

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

Untersuchungen zu antagonistisch wirksamen Mikroorganismen gegen  
*Fusarium culmorum* bei der Mälzung von Gerste und Weizen

Rüdiger Bernhard Liske

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. W. Back

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel  
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. E. Geiger

Die Dissertation wurde am 14.05.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.09.2002 angenommen.

Den Zufall gibt die Vorsehung,  
zum Zweck muß ihn der Mensch gestalten  
Schiller, Don Carlos

Meinen Eltern und Großmüttern

1	Einleitung.....	1
1.1	Gattung Fusarium.....	2
1.2	Vorkommen der Fusarien in Getreide.....	4
1.3	Mykotoxine und ihre Bedeutung.....	5
1.3.1	Das Mykotoxin Deoxynivalenol.....	10
1.3.1.1	Wirkung bei Schweinen.....	10
1.3.1.2	Wirkungen bei Wiederkäuern .....	12
1.3.1.3	Wirkung von Deoxynivalenol auf den Menschen.....	13
1.3.2	Biosynthese der Trichothecene.....	14
1.4	Mögliche Ansätze zur Bekämpfung von Fusarien auf Getreide.....	17
1.5	Milchsäurebakterien.....	19
1.5.1	Die Gattung Lactobacillus.....	19
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Laborgeräte.....	22
2.1.2	HPLC-Komponenten.....	23
2.1.3	Elektrophorese-Komponenten.....	24
2.2	Mikroorganismen und Stammhaltung.....	24
2.2.1	Mikroorganismen.....	24
2.2.2	Stammhaltung.....	26
2.2.3	Versuchsmaterial Getreide.....	26
2.2.4	Chemikalien und Lösungen.....	26
2.2.4.1	TE-Puffer für Fluoreszenzmessungen.....	27
2.2.4.2	Lysepuffer 3,3fach.....	27
2.2.4.3	TBE-Puffer (10fach konzentriert).....	27
2.2.4.4	Ethidiumbromid.....	27
2.2.4.5	Stopppuffer.....	28
2.2.5	Nährmedien.....	28
2.2.5.1	Waksman-Agar.....	28
2.2.5.2	MRS-Bouillon bzw. MRS-Agar.....	28
2.2.5.3	Bakteriocin-Screening-Medium (BSM).....	29
2.2.5.4	Verdünnungslösung zur Keimzahlbestimmung.....	30
2.2.5.5	Kartoffel-Dextrose-Agar (Potato Dextrose Agar, PDA).....	30
2.2.5.6	Synthetischer nährstoffarmer Agar (SNA).....	30
2.2.5.7	Nelkenblatt-Agar (Carnation Leaf Agar, CLA).....	31
2.2.5.8	YPG-Agar.....	31
2.2.5.9	Selektiver Fusarien-Agar.....	32
2.2.5.10	Pepton-PCNB-Agar.....	32
2.2.5.11	Mannit-PCNB-Agar.....	33
2.2.5.12	Mannit-Malachitgrün-Agar.....	33
2.3	Bakteriozin-Assay.....	33
2.3.1	Agar-Diffusions-Test.....	34
2.4	Isolierung der Antagonisten.....	34
2.5	Agarkultur der Antagonisten mit verschiedenen Testorganismen.....	35
2.6	Saatgutbehandlung mit Antagonisten.....	35
2.7	Untersuchungen zur Mykoflora von Getreide.....	36
2.8	Keimzahlbestimmung von Fusarien auf Getreide.....	37
2.8.1	Bestimmung der Keimzahlen auf der Kornaußenseite.....	37

2.8.2 Bestimmung der Keimzahlen im Korninneren.....	37
2.9 Isolierung und Reinigung von DNA.....	38
2.9.1 DNA-Isolierung mit „Puregene DNA Isolation Kits“.....	38
2.9.2 Isolierung von Fusarien-DNA aus Getreide- und Malzproben (Knoll et al., 2000)....	39
2.9.3 In-vitro-Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki et al. (1988).....	39
2.9.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.9.5 Sequenzanalyse von DNA-Amplifikaten.....	42
2.9.6 In der vorliegenden Studie verwendete PCR-Primer.....	42
2.10 Phylogenetische Analyse.....	43
2.11 Messung der Fusarium-DNA mittels Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen®.....	43
2.12 Bestimmung von Konservierungsstoffen mittels Dünnschichtchromatographie (DC)....	44
2.13 Bestimmung von Deoxynivalenol mittels Dünnschichtchromatographie (DC).....	44
2.13.1 Isolierung von DON aus Kulturflüssigkeiten oder Bier.....	44
2.13.2 Dünnschichtchromatographie von Deoxynivalenol.....	45
2.14 Bestimmung der Mykotoxine mittels HPLC.....	46
2.14.1 Bestimmung von DON mittels MycoSep-DON-Säulen.....	46
2.14.1.1 Extraktion und Aufreinigung von DON aus Getreide und Malz.....	46
2.14.1.2 Aufkonzentrierung.....	46
2.14.2 Bestimmung von DON mittels Immunoaffinitätsäulen.....	46
3 Ergebnisse.....	47
3.1 Isolierung von Antagonisten aus Bodenproben.....	47
3.2 in vitro-Wirksamkeit der aus Bodenproben isolierten Antagonisten .....	47
3.3 Wirksamkeit der in vitro wachstumshemmenden Mikroorganismen in einem in planta- Versuchssystem.....	52
3.4 Identifizierung des Isolates TMW2.418 als <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	52
3.4.1 Physiologische und morphologische Charakterisierung des Isolates TMW2.418.....	52
3.4.2 Partielle 16S-rRNA-Sequenzierung des Isolates TMW 2.418.....	55
3.5 Identifizierung des Isolates Li2 als <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	58
3.5.1 Physiologische und morphologische Charakterisierung des Isolates Li2.....	58
3.5.2 Partielle 16S-rRNA-Sequenzierung des Isolates Li2.....	61
3.6 Charakterisierung des Versuchsmaterials Gerste und Weizen.....	64
3.6.1 HPLC-Bestimmung des Deoxynivalenol-Gehaltes im Versuchsmaterial.....	65
3.7 Durchführung von Mälzungsversuchen mit Gerste und Weizen.....	67
3.8 Indirekte Keimzahlbestimmung von <i>Fusarium culmorum</i> durch Anwendung der Tox5- PCR in einem quantitativen System.....	68
3.8.1 Tox5-PCR.....	68
3.8.2 Quantifizierungsmethode mittels Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen®.....	69
3.8.3 Korrelation zwischen Tox5-PCR-Produkt und Pilz-Biomasse.....	70
3.9 Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von PCR-Produkten mittels Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen®.....	72
3.10 Indirekte Keimzahlbestimmung von <i>Fusarium culmorum</i> durch Quantifizierung des PCR-Produktes nach Mälzungen mit ausgewählten Mikroorganismen .....	77
3.10.1 Mälzungen von Weizen unter Zusatz von Mikroorganismen zum Weichwasser....	77
3.10.2 Mälzungen von Gerste unter Zusatz von Mikroorganismen zum Weichwasser.....	80
3.11 Einfluß von Antagonisten auf die Bildung des Mykotoxins Deoxynivalenol während der Mälzung mit Weizen- und Gerste.....	87
3.11.1 Korrelation zwischen DNA- und DON-Gehalt.....	90
3.12 Test auf Bakteriozinbildung durch Antagonisten.....	95
3.13 Untersuchungen zur Bildung von Konservierungsstoffen.....	96

