die biologische Vorbehandlung des Pflanzenmaterials sollte zur verbesserten Freisetzung von Glukose dienen. Da Glukose aus diesem Material in weiterer Folge auch für die Erzeugung von Bioethanol durch Hefe verwendet werden soll, ist es wichtig, dass diese Organismen durch eventuelle Toxine oder Hemmstoffe die von *Trichoderma reesei* produziert werden könnten, beeinträchtigt werden. Daher haben wir auch einen Vortest auf Inhibierung derartiger Organismen durchgeführt. Extrakte einiger Stämme wurden auf ihre biologische Aktivität auf das Wachstum von Bäckerhefe getestet. Wobei festgestellt wurde, dass die extrahierten Sekundärmetabolite in diesem Versuchsaufbau keinen Effekt auf das Wachstum der Hefe zeigten. Vor der praktischen Anwendung wird es wichtig sein, auch den tatsächlichen Produktionsstamm des Anwenders noch zu testen.

Aufgrund der doch nicht unwesentlichen Unterschiede in der Sekundärmetabolitenproduktion im Vergleich zu QM6a im Prescreening wurden ausgewählte, gut produzierende Stämme einer genaueren Analyse unterzogen. Die Mykotoxin-Analyse wurde im Department für

Agrarbiotechnologie durchgeführt (Massenspektrometrie mit internen Standards und über 700 routinemäßig detektierten Mykotoxinen) (Malachova et al., 2014).

Die Konzentrationen der unterschiedlichen Substanzen variieren zwischen den verschiedenen Stämmen. Jedoch kann festgestellt werden, dass näher miteinander verwandte Stämme ähnliche Mengen der gleichen Substanz produzieren. Allgemein wurden die bisher schon bekannten Metabolite von *T. reesei*, Paracelsin A und B, Trichodimerol und Dihydrotrichotetronin festgestellt. Für die darüber hinaus detektierten Substanzen ist derzeit keine problematische Bioaktivität bekannt.

4.2 Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Weißfäulepilzen

Um das Lignin abbauen zu können, muss die pflanzliche Biomasse mit Weißfäulepilzen vorbehandelt werden. Dazu wurde eine Reihe von potenziellen Kandidaten aus der AIT-Stammsammlung auf ihre Eignung zur Biomassevorbehandlung getestet. Zusätzlich wurden über verschiedene Methoden neue Weißfäulepilze isoliert. In den ersten Versuchen wurde eine Reihe von Farbstoffen für Plattentests untersucht (Abbildung 5). Außerdem wurde untersucht, ob sich durch die Zugabe von Maisstroh bzw. Lignin-haltigen Rückständen aus der Biogasfermentation zum Medium die Expression der Peroxidasen zusätzlich induzieren lässt. Klärhofbildung und damit der Abbau des Farbstoffes durch Peroxidasen war bei den Farbstoffen Remazol Brilliant Blue R und Solvent Blue 38 besonders deutlich zu erkennen, weshalb diese auch für die weiteren Experimente verwendet wurden. Die Zugabe von Maisstroh oder von ligninhaltigen Rückständen konnte für einige Isolate das Wachstum deutlich verbessern. Damit war auch oft eine verstärkte Klärhofbildung verbunden. Allerdings war der Klärhof oft schwerer zu erkennen, da die Zugabe der Pflanzenrückstände zu einer Trübung des Mediums führt. Es wurde darauf also in weiteren Experimenten teilweise verzichtet.

Mit dem optimierten Assay wurden Kandidaten aus der AIT-eigenen Stammsammlung auf ihr Potenzial zum Abbau von Lignin getestet (Tabelle 1). Die Auswahl erfolgte aufgrund phylogenetischer Kriterien, das heißt aufgrund der Zugehörigkeit von Pilzen zu Taxa mit beschriebenen Weißfäulepilzen (Binder and Hibbett, 2006; Binder et al., 2013; Hibbett, 2006; Hibbett and Donoghue, 2001; Larsson et al., 2006; Riley et al., 2014; Thorn et al., 2000). In einer ersten Runde wurde ein Teil der Pilze mit beiden Farbstoffen – Remazol Brilliant Blue R (RBBR) und Solvent Blue 38 (SB38) – getestet. Da es keine deutlichen Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den beiden Farbstoffen gab, wurden alle weiteren Tests nur mehr auf RBBR durchgeführt. Typische Krankheitserreger wie *Laetisaria fuciformis* und *Fomitiporia mediterranea* waren zwar unter unseren Isolaten, wurden mangels Anwendbarkeit aber nicht getestet.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

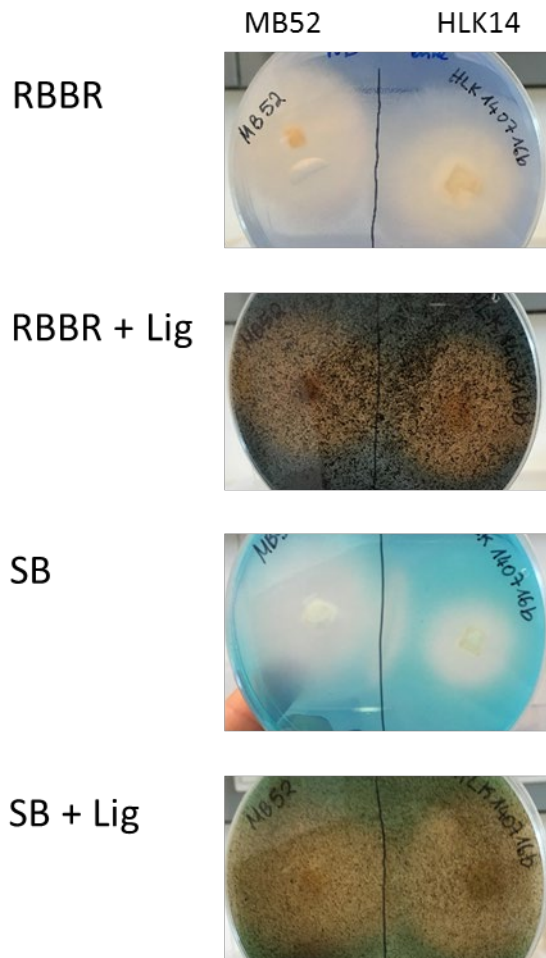


Abbildung 5: Plattentest für Ligninabbau

Die beiden Weißfäulepilze *Trametes versicolor* (Schmetterlingstramete) MB52 und *Irpex lacteus* (Michweißer Eggenpilz) HLK140716b wurden auf Moser-Medium, dem die Farbstoffe Remazol Brilliant Blue R (RBBR) bzw. Solvent Blue 38 (SB) sowie ligninhaltige Rückstände aus der Biogasfermentation (Lig) zugegeben wurden, inokuliert und die Platten anschließend fünf Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Halobildung infolge des Abbaus der Farbstoffe durch Peroxidasen ist deutlich erkennbar. Das Pilzwachstum und damit die Halobildung konnten durch die Zugabe von ligninhaltigen Rückständen verstärkt werden, jedoch war dann durch die Trübung des Mediums die Halobildung schlechter zu erkennen.

