

Antimikrobielle Sekundärmetabolite aus Actinobakterien für den Materialschutz

Antimicrobial secondary metabolites from Actinobacteria for the protection of material

Projektleiterin

Project Leader:

Kordula Jacobs

Projektbearbeiterinnen

Project team:

Katharina Plaschkies,

Steffi Kath,

Franziska Zimmer

Fördermittelgeber

Sponsor:

BMW (Euronorm)

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Zur Verhinderung der mikrobiellen Materialschädigung werden vorbeugend wirksame, biozidhaltige Schutzmittel eingesetzt, darunter Holz- und Filmschutzmittel, Topfkonservierer oder Antifoulingprodukte. Grundsätzlich besteht die Forderung, biozidfreie Alternativen zu prüfen bzw. Maßnahmen zur Minimierung des Biozideinsatzes umzusetzen (EU-Verordnung 528/2012). In diesem Kontext ist die Entwicklung umweltverträglicher, für Mensch und Tier unbedenklicher, antimikrobieller Produkte für die Substitution herkömmlicher Biozide eine zentrale Herausforderung der Forschung und Entwicklung im Materialschutz.

Antimikrobielle Wirkstoffe aus Actinobakterien werden bisher im Materialschutz nicht genutzt und die forschungsseitige Bearbeitung dieser Thematik steht noch in den Anfängen. Vor diesem Hintergrund erfolgten im IHD Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung antimikrobieller Metabolite aus Actinobacteria für die Substitution chemischer Biozide im Materialschutz (Holz- und Filmschutzschutz sowie Topfkonservierung). Dazu sollten geeignete Wirkstoffproduzenten ermittelt, antimikrobielle Substanzen extrahiert und deren Wirksamkeit gegen ausgewählte materialschädigende Mikroorganismen mit modifizierten Screeningmethoden untersucht werden. Relevante Schaderregergruppen waren Pilze (holzerstörende Basidiomycota, Moderfäule- und Bläuepilze, Schimmelpilze), Algen und Bakterien.

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

For the purpose of avoiding microbial damage to material, preventative biocidal protectants, including wood and film-coating preservatives, pot preservatives or anti-fouling products, are used. There is a principal requirement to examine biocide-free alternatives or to implement measures to minimise the use of biocides (EU Regulation 528/2012). In this context, the development of environmentally compatible, antimicrobial products that are harmless to humans and animals for the substitution of conventional biocides is a central challenge of research and development in material protection.

So far, antimicrobial agents from Actinobacteria have not been in use, and research on this topic is still in its beginnings. Against this background, investigations were carried out at the IHD to identify and characterise antimicrobial metabolites from Actinobacteria for the substitution of chemical biocides in material protection (wood and film-coating protection as well as pot preservation). For this purpose, suitable active substance producers were to be identified, antimicrobial substances extracted and their efficacy against selected material-damaging microorganisms investigated using modified screening methods. Relevant pest groups were fungi (wood-destroying basidiomycota, mould rot and blue stain fungi, moulds), algae and bacteria.

VORGEHENSWEISE

Ausgehend von der Hypothese, dass sich in geschädigten Materialien adaptierte Bakteriengemeinschaften entwickeln, die zur Abwehr von Schaderregern spezifische antimikrobielle Metabolite ausschütten, wurden Actinobacteria aus ausgewählten mikrobiell geschädigten Materialien isoliert. Die phylogenetische Zuordnung aller Actinobacteria-Stämme wurde auf Basis morphologischer makro- und mikroskopischer Analysen sowie mittels Sequenzierung der 16s rRNA-Region und des partiellen Gyrase-Gens bestimmt. Für die Selektion von Wirkstoffproduzenten wurden verschiedene Assays auf Basis von Schaderreger-Kulturen und Actinobacteria-Antagonisten sowie ein Biolumineszenz-ATP-Tests zum Nachweis der Zell-Vitalität bzw. Abtötungswirkung von Substanzen adaptiert und das Wirkstoffpotenzial aller Actinobacteria-Isolate analysiert. Mit favorisierten Stämmen erfolgten orientierende Untersuchungen zur Gewinnung von antimikrobiellen Substanzen unter Einsatz einer Laboranlage zur Extraktion mit superkritischen Fluiden (SFE-Anlage).

ERGEBNISSE

Im Rahmen der Isolierungsversuche an mikrobiell geschädigten Materialien (u. a. natives und modifiziertes Holz, Holzwerkstoffplatten und Gipskarton sowie Dispersionsfarben und Lacke) wurden 135 Actinobacteria-Stämme mit unterschiedlichem Habitus als Reinkulturen gewonnen, von denen 128 Isolate einer Actinobacteria-Art bzw. -Gattung zugeord-

APPROACH

Starting out from the hypothesis that adapted bacteria cultures develop in damaged materials that release specific antimicrobial metabolites to defend against harmful organisms, Actinobacteria were isolated from selected microbially damaged materials. The phylogenetic classification of all Actinobacteria strains was determined on the basis of morphological macroscopic and microscopic analyses as well as by sequencing the 16s rRNA region and the partial gyrase gene.