---

4	Diskussion.....	97
4.1	In vitro Hemmung von Fusarien durch Bodenisolat.....	98
4.2	Übertragung der in vitro Ergebnisse auf in vivo Systeme.....	99
4.2.1	Test in einem in planta System.....	99
4.2.2	Durchführung von Mälzungsuntersuchungen an Weizen und Gerste.....	99
4.2.3	Auswertung der Mälzungsversuche.....	102
4.2.3.1	Methodendiskussion.....	102
4.2.3.2	Korrelation zwischen gravimetrisch bestimmter Biomasse von <i>Fusarium culmorum</i> und dem PCR-Produkt von <i>Fusarium culmorum</i> -DNA.....	104
4.2.3.3	Bewertung und Diskussion der Ergebnisse.....	105
4.3	Mögliche Hemmechanismen bei der Mälzung von Getreide unter Einsatz von Mikroorganismen.....	109
4.3.1	Mögliche Hemmechanismen bei Milchsäurebakterien.....	110
4.3.1.1	Bildung von Benzoesäure und niedermolekularen Verbindungen durch Milchsäurebakterien.....	111
4.3.1.2	Bildung von fungiziden Proteinen durch Milchsäurebakterien.....	112
4.3.2	Mögliche in vitro Hemmechanismen bei <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	113
4.3.3	Mögliche Hemmechanismen bei <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	114
5	Zusammenfassung.....	116
6	Summary.....	118
7	Literaturverzeichnis.....	120
8	Anhang.....	141
8.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Formeln.....	141
8.2	Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen der Isolate TMW 2.418, DSM50170 und DSM8573.....	142
8.3	Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen der Isolate JordA, JordC und JordD mit vergleichbaren Sequenzen aus der ARB-Datenbank.....	147
8.4	Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen des Isolates , JordB mit vergleichbaren Sequenzen aus der ARB-Datenbank.....	150

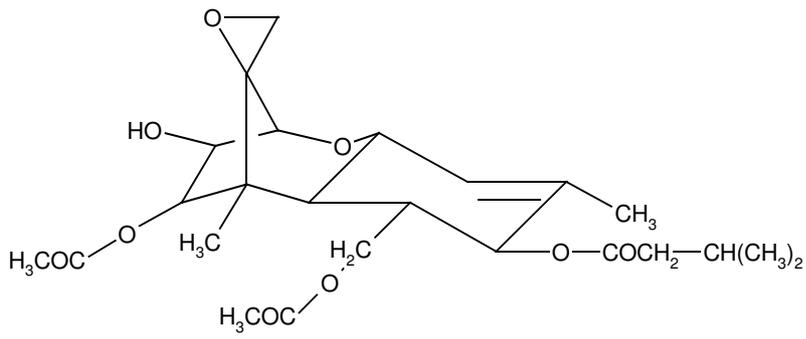
## 1 Einleitung

*Fusarium*-Arten sind weltweit verbreitete Bodenpilze. Neben ihrer saprophytischen Lebensweise können einige Arten jedoch auch durch die Besiedelung von Halm und Ähre direkten Einfluß auf den Ertrag und die Qualität von Getreide haben. Der Ährenbefall durch Fusarien wird in Südeuropa und Skandinavien für die ökonomisch bedeutendste Krankheitsgruppe bei Weizen und Gerste gehalten (Müller, 1997). In den USA und Canada entstanden durch den Fusarienbefall auf Getreide in den letzten Jahren große wirtschaftliche Schäden. Zwischen 1993 und 1996 wurden hier bis zu 25 % der Ernte vernichtet, was einem wirtschaftlichen Schaden von etwa 3 Mrd. US\$ entspricht (Schwarz, 1995). Momentan werden jährlich ca. 1 Mrd. US\$ Verlust an Getreide und Mais durch Pilzbefall in den USA verzeichnet (Agricultural Research Service News, 14.12.99). In Malz und Bier verursachen Fusarien große Probleme durch die Bildung von Mykotoxinen und das sogenannte Gushing (spontanes Überschäumen) des Bieres. Hinweise auf humanpathogene Wirkung dieser Pilze verdichteten sich in jüngster Vergangenheit immer mehr (Peraica *et al.*, 1999; Rotter *et al.*, 1996). Der Zusammenhang zwischen Fusarien und Gushing wurde in mehreren Arbeiten wiederholt experimentell belegt (Schwarz, 1996; Niessen, 1992). Obwohl bei der Mälzung zunächst ein großer Teil der im Getreide vorhandenen Mykotoxine mit dem Weichwasser ausgewaschen wird (Schwarz, 1996), bieten jedoch die Bedingungen beim Mälzen hervorragende Voraussetzungen für das schnelle Wachstum von Bakterien und Pilzen. Dabei kann eine erneute Mykotoxinbildung erfolgen. Unter den Mykotoxinen, welche von *Fusarium* spp. gebildet werden, ist vor allem das Trichothecen Deoxynivalenol (DON) von großer Bedeutung. DON ist weitgehend stabil beim Darren und in der Würzebereitung. Aufgrund seiner thermischen Stabilität sowie seiner guten Wasserlöslichkeit konnte das Toxin in mehreren Studien in Handelsbieren nachgewiesen werden (Molto *et al.*, 2000; Shim 1997; Scott, 1993; Niessen *et al.*, 1992).

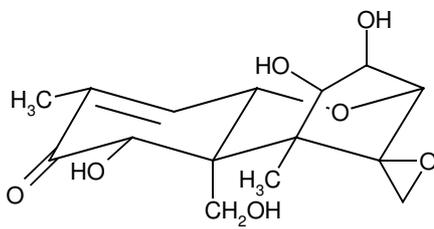
## 1.1 Gattung *Fusarium*

Die Formgattung *Fusarium* wurde 1890 von Link begründet. Fusarien werden in die Formklasse *Deuteromycetes*, Ordnung *Moniliales*, Familie *Tuberculariaceae* eingereiht. Aufgrund ihrer Variabilität durch Substrat- und Umweltfaktoren stellen Fusarien taxonomisch eine der am schwierigsten zu ordnenden Pilzgruppen dar, was zu verschiedenen Speziesbezeichnungen für ein und dieselbe Art geführt hat.

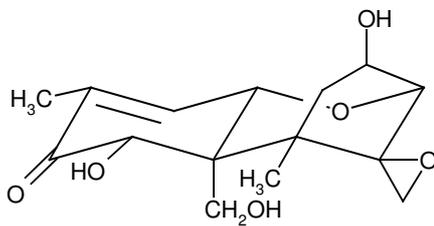
Fusarien gehören wie die meisten Schimmelpilze zu den mesophilen Arten, d.h. sie wachsen zwischen +10 und +40 °C. Da sie aber auch bei Temperaturen unter +10 °C wachsen können, werden sie als psychrotolerant bezeichnet. Ihr Wachstumsoptimum liegt bei einem  $a_w$ -Wert von 0,88 bis 0,96 zwischen +20 und +25 °C, wobei noch hinsichtlich Myzelwachstum, Sporenbildung und Sporenkeimung unterschieden werden muß. Die Mykotoxinbildung ist über einen weiten Temperaturbereich möglich. Einige Mykotoxine, die von Fusarien gebildet werden, sind in Abbildung 1 dargestellt.