Mit ausgewählten Kandidaten wurden Wachstumstests auf zerkleinertem Maisstroh durchgeführt. Bestes Wachstum wurde für *Bjerkandera adusta* und *Irpex lacteus* beobachtet (siehe Abbildung 6), wobei letzterer auch auf groben Maisstroh, das nach der Zerkleinerung auf eine Größe > 2 mm gesiebt wurde, gutes Wachstum zeigt. Es wird angenommen, dass die feinste Fraktion (< 1mm) reicher an Cellulose und Hemicellulose ist, während sich in der größeren Fraktion die ligninhaltigen Bestandteile anreichern.

Des weiteren wurden Weißfäulepilze in Konfrontationsassays gegen zwei Stämme von *Trichoderma reesei* getestet. In diesen Tests konnte keine nennenswerte gegenseitige Wachstumsinhibition festgestellt werden (Abbildung 7). Auch werden die Weißfäulepilze erst nach längerer Inkubation von *T. reesei* überwachsen (nicht gezeigt).

Ausgewählte Pilze wurden für Tests zur Vorbehandlung von Biomasse in Kombination mit optimierten *T. reesei* Stämmen herangezogen.

Tabelle 1: Weißfäulepilze aus der AIT-Stammsammlung und ihr Potenzial zum Abbau von Lignin

Code	Gattung	Art	Deutscher Name	Familie	Ordnung	Material Isolierung	RBBR ^a	SB ^b
WRF1	<i>Mycetinis</i>	<i>alliaceus</i>	Langstieliger Knoblauchswindling	Omphalotaceae	Agaricales	Fruchtk. auf Totholz	+/-	
WRF2	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	Austernseitling	Pleurotaceae	Agaricales	Fruchtkörper	++	++
WRF3	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	Austernseitling	Pleurotaceae	Agaricales	Fruchtkörper	+	+
WRF4	<i>Coprinopsis</i>	<i>sp.</i>	Tintling	Psathyrellaceae	Agaricales	unbek.	+/-	
WRF5	<i>Coprinopsis</i>	<i>strossmayeri</i>	Perlhuhn-Tintling	Psathyrellaceae	Agaricales	unbek.	+/-	
WRF6	<i>Athelia</i>	<i>turficola</i>	Torfhäutchenpilz	Atheliaceae	Atheliales	Gärtnersubstrat	-	
WRF7	<i>Athelia</i>	<i>turficola</i>	Torfhäutchenpilz	Atheliaceae	Atheliales	Gärtnersubstrat	-	
WRF8	<i>Athelia</i>	<i>turficola</i>	Torfhäutchenpilz	Atheliaceae	Atheliales	Gärtnersubstrat	-	
WRF9	<i>Athelia</i>	<i>turficola</i>	Torfhäutchenpilz	Atheliaceae	Atheliales	Gärtnersubstrat	-	
WRF10	<i>Sistotrema</i>	<i>brinkmannii</i>	Brinkmanns Schütterzahn	Hydnaceae	Cantharellales	Luft	+/-	
WRF11	<i>Sistotrema</i>	<i>brinkmannii</i>	Brinkmanns Schütterzahn	Hydnaceae	Cantharellales	Luft	+/-	
WRF12	<i>Sistotrema</i>	<i>brinkmannii</i>	Brinkmanns Schütterzahn	Hydnaceae	Cantharellales	Luft	+/-	
WRF13	<i>Sistotrema</i>	<i>coronilla</i>	Schütterzahn	Hydnaceae	Cantharellales	Luft	+/-	
WRF14	<i>Sistotrema</i>	<i>coronilla</i>	Schütterzahn	Hydnaceae	Cantharellales	Luft	+/-	
WRF15	<i>Sistotrema</i>	<i>sp.</i>	Schütterzahn	Hydnaceae	Cantharellales	Bauholz	+/-	
WRF16	<i>Laetisaria</i>	<i>fuciformis</i>	Verursacher der Gräser-Rotspitzigkeit	Corticiaceae	Corticiales	Gras	n.d.	
WRF17	<i>Fomitiporia</i>	<i>mediterranea</i>	Mittelmeer-Feuerschwamm	Hymenochaetaceae	Hymenochaetales	Weinstock	n.d.	
WRF18	<i>Fomitiporia</i>	<i>mediterranea</i>	Mittelmeer-Feuerschwamm	Hymenochaetaceae	Hymenochaetales	Weinstock	n.d.	
WRF19	<i>Fomitiporia</i>	<i>mediterranea</i>	Mittelmeer-Feuerschwamm	Hymenochaetaceae	Hymenochaetales	Weinstock	n.d.	
WRF20	<i>Pappia</i>	<i>fissilis</i>	Apfelbaum-Saftporling	Meruliaceae	Polyporales	Luft	++	++
WRF21	<i>Phlebia</i>	<i>radiata</i>	Orangeroter Kammpilz	Meruliaceae	Polyporales	Luft	++	
WRF22	<i>Phanerodontia</i>	<i>chrysosporium</i>		Phanerochaetaceae	Polyporales	Kiefernholz	+	

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Fortsetzung Tabelle 1

Code	Gattung	Art	Deutscher Name	Familie	Ordnung	Material Isolierung	RBBR ^a	SB ^b
WRF23	<i>Porostereum</i>	<i>spadiceum</i>	Dattelbrauner Braunborsten-Schichtpilz	Phanerochaetaceae	Polyporales	Luft	+/-	
WRF24	<i>Fomes</i>	<i>fomentarius</i>	Zunderschwamm	Polyporaceae	Polyporales	Luft	n.d.	
WRF25	<i>Fomes</i>	<i>fomentarius</i>	Zunderschwamm	Polyporaceae	Polyporales	Boden	-	-
WRF26	<i>Fomes</i>	<i>fomentarius</i>	Zunderschwamm	Polyporaceae	Polyporales	Boden	-	-
WRF27	<i>Lenzites</i>	<i>betulinus</i>	Laubholz-Blättling	Polyporaceae	Polyporales	unbek.	+	+
WRF28	<i>Pycnoporus</i>	<i>cinnabarinus</i>	Zinnobertramete	Polyporaceae	Polyporales	Fruchtk. auf Totholz	+/-	
WRF29	<i>Trametes</i>	<i>pubescens</i>	Samtige Tramete	Polyporaceae	Polyporales	Totholz	+/-	
WRF30	<i>Trametes</i>	<i>versicolor</i>	Schmetterlingstramete	Polyporaceae	Polyporales	Luft	+++	
WRF31	<i>Trametes</i>	<i>versicolor</i>	Schmetterlingstramete	Polyporaceae	Polyporales	unbek.	+++	+++
WRF32	<i>Bjerkandera</i>	<i>adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	Meruliaceae	Russulales	Luft	+++	
WRF33	<i>Bjerkandera</i>	<i>adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	Meruliaceae	Russulales	Luft	+++	
WRF34	<i>Bjerkandera</i>	<i>adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	Meruliaceae	Russulales	Luft	+++	+++
WRF35	<i>Bjerkandera</i>	<i>adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	Meruliaceae	Russulales	Luft	+++	
WRF36	<i>Irpex</i>	<i>lacteus</i>	Michweißer Eggenpilz	Meruliaceae	Russulales	Luft	++	++
WRF37	<i>Irpex</i>	<i>lacteus</i>	Michweißer Eggenpilz	Meruliaceae	Russulales	Luft	+++	+++
WRF38	<i>Peniophora</i>	<i>cinerea/nuda</i>	Aschgrauer Zystidenrindenpilz	Peniophoraceae	Russulales	Luft	+/-	