For the selection of active substance producers, various assays based on pathogenic cultures and Actinobacteria antagonists as well as a bioluminescence ATP test for the detection of cell vitality or killing effect of substances were adapted, and the active substance potential of all Actinobacteria isolates was analysed. Orienting investigations were carried out with favoured strains on the extraction of antimicrobial substances using a laboratory plant for extraction with supercritical fluids (SFE plant).

RESULTS

Within the scope of the isolation experiments on microbially damaged materials (including native and modified wood, wood-based panels and plasterboard as well as dispersion paints and varnishes), 135 Actinobacteria strains with different habitus were obtained as pure cultures, of which 128 isolates were assigned to an Actinobacteria

net wurden. Abb. 1 zeigt ausgewählte, von verschiedenen Materialien gewonnene Actinobacteria-Reinkulturen.

Mehr als die Hälfte der Actinobacteria-Isolate gaben bei den verschiedenen Wirksamkeits-Screenings antimikrobielle Substanzen ab. Die Mehrzahl dieser Actinobacteria waren der Gattung *Streptomyces* zuzuordnen, vereinzelt wurden Vertreter der Gattung *Nocardioopsis* sowie je ein Vertreter der Gattung *Nonomuraea* und *Microbacterium* selektiert.

species or genus. Fig. 1 shows selected pure Actinobacteria cultures obtained from different materials.

More than half of the Actinobacteria isolates released antimicrobial substances in the various efficacy screenings. The majority of these Actinobacteria were of the *Streptomyces* genus; occasionally, representatives of the genus *Nocardioopsis* and one representative each of the genus *Nonomuraea* and *Microbacterium* were selected. Isolates



Abb. 1: Aufgereinigte Isolate von Actinobacteria aus verschiedenen Materialien, von links: *Nocardioopsis dassonvillei* (verdorbene Wandfarbe), *Rhodococcus* sp. (Lärchenholz), *Streptomyces ederenis* (pilzgeschädigtes Lärchenholz), *Mycolicibacterium* sp. (pilzgeschädigtes Lärchenholz), *Streptomyces* sp. (pilzgeschädigtes Buchenholz).

Fig. 1: Isolates of Actinobacteria purified from various materials, from left: *Nocardioopsis dassonvillei* (blemished wall paint), *Rhodococcus* sp. (larch wood), *Streptomyces ederenis* (larch wood damaged by fungi), *Mycolicibacterium* sp. (larch wood damaged by fungi), *Streptomyces* sp. (beech wood damaged by fungi).

Die höchste Wirksamkeit zeigten Isolate von *Streptomyces violaceusniger*, *S. armeniacus* und *S. rochei* mit folgenden Befunden:

- vollständige Inhibierung von *Aspergillus niger* und *Alternaria alternata* (häufige Schadpilze in feuchtebelasteten Wohnräumen),
- vollständige Inhibierung von *Aureobasidium pullulans* (Hauptverursacher von Verblauung an verarbeitetem Holz),
- vollständige Inhibierung von *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum* und *Trametes versicolor* (holzerstörende Pilze),
- vollständige bis deutliche Inhibierung der Bakterien *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* (ubiquitär auftretende Bakterien, die u. a. Fäulnis von Farben und Lacken verursachen) sowie
- deutliche Inhibierung der Hefen *Rhodotorula rubra* und *Yarrowia lipolytica* (Schadorganismen in feuchtebelasteten Innenräumen und Verderber fetthaltiger Lebensmittel).

Auch die aus den favorisierten Actinobacteria gewonnenen Extraktfraktionen waren gegen verschiedene materialschädigende Bakterien wirksam. Jedoch konnte nur eine geringe Hemmwirkung gegen Hefen und Schimmelpilze nachgewiesen werden. Eine Wirkung der Extrakte gegen holzerstörende Basidiomyceten, wie in den kulturbasierten Screenings gezeigt, war nicht nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass die entsprechenden Wirkstoffe mit dem eingesetzten Extraktionsregime nicht erfasst wurden und hierzu weiterführende Untersuchungen mit anderen Extraktionsmitteln und -verfahren erforderlich sind.

of *Streptomyces violaceusniger*, *S. armeniacus* and *S. rochei* showed the highest efficacy with the following findings:

- complete inhibition of *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* (frequent damaging fungi in damp living spaces),
- complete inhibition of *Aureobasidium pullulans* (main perpetrator causing blue stain in processed wood),
- complete inhibition von *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum* and *Trametes versicolor* (wood-destroying fungi),
- complete to clear inhibition of the bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, (ubiquitously occurring bacteria that cause, among other things, rot in paints and lacquers),
- clear inhibition of the yeasts *Rhodotorula rubra* and *Yarrowia lipolytica* (harmful organisms in damp interior areas and spoilers of fat-containing food).

The fractions extracted from the favoured Actinobacteria showed effect also against several material-damaging bacteria. However, only a low inhibiting effect against yeasts and mould could be proved. An effect of the extracts against wood-destroying basidiomycetes, as demonstrated in the culture-based screenings, could not be evidenced. This is an indication that the respective agents were not covered by the extraction regime applied and that, in this respect, further investigations with other extraction agents and methods are required.