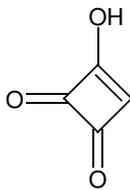
Fusariotoxin T2 (T2-Toxin)



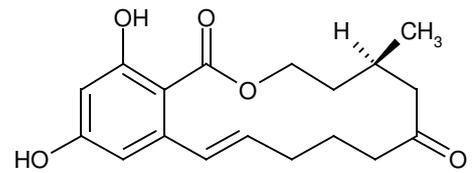
Nivalenol



Deoxynivalenol



Moniliformin



trans-Zearalenon

Abbildung 1 Ausgewählte Mykotoxine, die durch *Fusarium*-Spezies gebildet werden

## 1.2 Vorkommen der Fusarien in Getreide

Die natürliche Verbreitung der Fusarien erfolgt passiv durch Niederschläge (Abwaschen von Sporochochien von Stengeln oder Blättern). Einige Arten wie *F. moniliforme* sind trocken Sporig und werden mit dem Wind verbreitet. Auch Insekten tragen zur Verbreitung bei (Booth, 1971; Ooka und Kommedahl, 1977; Burges, 1981). Die Symptome eines Befalls reichen von korkenzieherartigen, verkrümmten Keimpflanzen über Auswinterungsschäden, Wurzelfäule, Halmbasisbefall, Blattflecken und Blattscheidennekrosen bis hin zu ausgebleichten Ähren und rötlich verfärbtem Kümmerkorn (Diehl, 1989).

Befallen Fusariensporen das Getreide bereits in der Keimphase, so spricht man von einer Primärfektion. Die Ausprägung des Primärbefalls ist abhängig von den Sorteneigenschaften, dem Infektionsdruck und dem Witterungsverlauf. Eine Sekundärfektion geht von bereits befallenen Pflanzenteilen oder vom Boden aus und kann Ertrag und Qualität des geernteten Getreides zusätzlich schädigen (Drochner, 1989).

Haben Fusarien den Keimling besiedelt, wachsen sie mit diesem mit und können so die Ährenanlage des Getreides befallen (Thalman, 1983). Der von dem Ährenbefall ausgehende Ertragsverlust ist stark abhängig vom jeweiligen Infektionszeitpunkt. Bei einer Infektion während der Blattscheidenöffnung werden die befallenen Kornanlagen durch die Fusarien vollständig vernichtet, und die Kornzahl pro Ähre geht zurück. Ein Befall während oder gegen Ende der Getreideblüte kann die Kornanlagen stark beeinträchtigen (Diehl, 1989).

Einige der Ursachen für den Anstieg der Getreidefusariosen sind im Strukturwandel in der Landwirtschaft zu suchen, vor allem in der Intensivierung der Getreideproduktion, verbunden mit Verengung und Vereinfachung der Fruchtfolge (Getreide-Mais-Folge). Fusarien sind wenig spezialisierte Erreger und können sich auf Wirtspflanzen anreichern. Durch vermehrtes Unterpflügen von Stroh und die Verringerung der Bodenbearbeitung können die Ernterückstände einer vorausgegangenen Getreide- oder Maisvorfrucht bei günstigen Vermehrungsvoraussetzungen Ausgangspunkte einer Fusarien-Epidemie sein (Meier *et al.*, 2000; Matthies *et al.*, 2000; Langseth und Stabbetorp, 1996; Obst, 1988).

### 1.3 Mykotoxine und ihre Bedeutung

Die Gefährlichkeit der Mykotoxine und der durch sie hervorgerufenen Mykotoxikosen wurde lange Zeit nicht erkannt bzw. unterschätzt. Erst seit 1960 macht man sich darüber ernsthaft Gedanken – in England waren damals Tausende von Truthähnen an verschimmeltem Erdnußschrot eingegangen. Die intensive Suche nach toxischen Substanzen in diesem Erdnußschrot führte zunächst zur Entdeckung der Aflatoxine, hochtoxischen Stoffwechselprodukten von *Aspergillus flavus*.

Bereits 1914 wurde aus Japan von Erkrankungen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren berichtet, die durch den Verzehr bzw. das Verfüttern von rötlich verfärbten und stark geschrumpften Getreidekörnern hervorgerufen wurden (Yoshizawa, 1983). Später durchgeführte mykologische Untersuchungen von derart geschädigten Getreideproben ergaben einen Pilzbesatz mit *F. „roseum“* (wahrscheinlich *F. avenaceum*) und *F. graminearum*. In Kulturfiltraten dieser Stämme konnten die Mykotoxine Nivalenol und Deoxynivalenol nachgewiesen werden.

1928 wurde in weiten Anbaugeländen Amerikas Getreide und Mais mit Schimmelpilzbefall registriert. Nach dem Verfüttern an Schweine traten Symptome wie Futtermittelverweigerung, Erbrechen, Vulva- und Gesäugeschwellung sowie Fortpflanzungsstörungen auf. Diese Krankheitserscheinungen wurden in Deutschland ebenfalls verzeichnet, nachdem dieses importierte Getreide verfüttert wurde.

In einigen Gebieten der UdSSR trat während des zweiten Weltkrieges und in den Jahrzehnten danach bei unterernährten Menschen eine als „Alimentäre Toxische Aleukie (ATA)“ bezeichnete Hemmung der Bildung weißer Blutkörperchen auf, die in schweren Fällen bis zur vollständigen Erschöpfung der Knochenmarkstätigkeit führte. Auf diese Weise starben ca. 100.000 Russen zwischen 1942 und 1948. Die Ursache für diese Erkrankung wurde schnell aufgeklärt: Weizen und Hirse waren wegen des damals herrschenden Arbeitskräftemangels nur teilweise geerntet worden. Das Getreide überwinterte auf dem Feld unter dem Schnee und entwickelte bei ca. 0 °C und hoher Luftfeuchtigkeit eine von Fusarienarten (vor allem *F. sporotrichioides*) geprägte Pilzflora mit offenbar hochtoxischen Mykotoxinen. Erst später wurde das die Erkrankung verursachende Mykotoxin identifiziert. Es handelte sich um das T2-Toxin, ein Toxin aus der Gruppe der von Fusarien gebildeten Trichothecene. In den russischen Getreideproben kam es bis zu einer Konzentration von 2,5 Gewichtsprozent vor (Weber, 1983).

Die Trichothecene sind vor allem ein Futtermittelproblem der gemäßigten und kalten Klimazonen. Lange Zeit wurde die Verfütterung angeschimmelter Cerealien nicht als Ursache für Gesundheitsstörungen bei Nutztieren erkannt. Es wurde sogar die Auffassung vertreten, angeschimmelte

Substrate seien nährstoffreicher und daher bei der Mast besonders wirkungsvoll (Weber, 1983). Vesonder *et al.* (1979) wiesen in Kulturen von *F. graminearum* die Toxine Deoxynivalenol, auch bekannt als „emetic factor“ oder Vomitoxin, und Zearalenon nach.

In Abhängigkeit von der Dosis werden die Wirkungen der Mykotoxine in akut und chronisch toxisch eingeteilt. Bei chronisch toxischer Wirkung wird zwischen kanzerogenen, mutagenen und teratogenen Effekten unterschieden. Des weiteren kann eine Einteilung je nach Wirkungsort in Hepato-, Nephro-, Dermato-, Neuro- und Immunotoxine erfolgen. In erster Linie werden die DNA-Funktionen, der Zellaufbau und die Zelldifferenzierung beeinflusst. Weitere Folgen sind Störungen der Hormonaktivität sowie der Energiebereitstellung und der Protein-Biosynthese. Diese Erkenntnisse wurden überwiegend mit Hilfe von Tierversuchen gewonnen - Ausnahmen bilden hier unter anderem Aflatoxine und Ochratoxin. Deren Einflüsse auf den Menschen wurden im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen tiefgreifend erforscht (Petzinger, 1998; Pitt, 2000).