^a: Ergebnisse des Farbstests zum Ligninabbau auf Remazol Brillant Blue R (RBBR)

^a: Ergebnisse des Farbstests zum Ligninabbau auf Solvent Blue 38 (SB38)

+++ : Halo deutlich über den Myzelrand hinaus

++ : Halo ca. gleichgroß wie Kolonie

+: Halo deutlich kleiner als Kolonie

+/-: Halo nur schwach erkennbar

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

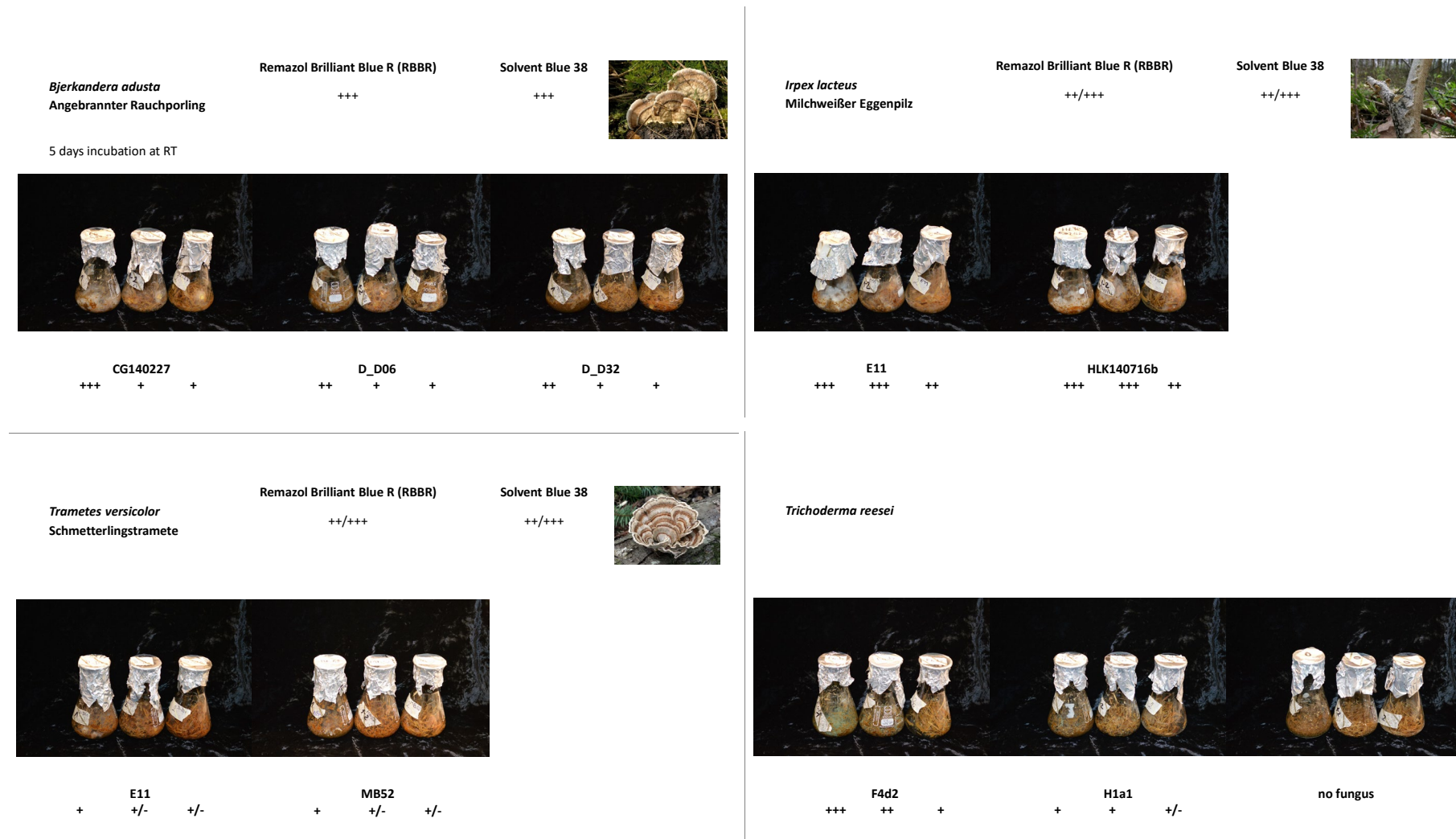
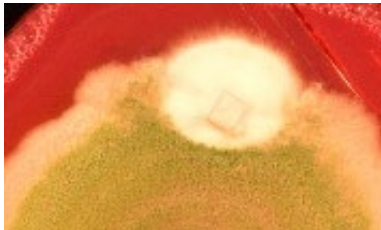


Abbildung 6: Besiedelung von Maisstroh durch Weißfäulepilze und *Trichoderma reesei*. Die Pilze *Bjerkandera adusta* (drei Stämme, links oben), *Irpex lacteus* (zwei Stämme, rechts oben), *Trametes versicolor* (drei Stämme, links unten) und *Trichoderma reesei* (drei Stämme, rechts unten) wurden jeweils auf gesiebttem Maisstroh (linker Kolben: < 1mm; mittlerer Kolben 1-2 mm; rechter Kolben: > 2mm) angeimpft und die Kolben fünf Tage bei RT inkubiert.