Viele Mykotoxine erwiesen sich im Tierversuch als hochgradig toxisch, so daß auch von einem negativen Einfluß auf den Menschen auszugehen ist.

Um Schädigungen weitestgehend zu vermeiden, müssen für die einzelnen Toxine Grenzwerte festgelegt werden. Als Voraussetzung für geeignete Grenzwerte muß jedoch die Analytik zum Nachweis dieser Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen noch wesentlich verbessert werden (Müller und Weber, 1996; Krska und Josephs, 2000).

Tabelle 1.1 Übersicht über Wirkung, Vorkommen und klinische Symptome bedeutender Mykotoxine (Roth *et al.*, 1990). Abk.: i.p. = intraperitoneal (in die Bauchhöhle injiziert); KG = Körpergewicht; LD 50 = Letale Dosis eines Giftes, bei der nach einmaliger Gabe 50 % der Versuchstiere innerhalb von 7 Tagen sterben; NOEL = no observed effect level (Dosis eines Giftes, bei welcher noch keine Auswirkungen auf die Gesundheit oder das Verhalten von Versuchstieren zu beobachten sind); p.o. = peroral (durch den Mund verabreicht); VO = Verordnung

Myko-toxine	Wirkung	Vorkommen	Bildner	LD-Wert
<p><b>Aflatoxin B1</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• teratogen, mutagen</li> <li>• Reye-Syndrom (Macholz, 1989)</li> <li>• akut toxisch</li> <li>• Entstehung von Leberzell- und Gallengangskarzinomen</li> <li>• Leberzirrhose (bei Kindern bei tgl. Aufnahme von 9 - 18 µg)</li> <li>• stärkstes pflanzliches Kanzerogen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reis, Nüsse, Leber, Niere (Macholz, 1989)</li> <li>• Erdnüsse, Erdnußschrot, Baumwollsamemehl und andere Ölsaatrückstände, gemahlene Mandeln und Muskatnüsse, Pistazien, Feigen, Getreide, gelegentlich Mais aus feucht - warmen Gebieten</li> </ul>	<p><i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus parasiticus</i></p>	<p><b>letale Dosis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• bei Erwachsenen 1 - 10 mg/kg KG</li> <li>• bei Kindern 9 - 18 µg/d</li> </ul> <p><b>LD 50</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• eintägiges Entenküken p.o. 18,2 µg/50 g KG</li> </ul> <p><b>Höchstmengen-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 µg/kg Aflatoxin B1 und max. 4 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt im Lebensmittel</li> </ul> <p><b>Diät-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• max. 0,05 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder</li> </ul> <p><b>Futtermittel-VO</b> Toleranz für Handelsfutter [mg/kg]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Milchkühe: 0,005</li> <li>• Schweine: 0,02</li> <li>• Mastrinder: 0,05</li> <li>• Geflügel: 0,02</li> </ul>

<b>Myko-toxine</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Bildner</b>	<b>LD-Wert</b>
<b>Aflatoxin B2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hepatotoxisch</li> <li>• kanzerogen</li> </ul>	wie Aflatoxin B1, aber in geringeren Mengen	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	<p><b>LD 50</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• eintägiges Entenküken p.o. 84,4 µg/50 g KG</li> </ul> <p><b>Höchstmengen-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt</li> </ul> <p><b>Diät-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• max. 0,05 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder</li> </ul>
<b>Aflatoxin G1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leber- und Nierenkrebs (weniger wirksam als Aflatoxin B1)</li> </ul>	wie Aflatoxin B1, da mit ihm vergesellschaftet, meist in höheren Konzentrationen	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	<p><b>LD 50</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• eintägiges Entenküken p.o. 39,2 µg/50 g KG</li> </ul> <p><b>Höchstmengen-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt</li> </ul> <p><b>Diät-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• max. 0,05 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder</li> </ul>
<b>Aflatoxin G2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hepatotoxisch</li> <li>• kanzerogen</li> </ul>	wie Aflatoxin B1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	<p><b>Höchstmengen-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt</li> </ul> <p><b>Diät-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• max. 0,05 µg/kg Gesamtaflatoxingehalt in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder</li> </ul>

<b>Myko-toxine</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Bildner</b>	<b>LD-Wert</b>
<b>Aflatoxin M1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leberzirrhose</li> <li>• akute Vergiftungen unbekannt</li> <li>• chronische Vergiftungen in Indien durch Muttermilch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milch von Mensch und Tier, die Aflatoxin B1 über die Nahrung aufgenommen haben</li> <li>• Milchprodukte, Käse, Trockenmilch</li> </ul>	<p><i>Aspergillus flavus</i> (bei der Passage durch den Tierkörper entsteht aus Aflatoxin B1 Aflatoxin M1)</p>	<p><b>LD 50</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• eintägiges Entenküken p.o. 0,8 mg/50 g KG</li> </ul> <p><b>Höchstmengen-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• in Milch und Milcherzeugnissen: 0,05 µg/kg</li> <li>• Österreich : Mykotoxin-VO: Säuglingsnahrung mit 10 ng/kg, Trinkmilch mit 50 ng/kg, Molkenpulver und Trockenmilch mit 400 ng/kg und Käse mit 250 ng/kg reglementiert</li> </ul> <p><b>Diät-VO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• max. 0,01 µg/kg in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder</li> </ul>
<b>Aflatoxin M2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hepatotoxisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milch von Mensch und Tier</li> <li>• Milchprodukte (in wesentlich geringeren Mengen als Aflatoxin M1)</li> </ul>	<p>selten von <i>Aspergillus flavus</i> Isolat; entsteht meist während des Stoffwechsels im Säugetier aus Aflatoxin B2</p>	<p><b>LD 50</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• eintägiges Entenküken p.o. 3,1 mg/50 g KG</li> </ul>
<b>Deoxynivalenol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gastrointestinaltoxin (emetische Wirkung) (Weber, 1993)</li> <li>• verminderte Gewichtszunahme</li> <li>• Hauttoxizität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hart-, Weichweizen, Mais, Gerste, Hafer</li> <li>• in gemäßigttem Klima auf dem Feld und in Verarbeitungsprodukten</li> </ul>	<p><i>Fusarium culmorum</i>, <i>F. graminearum</i> und <i>Fusarium</i> - Arten, die häufig auf Getreide vorkommen</p>	<p><b>NOEL</b> Ratte und Maus p.o. 0,75 mg/kg KG</p>

<b>Myko-toxine</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Bildner</b>	<b>LD-Wert</b>
<b>T2-Toxine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gastrointestinaltoxin (emetische Wirkung) (Dörfel, 1989)</li> <li>• Hauttoxin</li> <li>• alimentäre toxische Aleukie (ATA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gerste, Hirse, Mais</li> </ul>	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. incarnatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichoides</i> ,	<b>LD 50</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• weibl. Ratte: 4 mg/kg KG p.o.</li> <li>• Maus : 7 mg/kg KG p.o.</li> </ul>
<b>Zearalenon</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genitotoxin (Dörfel, 1989)</li> <li>• Umwandlungsprodukte von Zearalenon im Körper sind drei- bis viermal wirksamer als Zearalenon</li> <li>• Östrogen</li> <li>• Unfruchtbarkeit bei Kühen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fast alle Getreidesorten des Anbaugbietes der kühlgemäßigen Klimazone</li> <li>• Gerste, Hafer, Hirse, Mais, Nüsse, Roggen, Sesammehl, Weizen</li> </ul>	Viele Fusarien – Arten z.B. <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. equiseti</i> <i>F. scirpi</i> , <i>F. lateritium</i>	<b>LD 50</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maus: &gt; 2000 mg/kg KG p.o.</li> <li>• &gt; 500 mg/kg KG i.p.</li> <li>• Ratte: &gt; 10000 mg/kg KG p.o.</li> <li>• &gt; 5450 mg/kg KG i.p.</li> </ul>
<b>Ochratoxin A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nephrotoxisch</li> <li>• kanzerogen</li> <li>• teratogen</li> <li>• immunsuppressiv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fast alle Getreidesorten</li> <li>• Kaffee, Wein, Nüsse</li> <li>• Anreicherung in tierischem u. menschlichem Fettgewebe (besonders beim Schwein)</li> </ul>	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	<b>LD 50</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 Tag altes Küken: 3,6 mg/kg KG p.o.</li> <li>• junge Ratte: 20 mg/kg KG p.o. (Scott, 1977)</li> </ul>

### 1.3.1 Das Mykotoxin Deoxynivalenol

Deoxynivalenol (DON) gehört zur Gruppe der Trichothecene. Das Erkrankungsbild, verursacht durch DON, ist durch allgemeine Zytotoxizität und Immunsuppression gekennzeichnet. Selten läßt sich eine Korrelation zwischen kontaminierten Futtermitteln und konkreten Schäden beim Nutztier herstellen (Henkel, 1986).

#### 1.3.1.1 Wirkung bei Schweinen

Bei der Schweinemast ist durch DON-Belastungen im Futter mit großen Einbußen durch verminderte Gewichtszunahme zu rechnen.

Als untere Grenze für eine DON-Intoxikation bei Schweinen mit klinischen Symptomen werden 0,7 mg pro kg Futter angesehen. Verzögerungen bei der Futteraufnahme bis zur Futterverweige-

rungen treten ab 300 mg/kg auf. Dagegen haben Wiederkäuer und Geflügel eine größere Resistenz als Schweine (Trennholm *et al.*, 1984; Hamilton *et al.*, 1985). Beim Schwein stehen bei einer DON-Intoxikation Fruchtbarkeitsstörungen und Futterverweigerungen im Vordergrund, während Erbrechen vergleichsweise selten beobachtet wird (Cote *et al.*, 1984). Bei einer Aufnahme über einen längeren Zeitraum kommt es zu einer negativen Beeinflussung des Immunsystems mit Reduktion der Antikörperbildung, Abnahme der Stimulierbarkeit von B- und T-Lymphozyten, Leukopenie, Hypoplasie der Thymuszellen beim Jungtier sowie Milz- und Lymphknotenhypoplasie (Ueno *et al.*, 1973; Wiskott, 1978; Lafarge-Frayssinett *et al.*, 1979, Tryphonas *et al.*, 1984; Tryphonas *et al.*, 1986).

Tabelle 1.2 Übersicht über die klinischen Symptome nach der Aufnahme von Deoxynivalenol (DON)

<b>Gewicht</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Symptome</b>	<b>Referenz</b>
Schwein k. A.	0,2 mg/kg KG oral	Erbrechen	Forsyth <i>et al.</i> , 1976
k. A.	> 300 mg/kg Futter oral	Schwächeanfälle, Zittern, Erbrechen, blutiger Kot, Gewichtsabnahme	Trennholm <i>et al.</i> , 1983
k. A.	2,5 – 4,0 mg/kg Futter oral	Fortpflanzungsstörungen (z.B. Zyklusstörungen, Aborte, geringe Wurfstärke), Futterverweigerung, Reduktion der Gewichtszunahme, Durchfall	Cote <i>et al.</i> , 1984
30,2 kg	0,5 mg/kg KG intravenös	Speicheln, Erbrechen, Durchfall, Apathie, leichter Tremor	Coppock <i>et al.</i> , 1985
23 kg	3,7 mg/kg Futter, oral	Reduktion der Futteraufnahme um 23 %, Reduktion der Gewichtszunahme	Friend <i>et al.</i> , 1986
trächtig 90 kg	6,2 mg/kg Futter oral	keine	Friend <i>et al.</i> , 1986
Ferkel k. A.	3,6 mg/kg Futter oral	Reduktion der Futteraufnahme um 20 %	Forsyth <i>et al.</i> , 1976

### 1.3.1.2 Wirkungen bei Wiederkäuern

Die Erkenntnisse über die Wirkungen von DON bei Wiederkäuern (besonders beim Rind) sind relativ gering. Bei Kälbern wurde bei der Verabreichung von DON-haltigem Futter gestörtes Allgemeinbefinden beobachtet. King *et al.* (1984) fanden heraus, daß Rinder bis zu 10 mg DON innerhalb von 24 Stunden vollständig in 3,7,15-Trihydroxy-trichothec-9,12-dien-8-on transformieren können, was als Detoxifikationsmechanismus der Wiederkäuer bezeichnet werden kann. Ein weiteres Beispiel stellt die mikrobielle Detoxifikation von DON im Rinderpansen zu DOM-1, dem Deepoxid von DON, dar (Fuchs, 2000; Binder, 1997).

Tabelle 1.3 Klinische Symptome bei Wiederkäuern

Gewicht	Dosierung	Symptome	Referenz
Rind k. A.	66 mg/kg Futter oral, 5 Tage	keine	Cote <i>et al.</i> , 1986
Schaf	4,0 mg/kg KG	keine	Prelusky <i>et al.</i> , 1986
70-80 kg	intravenös 1,32 g/Tag/Tier oral, 3 Tage	Reduktion der Futteraufnahme	

Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt:

- Bei Fütterungsexperimenten von Trennholm *et al.* (1984) wurde Sommerweizen, der DON in einer Konzentration von 6,4 mg pro kg enthielt, an Kühe verfüttert. Es konnte eine reduzierte Futteraufnahme, jedoch keine negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand der Tiere festgestellt werden. Eine verringerte Futteraufnahme und der damit einhergehende Gewichtsverlust sind jedoch wirtschaftlich relevant.
- Nach Verfüttern einer frischen Maissilage traten in einem Tiermastbetrieb mit 30 Tieren plötzlich Durchfallerkrankungen auf. Der Grund war eine DON-Belastung des Futters von 14,5 mg/kg sowie eine T2-Toxin-Belastung von 4,5 mg/kg. Bei den erkrankten Tieren konnte eine Mykotoxikose nachgewiesen werden. Mit Einstellung der Verfütterung von schimmelpilz- und mykotoxinhaltigen Futterkomponenten konnte innerhalb kurzer Zeit eine Besserung der aufgetretenen Probleme beobachtet werden (Schuh und Baumgartner, 1988).

- In einem Versuch, bei dem 66 mg DON pro kg Kraftfutter über 5 Tage verabreicht wurden, konnten keine Wirkungen diagnostiziert werden (Cote *et al.*, 1986). Es wurde ein Metabolit in der Milch, im Kot und im Harn nachgewiesen. 72 Stunden nach oraler Verabreichung von DON im Futter, waren 20 % des verfütterten DON in Harn und Kot in Form von konjugiertem DON nachweisbar.

### 1.3.1.3 Wirkung von Deoxynivalenol auf den Menschen

Der Mykotoxingehalt von Deoxynivalenol (DON) im Tierfutter kann für große wirtschaftliche Einbußen in der Nutztierhaltung verantwortlich gemacht werden. Durch „Carry over“ (Übertragung von Mykotoxinen von der Pflanze über das Nutztier auf den Menschen) besteht für den Menschen ein gesundheitliches Risiko beim Verzehr rückstandsbelasteter Lebensmittel tierischer Herkunft (Reiss, 1992; Müller und Weber, 1989; Weber, 1993).