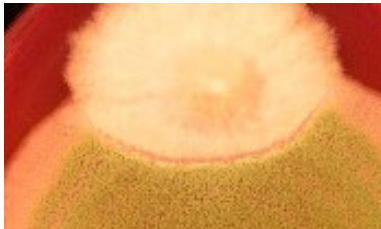
WRF31: *Trametes versicolor*



WRF30: *Trametes versicolor*



WRF32: *Bjerkandera adusta*



WRF31: *Bjerkandera adusta*



WRF36: *Irpex lacteus*



WRF37: *Irpex lacteus*

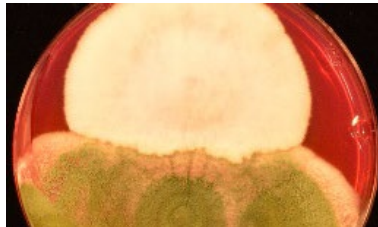


Abbildung 7: Konfrontationsassays zwischen Weißfäulepilzen und *Trichoderma reesei*. Die verschiedenen Weißfäulepilze (siehe Beschriftung über den einzelnen Bildern) wurden auf der oberen Plattenhälfte angeimpft, zwei ausgewählte *Trichoderma reesei* Stämme wurden auf der unteren Plattenhälfte angeimpft.

Neben der gezielten Isolierung von Weißfäulepilzen aus Fruchtkörpern auf Totholz (siehe Tabelle 1), wurde auch versucht aus verschiedenen Umweltproben Weißfäulepilze zu isolieren. Einerseits wurden verschiedene Bodenproben (siehe Tabelle 2) hergenommen, um über gewaschene Bodenpartikel Basidiomyceten anzureichern, andererseits wurde versucht, aus der Luft eines Weinkellers mit bekannter Kontamination durch Weißfäulepilze (Unterwurzacher et al., 2018) solche zu isolieren. Das Probenmaterial wurde dazu auf Moser-Platten mit Benomyl zur Selektion auf Basidiomyceten und RBBR zur Identifizierung ligninabbauender Pilze ausplattiert. In einigen Fällen wurden auch Tests unter Zugabe von Maisstroh oder Rückständen aus der Biogasproduktion durchgeführt. Trotz mehrerer Versuche konnte aus keiner der Proben ein Weißfäulepilz isoliert werden.

Tabelle 2: Bodenproben für Versuche zur Isolierung von Weißfäulepilzen

Probe	Ort Herkunft	Vegetation
EG1601	Raumberg-Gumpenstein, Stmk	Futterwiese
F4BAE16	NÖ	Garten
F4BT16	NÖ	Garten
M3	Absdorf/NÖ	Maisacker
M6	Bruck a.d. Leitha/NÖ	Maisacker
CAM1705_2G1_4	Molln/OÖ	Fichten-Buchen-Wald
CAM1705_2W1_3	Molln/OÖ	Fichten-Buchen-Wald
CAM1705_3W_3	Molln/OÖ	Fichten-Buchen-Wald
RD1	NÖ	Garten
MS1	NÖ	Garten
CAM1708_1W_3	Molln/OÖ	Fichten-Buchen-Wald

4.3 Analyse der synergistischen Co-Inokulierung

Nachdem die Weißfäulepilze getestet waren, wurden vier ausgewählt, die einen erhöhten Ligninabbau aufweisen um in einer Co-Inokulation erste Hinweise auf deren synergistisches Potential für die biologische Vorbehandlung zu bekommen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurde eine enzymatische Hydrolyse (nach NERL) durchgeführt um die freigesetzten Zucker analysieren zu können. Hier konnte der enzymatische Abbau durch die Pilze an sich, aber auch der dadurch verbesserte Aufschluss eines industriellen Enzymmix (Cellic CTec2, Sigma, 1000U/g) nachgewiesen werden. Es wurden Standards mit Galaktose (Gal), Glukose (Glu), Mannose (Man), Arabinose (Ara) und Xylose (Xyl) in bekannter Konzentration zum Vergleich herangezogen.

Nach 8 Wochen wurde eine Freisetzung niedermolekularer Zucker und Verbesserung des enzymatischen Abbaus festgestellt. Allerdings werden noch weitere Verbesserungen und Testen weiterer Kombinationen verschiedener Pilze notwendig sein um das System zu optimieren.

4.4 Analyse der vorhandenen Mikroorganismen auf Maispflanzen

Um die natürliche Besiedelung von Maispflanzen mit Pilzen und Bakterien zu untersuchen, wurden Proben von Blatt, Stamm, Korn und Wurzel entnommen. Die Proben wurden verarbeitet, RNA und DNA isoliert und die Qualität überprüft. Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde ein bestimmter Genabschnitt für Pilze (ITS) und Bakterien (16S) aus der DNA vervielfältigt. Die Abfolge der Basenpaare in diesem DNA Abschnitt wurde mittels Illumina MiSeq Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt. Anhand dieser Daten können die DNA Abschnitte bestimmten Arten zugeordnet und die Diversität der Proben bestimmt werden.

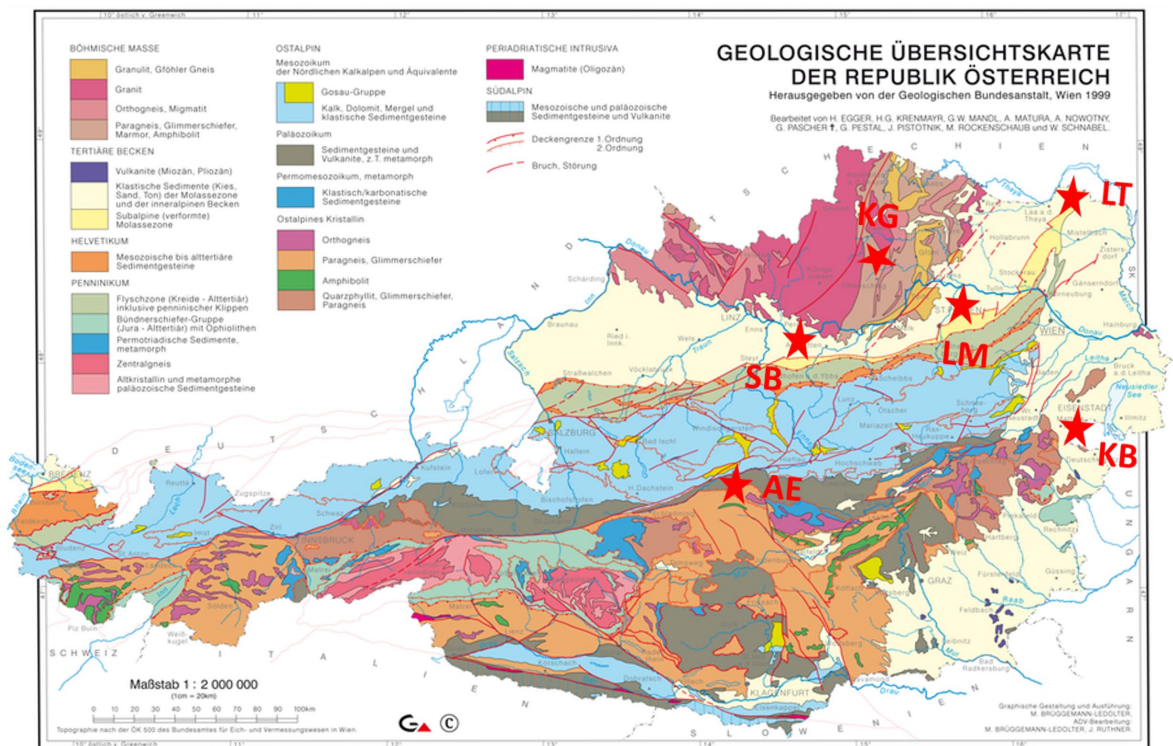
Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Neben der DNA wurde auch die RNA isoliert, diese wurde für eine Transkriptomanalyse verwendet. In dieser Analyse kann untersucht werden, welche Stoffe und Enzyme von den Mikroorganismen gebildet werden. Die Auswertung der Daten und die Vereinigung mit den Diversitätsdaten war während der Projektlaufzeit nicht mehr möglich, ist aber in nächster Zeit geplant.