Erkrankungen beim Menschen, die im Zusammenhang mit dem Toxin stehen, konnten beobachtet werden. Bis jetzt wurde nicht geklärt, ob die Exposition direkt über kontaminierte Pflanzen oder indirekt über belastete tierische Lebensmittel erfolgt. Obwohl DON im Gegensatz zu anderen Mykotoxinen nicht zur Akkumulierung im Gewebe bzw. zur Bildung toxischer Metaboliten neigt, liegt unter Berücksichtigung der massiven Beeinflussung des Schweins durch DON und die Persistenz des Toxins im Futtermittel sowie im menschlichen Organismus die Vermutung nahe, daß der Mensch durch DON-haltige tierische Nahrungsmittel belastet wird (Böhm, 1993; Rotter und Pestka, 1996).

Bisher konnten folgende Wirkungen auf den Menschen beobachtet werden (Pestka *et al.*, 1989):

- Hemmung der DNA-Synthese in den Lymphozyten des Blutes,
- hemmende bzw. stimulierende Wirkung auf das Immunsystem in Abhängigkeit von Dauer und Wirkung der Exposition,
- IgA-Nephropathie (weltweit am häufigsten vorkommende Glomerulonephritis).

In verschiedenen Ländern (z.B. Japan, Indien, China) beobachtete man Mykotoxikosen, die auf DON zurückzuführen sind. In Afrika und China stellte man eine Häufung von Speiseröhrenkrebs fest. Bei betroffenen Personen beobachtete man auch zelluläre Abnormalitäten des Ösophagus. Durch Untersuchungen wurde festgestellt, daß als Ursachen Pilztoxine, Chemikalien und die Lagerbedingungen des Futters für die Nutztiere für den Speiseröhrenkrebs anzusehen sind (Rotter und Pestka, 1996).

### 1.3.2 Biosynthese der Trichothecene

Trichothecene gehören zur Klasse der Sesquiterpene. Sie stellen eine Gruppe von terpenoiden Verbindungen dar, deren Grundstruktur aus 15 C-Atomen aufgebaut ist.

Die Biosynthese der Trichothecene geht aus vom Mevalonsäurepyrophosphat, das durch „Kopf-Schwanz-Kondensation“ von 3 Molekülen Acetyl-CoA über 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA als Zwischenprodukt gebildet wird. Mevalonsäurepyrophosphat geht durch Abspaltung von Kohlendioxid und Wasser in Isopentenylpyrophosphat über, das im Gleichgewicht mit dem isomeren Dimethylallylpyrophosphat steht. 3 Moleküle der Isopreneinheit kondensieren über Geranylpyrophosphat zu Farnesylpyrophosphat, der Vorstufe der Trichothecenbiosynthese (siehe Abbildung 2). Farnesylpyrophosphat wird mit Hilfe des Enzyms Trichodien-Synthase zu Trichodien zyklisiert. Dieses vom *tri5*-Gen codierte Protein ist das einzige Enzym im Biosyntheseweg der Trichothecene, welches bis zum jetzigen Zeitpunkt umfassend charakterisiert wurde. Das Dimer Trichodien-Synthase mit einer Molekülmasse von 45 kDa wurde aus 4 Fusarienspezies inklusive *Fusarium sporotrichioides* isoliert (Hohn und Van Middlesworth, 1986). Im weiteren Verlauf der Biosynthese der Trichothecene sind weitere Enzyme an Oxygenierung, Isomerisierung, Zyklisierung und Veresterung von Trichodien zu Diacetoxyscirpenol, T2-Toxin und 3-Acetyldeoxynivalenol beteiligt (siehe Abbildung 3). Alle makrozyklischen Zwischenprodukte wurden in früheren Studien überprüft und beschrieben (Desjardins *et al.*, 1993). Mittlerweile liegt die DNA-Sequenz für das gesamte Trichothecen-Biosynthese-Cluster vor. Von besonderem Interesse ist das Gen *tri101*, welches für eine 3-O-Acetyltransferase kodiert, die im Zusammenhang mit den Selbstverteidigungsmechanismen von Fusarien steht (Kimura *et al.*, 1998a, 1998b).