Probenahme

Um die mikrobielle Flora von Maispflanzen zu erfassen wurden Anfang Sommer und Anfang Herbst 2016 Proben von Maispflanzen an sechs verschiedenen Standorten gezogen. Dabei wurden Maisäcker in Niederösterreich, im Burgenland und in der Nordsteiermark ausgewählt (siehe Abbildung 8) Von jedem Standort wurden Proben von vier Pflanzen in Duplikaten genommen.



Geologische Übersichtskarte der Republik Österreich
© Geologische Bundesanstalt



Abbildung 8: Bodenkarte mit den eingezeichnet Sammelorten; AE – Aigen im Ennstal (Steiermark), KB- Klingenbach/Zagersdorf (Burgenland), LM – Langmannersdorf (NÖ Tullnerfeld), SB – Strengberg (NÖ Mostviertel), LT – Laa an der Thaya (NÖ Weinviertel), KG – Klein Gerungs (NÖ Waldviertel)

An jedem Standort wurden zwei Maispflanzen zufällig ausgewählt und Proben von Blatt, Stamm, Wurzel und Kolben entnommen. Die Proben wurden in Reaktionsröhrchen (1,5 mL) mit Stabilisationsflüssigkeit überführt und mithilfe eines Stößels mit dieser vermengt (siehe Abbildung 9). Nur so konnte garantiert werden, dass die isolierte RNA auch repräsentativ für die Aktivität auf der Pflanze ist und nicht durch geänderte Umweltbedingungen am Transportweg oder während der Lagerung verursacht werden.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG



Abbildung 9: Vorgehensweise bei der Probennahme von verschiedenen Pflanzenteilen.

Die gewählten amplifizierten Genabschnitte sind innerhalb der Gruppe gut erhalten, die einzelnen Arten unterscheiden sich aber in der Abfolge der Basen auf dem DNA Abschnitt. Nach der Sequenzierung ist für jede Probe bekannt, welche DNA Abschnitte in welcher Zahl gefunden werden konnten. Die erhaltenen Daten wurden bioinformatisch verarbeitet und analysiert. Da es sich bei den Proben um Umweltproben handelt, sind Störfaktoren bei der Analyse meist nicht vermeidbar und so konnten für die Analyse der Pilzarten nur 86% (166) der Proben verwendet werden. In der Analyse werden die unterschiedlichen DNA Abschnitte nach ihrer Ähnlichkeit in taxonomische Einheiten (OTU) gruppiert. Es konnten 493 OTUs gefunden werden, wobei in jeder Probe zwischen 6 und 152 vorhanden waren. Die OTUs wurden mittels Datenbankabgleichen zu Gattung und Spezies zugeteilt und deren Verwandtschaft in einem Baumdiagramm dargestellt (siehe Abbildung 10).

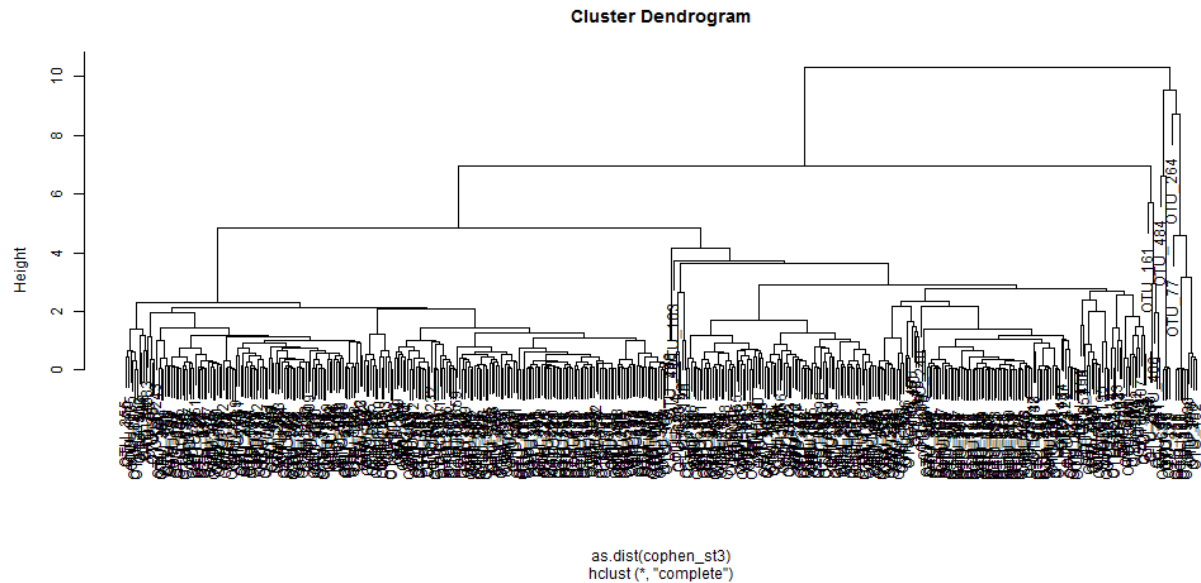


Abbildung 10: Baumdiagramm der gefundenen Pilzarten

Die Proben wurden hinsichtlich ihrer Diversität untersucht. Dabei wird ein Index errechnet der ein Maß für die Diversität darstellt, Simpsons Index (D). In dieser Berechnung wird die Wahrscheinlichkeit verglichen ob zwei MiSeq reads der gleichen OTU angehören. Je höher die Diversität desto höher der Index $1/D$. Abbildung 11 zeigt den Simpsons Index für die Proben der verschiedenen Pflanzenteile.

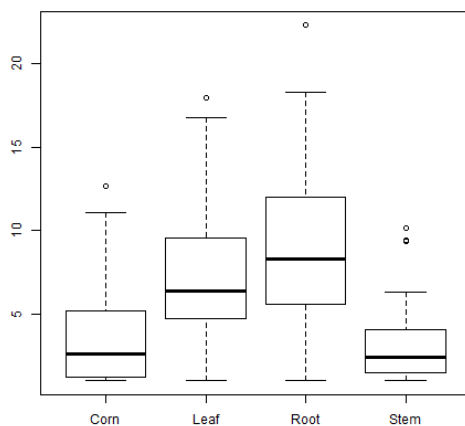


Abbildung 4: Simpsons Diversität als $1/D$ für die Pflanzenteile Korn, Blatt, Wurzel und Stamm

Eine andere Betrachtungsweise ist der Vergleich der Zusammensetzung der Arten der Proben untereinander. Dafür werden die Proben im Raum dargestellt, die Entfernung zueinander eingezeichnet und Unterschiede zwischen den Probenarten (Pflanzenteil (Abbildung A), Sammelort (Abbildung B), Reifegrad (Abbildung C)) durch Kreise dargestellt. Die Wurzelproben unterscheiden sich dabei deutlich von den Proben von Blatt, Stamm und Korn. Die Sammelorte und Reifegrade zeigen hingegen wenig Unterschiede.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

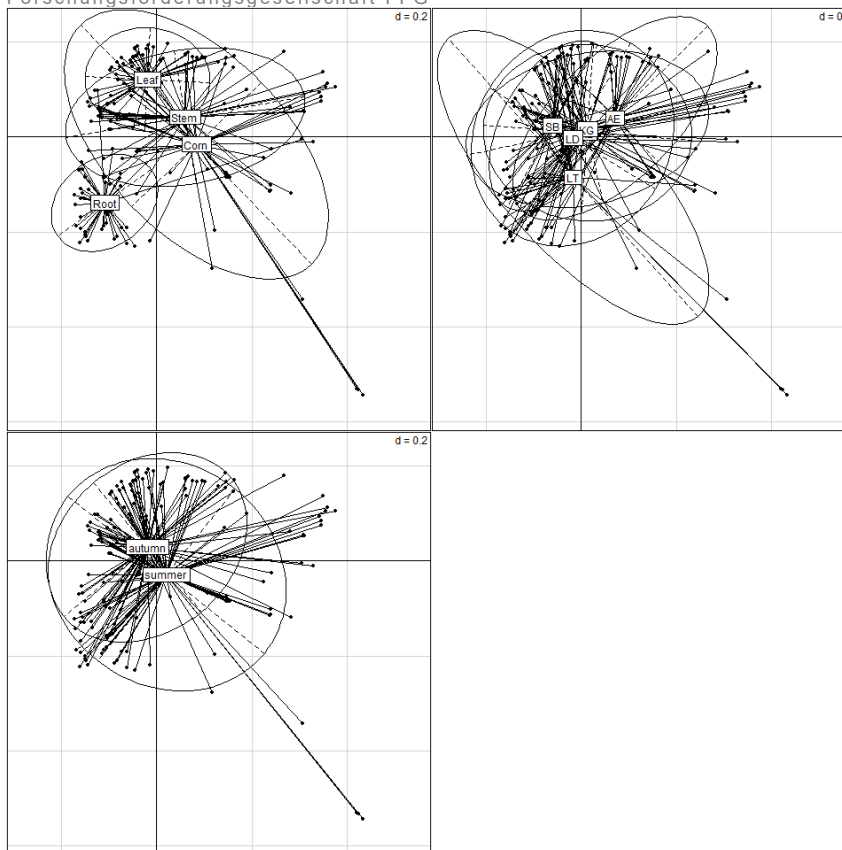


Abbildung 8 – Unterschiede der Diversität der Proben, gruppiert nach Pflanzenteil (A), Sammelort (B) und Sammelzeitpunkt/Reifegrad der Kolben (C)

Mit Hilfe einer Random Forest Analyse, kann analysiert werden, wie bedeutend eine Art für die Unterscheidung der Proben z.B. nach Pflanzenteil, ist. Dabei haben jene Arten eine hohe Bedeutung (Mean Decrease Accuracy), die vor allem in einem Pflanzenteil vorkommen. In Tabelle 1 sind die 5 wichtigsten Arten für die Zuordnung zu Pflanzenteilen, Sammelzeitpunkt und Sammelort aufgelistet.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Tabelle 3 - bedeutendsten OTUs nach Pflanzenteilen, Sammelzeitpunkt, Sammelort

AE – Aigen im Ennstal (Steiermark), KB- Klingenbach/Zagersdorf (Burgenland), LM – Langmannersdorf (NÖ Tullnerfeld), SB – Strengberg (NÖ Mostviertel), LT – Laa an der Thaya (NÖ Weinviertel), KG – Klein Gerungs (NÖ Waldviertel)

OTU	Bedeutung	Familie	Genus	Spezies	Pflanzenteil
OTU_9	21,6	Bulleribasidiaceae	<i>Vishniacozyma</i>	<i>globospora</i>	Wurzel
OTU_83	14,8	Nectriaceae	<i>Nectriaceae</i>		Wurzel
OTU_2	13,7	Pezizaceae	<i>Peziza</i>	<i>ostracoderma</i>	Korn
OTU_27	13,5	Pucciniaceae	<i>Puccinia</i>		Blatt
OTU_11	12,3	Ascomycota i.s.	<i>Ascomycota</i>		Blatt
Sammelzeitpunkt					
OTU_4	23,6	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>		Herbst
OTU_3	19,5	Pucciniaceae	<i>Puccinia</i>		Herbst
OTU_26	12,8	Nectriaceae	<i>Nectriaceae</i>		Herbst
OTU_325	12,6	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>		Herbst
OTU_41	12,0	Bulleribasidiaceae	<i>Vishniacozyma</i>		Herbst
Sammelort					
OTU_8	17,8	Pleosporaceae	<i>Drechslera</i>		AE
OTU_53	14,5	Sordariomycetes i.s.	<i>Sordariomycetes</i>		LD
OTU_14	14,2	Glomeraceae	<i>Glomeraceae</i>		LD
OTU_29	13,7	Glomeraceae	<i>Glomus</i>		KB
OTU_257	12,0	Filobasidiaceae	<i>Filobasidium</i>		KG

Insgesamt wurden im Mittel *Saccharomyces* und *Psathyrella* am häufigsten gefunden. Diese beiden Arten sind jedoch nur in einzelnen bzw. wenigen Proben zu fast 100% vorgekommen. *Epicoccum* wurde mit einer hohen Häufigkeit in nahezu allen Proben gefunden. Die Verteilung auf die verschiedenen Pflanzenteile ist unterschiedlich, so konnte *Epicoccum* nur selten in Wurzeln aber häufig an oberirdischen Pflanzenteilen gefunden werden (Abbildung 10, A, B). Das stimmt mit der bekannten Lebensweise von *E. nigrum* überein, der vor allem oberirdische Pflanzenteile epiphytisch und endophytisch besiedeln kann. Auf Stammebene konnten am häufigsten *Ascomycota*, *Basidiomycota* und *Glomeromycota* gefunden werden. Während *Ascomycota* und *Basidiomycota* in allen Pflanzenteilen vorkommen, waren die *Glomeromycota* auf die Wurzelproben beschränkt, was ihre Fähigkeit zur Ausbildung arbuskulärer Mykorrhizen entspricht (Abbildung 10, C).