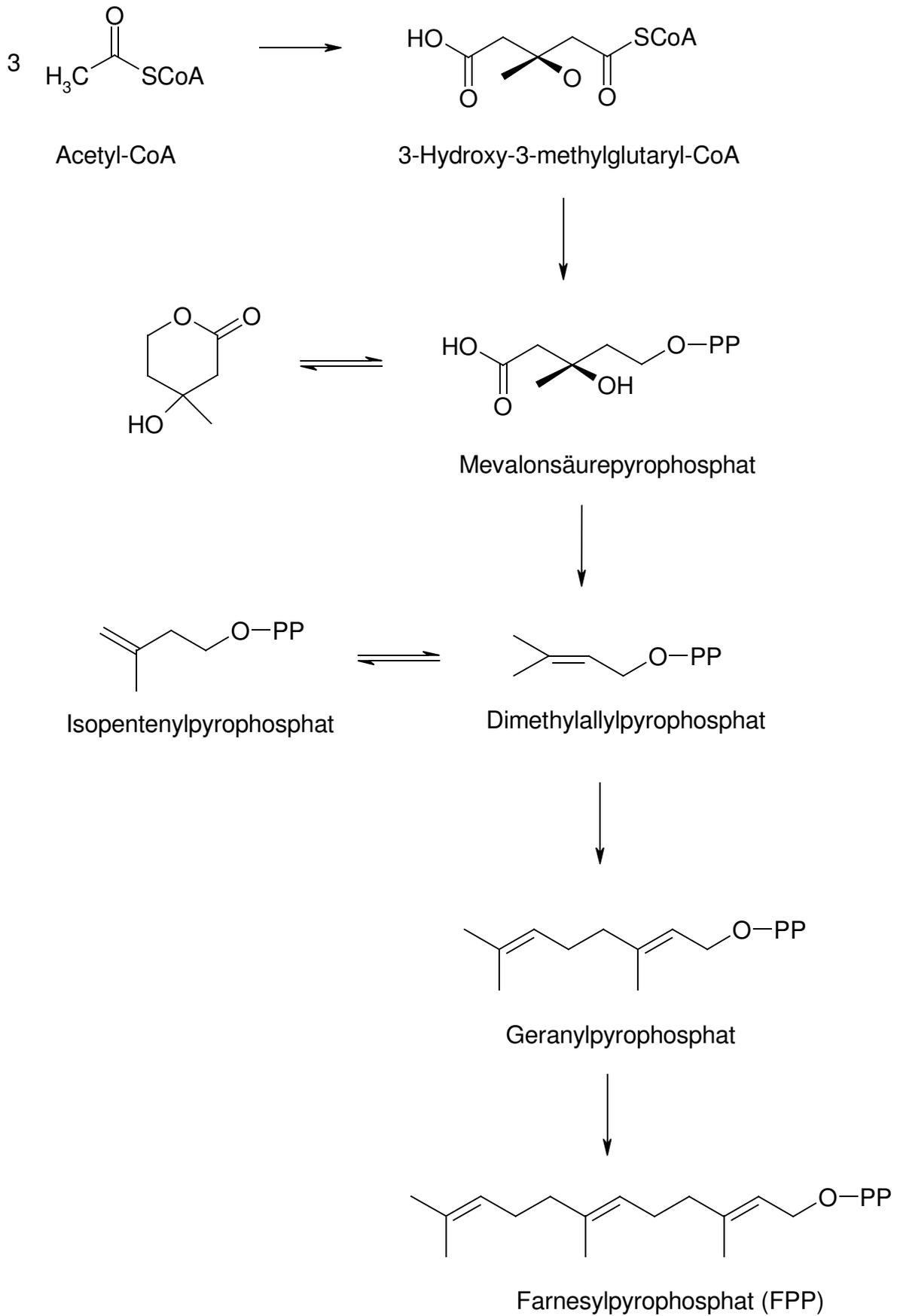


Abbildung 2 Biosynthese von Farnesylpyrophosphat als Vorstufe der Trichothecene

Mit Hilfe von Markierungsexperimenten mit (4R)-[4-<sup>3</sup>H, 2-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>13</sup>C] Mevalonsäure konnte gezeigt werden, daß mit dem enzymatisch induzierten Ringschluß von Farnesylpyrophosphat eine 1,4 Hydrid-Wanderung sowie zwei 1,2 Methyl-Wanderungen erfolgen. Zugleich konnte nachgewiesen werden, daß das C8-Atom des Trichothecengerüstes dem C2-Atom der Mevalonsäure und das C10-Atom dem C4-Atom des Precursors entspricht.

Aufgrund dieser beiden Befunde muß die Biosynthese der Trichothecene vom 6,7-trans-Farnesylpyrophosphat und nicht von der cis-Verbindung ausgehen.

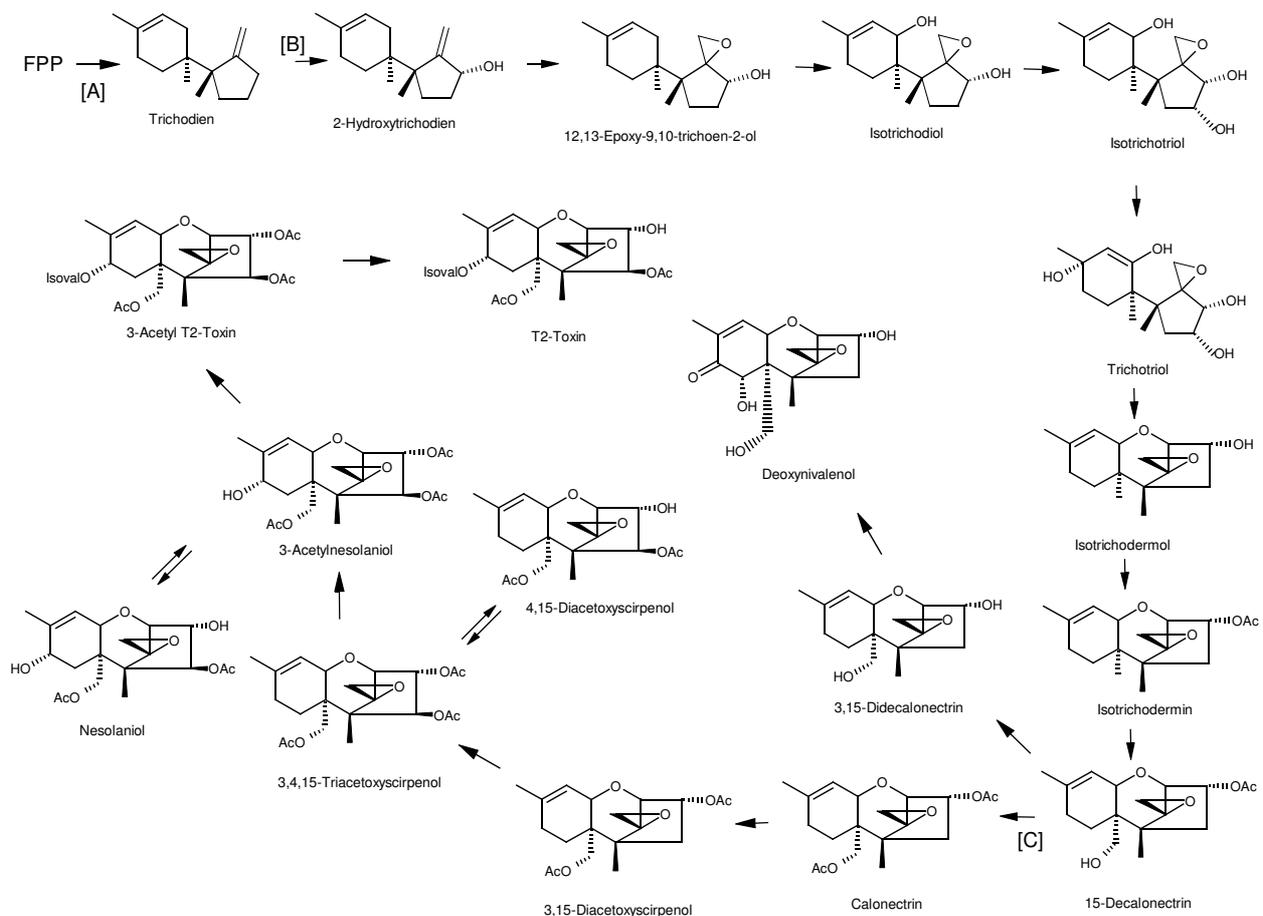


Abbildung 3 Biosyntheseweg der Trichothecene bei *Fusarium*-Spezies. Hierbei beteiligte Gene: [A] *tri5*, [B] *tri4* und [C] *tri3* (Hohn und Beremand, 1989; Alexander *et al.*, 1998)

#### 1.4 Mögliche Ansätze zur Bekämpfung von Fusarien auf Getreide

Zur Vorbeugung der eingangs beschriebenen Probleme können zur Zeit nur strenge Eingangskontrollen bei Getreide und Malz durchgeführt werden. Hierzu werden die „roten Körner“ ausgezählt oder mit deutlich aufwendigeren Analysemethoden das Getreide/Malz untersucht (Niessen, 1993). Zu diesen Analysen zählt das Auslegen der Getreidekörner auf Nährböden, um einen Überblick über den Pilzbefall zu erhalten (Müller, 1995). Zur Mykotoxanalytik werden HPLC „Hochdruckflüssigkeitschromatographie“, Gaschromatographie (zum Teil gekoppelt mit Massenspektrometrie) oder ELISA „Enzyme-linked Immunosorbant Assay“ verwendet. Mit keiner der genannten Methoden ist jedoch auf schnelle Weise eine verlässliche Aussage über den Befallsgrad bzw. ein Rückblick über die Befallsgeschichte einer Partie möglich. Abhilfe schaffen hier Verfahren, die auf der Basis molekularbiologischer Methoden, insbesondere der PCR (Polymerase-Kettenreaktion), einen schnellen, präzisen und sensitiven Nachweis der mykotoxinproduzierenden Pilze direkt im Probenmaterial erlauben.

Neben der Möglichkeit der Vorauswahl unbefallener Partien durch den Einsatz der beschriebenen Maßnahmen zur Wareneingangskontrolle, erscheint jedoch auch die Entwicklung von Verfahren wünschenswert, mit deren Hilfe in befallenen Partien eine nachträgliche Verbesserung der Qualität möglich ist. Der diesen Überlegungen zugrunde liegende gedankliche Ansatz sei hier kurz skizziert.