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Tabelle 4 - im Mittel am häufigsten gefundene Gattungen

Genus	Mittlere Häufigkeit	Anzahl gefundener OTUs in Proben
<i>Saccharomyces</i>	31,46	3
<i>Psathyrella</i>	18,82	9
<i>Epicoccum</i>	14,90	162
<i>Peziza</i>	13,12	48
<i>Lapidomyces</i>	8,05	30
<i>Henningsomyces</i>	7,45	3
<i>Debaryomyces</i>	6,17	5
<i>Ustilaginaceae</i>	5,82	59
<i>Microdochium</i>	5,64	73
<i>Occultifur</i>	5,47	19

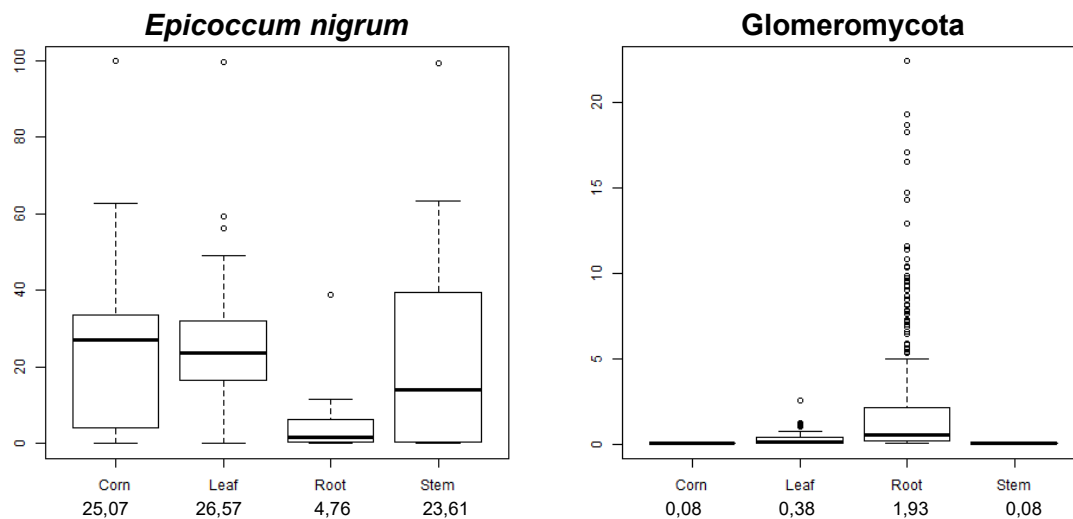


Abbildung 5 – Relative Häufigkeit von charakteristischen Arten / Gattungen in den vier gesammelten Pflanzenteilen;

Zuguterletzt konnten im gesamten Datensatz der Pilze aus Maisproben einige potenzielle Weißfäulepilze gefunden werden. Es wird erwartet, dass diese Pilze gut an das Substrat angepasst sind. In weiterführenden Projekten kann daher versucht werden, mit ähnlichen Isolaten Vorbehandlungen von Maisstroh zur Bioenergiegewinnung zu testen.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Tabelle 5: Potenzielle Weißfäulepilze in Maisbiomasse

Gattung	Art
<i>Psathyrella</i>	<i>aff. trepida</i>
<i>Coprinopsis</i>	<i>cf. kubickae</i>
<i>Auriculariales</i>	
<i>Psathyrella</i>	<i>piluliformis</i>
<i>Auriculariales</i>	
<i>Ganoderma</i>	<i>adpersum</i>
<i>Coprinellus</i>	<i>hiascens</i>
<i>Coprinellus</i>	<i>aff. micaceus</i>
<i>Auriculariales</i>	
<i>Volvopluteus</i>	<i>gloiocephalus</i>
<i>Auriculariales</i>	
<i>Coprinopsis</i>	<i>aff. lagopus</i>
<i>Marasmius</i>	<i>colorimarginatus</i>
<i>Coprinopsis</i>	<i>sp.</i>
<i>Peniophora</i>	<i>lycii</i>
<i>Coprinellus</i>	<i>verrucispermus</i>
<i>Corticiaceae</i>	
<i>Coprinopsis</i>	<i>sp.</i>
<i>Phallus</i>	<i>sp.</i>
<i>Ganoderma</i>	<i>applanatum</i>

Die Ergebnisse der Analyse der verschiedenen vorkommenden Arten lassen erwarten, dass eine Zugabe von Weißfäulepilzen und *Trichoderma reesei* zu einer Verstärkung der natürlichen Abbauleistung führen würde.

Metatranskriptomanalyse

Um die funktionelle Bedeutung der vorhandenen Mikroorganismen zu charakterisieren wurden 12 RNA Proben von Wurzel, Stamm, Blatt und Korn für eine Metatranskriptomanalyse herangezogen. Um die tatsächliche Gen-Regulation am natürlichen Standort ohne Störung des Systems untersuchen zu können, wurden die Mikroorganismen mitsamt dem Pflanzenteil der RNA Analyse unterworfen. Durch Ribosome-Depletion sollte der Anteil der mit-isolierten Pflanzen-RNA verringert werden. Die Analyse der Resultate der Sequenzierung konnte während der Projektlaufzeit nicht mehr abgeschlossen werden, die detaillierte Auswertung der Ergebnisse ist noch im Gange.

5 Ausblick und Empfehlungen

Mit unserem Projekt FUNGI4BIOENERGY konnten wir wichtige neue Erkenntnisse für die Verwendung von Pilzen in der biologischen Vorbehandlung und der Enzymproduktion allgemein gewinnen.

Als wichtigstes Ergebnis unseres Projekts betrachten wir den Proof of Principle für die beträchtliche Verbesserung der Enzymproduktion von *Trichoderma reesei* durch Kreuzung. Die dadurch entstandenen über 1200 Stämme stellen eine äußerst wichtige Ressource für weitere Forschung dar, da für alle Stämme enzymatische Analysen verfügbar sind und die Stämme auch für weitere physiologische und enzymatische Tests herangezogen werden können. Eine erste Untersuchung ausgewählter Genome verbesserter Stämme wurde bereits begonnen und wird uns zeigen, ob natürliche Auslese dieselben Veränderungen im Genom bewirkt wie gezielte Eingriffe ins Genom, deren positiver Effekt durch funktionelle Genomik in der Vergangenheit erforscht wurde.

In weiterer Folge können auch die restlichen 1200 Stämme für ähnliche Analysen verwendet werden, da jeder Stamm ein Individuum mit unterschiedlichen Eigenschaften ist. Die Genome dieser Stämme können dann Rückschlüsse auf diverse Eigenschaften, die auch erst zu analysieren sind, zulassen. Darunter zum Beispiel die Proteaseproduktion, Wachstum, Sporulation, Produktion selektierter Sekundärmetabolite etc. Damit sind wesentliche Fortschritte in der verbesserten Nachhaltigkeit auch industrieller Prozesse möglich. Die derzeitigen Anstrengungen, auch auf EU-Ebene, chemische Prozesse durch effiziente enzymatische Prozesse zu ergänzen oder zu ersetzen, können dadurch unterstützt werden.

Als effiziente Biomasseabbauer sind ausgewählte, verbesserte Stämme von *Trichoderma reesei* eine wichtige Ressource für die Weiterentwicklung des Ko-Kultivierungsansatzes. Obwohl wir schon zahlreiche Weißfäulepilze isoliert haben und viele davon auch getestet, hat es sich als durchaus schwierig herausgestellt, einen hocheffizienten, aber nicht als pathogen bekannten Stamm zu finden. Hier werden noch weitere Arbeiten nötig sein, um den Abbau von Lignin im ersten Schritt zu erhöhen und damit auch eine optimale Wirkung der celluloseabbauenden *Trichoderma reesei* Stämme zu ermöglichen. Ebenso spielt die ideale Interaktion und Synergie von Weißfäulepilz und *T. reesei* eine wichtige Rolle und weitere Kombinationen basierend auf unseren Ergebnissen werden wichtig sein, um die optimale Aufschlußleistung zu erreichen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis unseres Projekts besteht darin, dass sich im Zuge der Kreuzungen zur Stammverbesserung nicht nur die Enzymproduktion wesentlich ändert. Auch die Produktion von Sekundärmetaboliten schwankt beträchtlich. Für die Spezies *Trichoderma reesei* war dies eher nicht zu erwarten, da hier kaum Forschung zum Thema Sekundärmetabolismus betrieben worden war. Es war uns aber wichtig, sicherzustellen, dass keine schädlichen Toxine gebildet werden. Mit den nun erhaltenen Resultaten ist es

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

durchaus möglich, dass unter den neu und verstärkt produzierten Substanzen auch solche vertreten sind, die pharmazeutische Relevanz haben. Auch hier ist die hohe Anzahl an Stämmen, die wir produziert haben, eine wichtige Ressource für weitere Projekte um auch die biochemische Grundlage und die Regulation die Produktion solcher Substanzen zurückverfolgen zu können. Nur so ist eine spätere Produktion eventuell pharmazeutisch wertvoller Substanzen möglich.

Leider konnten wir nicht alle Projektziele erfolgreich umsetzen, und versuchen derzeit noch ausständige Experimente nachzuholen. Unser Ziel während des Projekts war es, die optimal mögliche Anwendbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, um die Verwertbarkeit weiter zu erhöhen. Die generierten Ressourcen, vor allem die erhaltenen Stämme sind eine wichtige Basis für weitere Forschungs- und Innovationsprojekte und teilweise auch für die direkte Anwendung in der Industrie.

6 Literaturverzeichnis

- Archibald, F. S., 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3110-6.
- Arora, D. S., Gill, P. K., 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology.* 28, 602-605.
- Bandounas, L., et al., 2011. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol.* 11, 94.
- Binder, M., Hibbett, D. S., 2006. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. *Mycologia.* 98, 971-981.
- Binder, M., et al., 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia.* 105, 1350-1373.
- Bischof, R. H., et al., 2016. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact.* 15, 106.
- Frisvad, J. C., et al., 2018. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102, 9481-9515.
- Hibbett, D. S., 2006. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia.* 98, 917-925.
- Hibbett, D. S., Donoghue, M. J., 2001. Analysis of Character Correlations Among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology.* 50, 215-242.
- Larsson, K.-H., et al., 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia.* 98, 926-936.
- Malachova, A., et al., 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A.* 1362, 145-56.
- Mellitzer, A., et al., 2012. Sensitive high-throughput screening for the detection of reducing sugars. *Biotechnol J.* 7, 155-62.
- Nevalainen, H., et al., 1994. On the safety of *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol.* 37, 193-200.
- Pardo, A. G., et al., 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycological Research.* 106, 132-137.
- Peterson, R., Nevalainen, H., 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - thirty years of strain improvement. *Microbiology.* 158, 58-68.
- Picart, P., et al., 2016. Assessing Lignin Types To Screen Novel Biomass-Degrading Microbial Strains: Synthetic Lignin as Useful Carbon Source. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* 4, 651-655.
- Riley, R., et al., 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 9923-8.

Energieforschungsprogramm - 1. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische
Forschungsförderungsgesellschaft FFG

- Schmoll, M., Sexual development in *Trichoderma* - scrutinizing the aspired phenomenon. In: P. K. Mukherjee, et al., Eds.), *Trichoderma: Biology and Applications*. CAB International, UK, 2013, pp. 67-86.
- Schmoll, M., et al., 2016. The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiol Mol Biol Rev.* 80, 205-327.
- Seidl, V., et al., 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 13909-14.
- Thorn, R. G., et al., 2000. Phylogenetic Analyses and the Distribution of Nematophagy Support a Monophyletic Pleurotaceae within the Polyphyletic Pleurotoid-Lentinoid Fungi. *Mycologia.* 92, 241-252.
- Unterwurzacher, V., et al., 2018. Validation of a quantitative PCR based detection system for indoor mold exposure assessment in bioaerosols. *Environ Sci Process Impacts.* 20, 1454-1468.
- Zweckmair, T., et al., 2016. Preparation and analytical characterisation of pure fractions of cellooligosaccharides. *J Chromatogr A.* 1431, 47-54.

7 Kontaktdaten

PD DI Dr. Monika Schmoll
AIT Austrian Institute of Technology GmbH
Department Health and Bioresources
Konrad Lorenz Strasse 24
3430 Tulln, Österreich
Tel: 0664 88390594
email: monika.schmoll@ait.ac.at

Projektpartner:

AIT

Dr. Markus Gorfer (Department Health and Bioresources)
Mag. Clara Pogner (Department Health and Bioresources)
Mag. Dragana Bandian (Department Health and Bioresources)

BOKU

Dr. Alexander Bauer (Institut für Landtechnik)
Universität für Bodenkultur
Konrad Lorenz Strasse 24
3430 Tulln, Österreich
email: alexander.bauer@boku.ac.at

Mag. Samira Basyouni-Khamis (Institut für Landtechnik)