Der Befall von Getreide durch *Fusarium* spp. auf dem Feld ist stark abhängig von den Klimaverhältnissen während der Vegetationsperiode. Die in Mitteleuropa auftretenden *Fusarium*-Arten bevorzugen dabei feuchte und mäßig warme Klimate. Davon unabhängig erfolgt die Mykotoxinbildung jedoch über einen deutlich weiteren Temperaturbereich (Trissler, 1993). Ausgehend von der Beobachtung schwankender Infektionswerte bei Fusarien stellt sich die Frage nach den Faktoren, die über die herrschenden Witterungsverhältnisse hinaus das Wachstum und die Mykotoxinbildung der Pilze auf befallenem Getreide beeinflussen. Bei nahezu gleichen Witterungsverhältnissen können die Werte für den Fusarienbefall von Standort zu Standort sehr verschieden sein. Auch stellt man fest, daß an ein und derselben Ähre befallene neben gesunden Körnern vorkommen. Wodurch kommen diese Unterschiede zustande?

Zwei mögliche Erklärungen für dieses Phänomen können hier gegeben werden.

- 1) Das Auftreten von natürlich vorkommenden antagonistischen Mikroorganismen im Boden und/oder auf den Ähren verringert das Wachstum und damit die Mykotoxinproduktion durch Fusarien. So wurden bereits durch verschiedene Forschergruppen antagonistische Effekte von Bakterien gegen Pilze wie *F. oxysporum* festgestellt, die durch den Befall von Zierpflanzen

wirtschaftliche Schäden verursachen (Obieglo, 1990; Björnberg, 1993; Bochow, 1988). Auch aus finnischen Arbeiten geht hervor, daß der Zusatz von Milchsäurebakterien, z.B. beim Weichen des Malzes, zu einer Verminderung der Lebendkeimzahlen (CFU, Colony Forming Units) von *Fusarium*-Arten und einer Verringerung der Mykotoxingehalte führt (Laitila, 1993).

Der Mechanismus, der dem beobachteten Phänomen zugrunde liegt, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Diskutiert wird die Bildung niedermolekularer Verbindungen mit antifungischen Eigenschaften durch die eingesetzten Kulturen. So wurden Verbindungen wie Benzoesäure, 5-Methyl-2,4-imidazolidindion und 3-(2-Methylpropyl)-2,5-piperazindion in den Kulturüberständen nachgewiesen (Niku-Paavola, 1999). Diese Verbindungen wurden von den eingesetzten Bakterien gebildet und besitzen antimikrobielle Eigenschaften.

In anderen Arbeiten konnte die Bildung von Proteinen mit antimikrobieller Wirkung durch *Lactobacillus casei* nachgewiesen werden (Gourama, 1997). Ein weiterer antifungischer Effekt konnte bei Pflanzen beobachtet werden. In Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen wird eine Abwehrreaktion der Pflanze gegen Schädlinge induziert (Hammerschmidt, 1995). Auch durch bioaktive Substanzen wie dem synthetischen Zucker Chitosan kann eine Abwehrreaktion der Pflanze gegen Schädlinge hervorgerufen werden. Durch dieses Kohlenhydrat werden Enzyme zur Schädlingsbekämpfung in der Pflanze aktiviert. Chitosan selbst ist für Pilze im Stoffwechselweg nicht verwertbar (ARS News, 16.12.99).

- 2) Bei vergleichbarer Pilzbiomasse können unterschiedlich hohe Mengen an Mykotoxinen meßbar sein. Auch hier ist eine Beteiligung von Mikroorganismen denkbar, die toxische Substanzen verstoffwechseln oder in Form einer Bindung an höhermolekulare Substanzen maskieren (Böswald, 1995; Laitila, 1997).

In Arbeiten anderer Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, daß eine Verminderung der Mykotoxinwerte nicht gleichbedeutend mit einem Abbau der Mykotoxine ist. Mykotoxine können durch Zucker maskiert und nach enzymatischer Spaltung dieser glykosidischen Bindung wieder freigesetzt werden (Böhm-Schraml, 1999; Stettner, 2001). Darüber hinaus sind manche Bakterien in der Lage, Mykotoxine zu verstoffwechseln (Megharaj, 1997). Hier werden Mykotoxine nicht maskiert, sondern zu nichttoxischen Verbindungen umgebaut. Ein bekanntes Beispiel stellt die mikrobielle Detoxifikation von DON im Rinderpannen zu DOM-1, dem Deepoxid von DON, dar (Fuchs *et al.*, 2000; Binder *et al.*, 1997). Bisher konnten solche vielversprechenden Mikroorganismen aus diesem komplexen Lebensraum jedoch nicht isoliert werden, da sie wegen ihrer strikt anaeroben Lebensweise nur sehr schwer im Labor zu handhaben sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein verstärktes Augenmerk auf die Milchsäurebakterien und im speziellen auf die Gattung der Laktobazillen gerichtet da für diese Untersuchungen auf eine hem-

mende Wirkung beim Wachstum von Fusarien auf eine umfangreiche Lehrstuhleigene Stammsammlung zurückgegriffen werden konnte.

## 1.5 Milchsäurebakterien

Die Gruppe der Milchsäurebakterien ist charakterisiert durch morphologisch uneinheitliche, grampositive, unbewegliche und Katalase-negative Bakterien. Innerhalb dieser heterogenen Gruppe stellt die Ausscheidung von Milchsäure das verbindende Element dar. Bevorzugte natürliche Standorte sind: intakte und sich zersetzende Pflanzenteile, Darm und Schleimhäute von Mensch und Tier sowie Verarbeitungsstätten von Milch (Teuber, 1993).

Phylogenetische Stammbäume auf der Basis von 16S-rRNA-Sequenzen ermöglichen die Gruppierung der Milchsäurebakterien in gegenwärtig 13 Haupt-Gattungen: *Aerococcus*, *Lactosphaera*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Melissococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Alloiococcus* und *Dolosigranulum* mit DNA G+C Gehalten unter 54 % (Clostridium-Ast) sowie der Gattung *Bifidobacterium* als Vertreter der Organismen mit hohem DNA G+C Gehalt (Actinomyceten-Ast) (Schleifer und Ludwig, 1995).

### 1.5.1 Die Gattung *Lactobacillus*

Die Gattung *Lactobacillus*, erstmals von den Laktokokken differenziert durch Beijernick (1901), stellt unter den Milchsäurebakterien die zahlenmäßig größte Vertreterin dar. Sie beinhaltet mehr als 56 gültig beschriebene Spezies, verteilt auf drei Gruppen: *L. delbrueckii* Gruppe, *L. casei-Pediococcus* Gruppe und *Leuconostoc* Gruppe (Hammes und Vogel, 1995).

Alle Spezies zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus: grampositiv, nicht sporenbildend, Katalase-negativ, unbewegliche Stäbchen oder Kurzstäbchen. Sie bilden oft Ketten, sind chemoorganotroph, besitzen hohe Nährstoffansprüche, benötigen mindestens eine fermentierbare Kohlenhydratquelle, können normalerweise kein Nitrat reduzieren und besitzen weder Cytochrome noch Porphyrine. Homofermentativ produzieren sie hauptsächlich (mind. 85 %) Milchsäure (Hammes und Vogel, 1995), heterofermentativ zusätzlich Essigsäure, Ethanol und Kohlendioxid. Wachstum findet unter anaeroben Bedingungen statt. Teilweise kann verbessertes Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen beobachtet werden. Leicht saure Bedingungen (pH 4) werden bevorzugt. Die Zellwände der meisten Laktobazillen enthalten Peptidoglykan vom Typ L-Lys-D-

Asp. In einigen Fällen kann Lysin und Ornithin gefunden werden, oder Diaminopimelinsäure fungiert als direktes Bindeglied der Peptidoglykanketten (Kandler und Weiss, 1986; Collins *et al.*, 1991; Hammes *et al.*, 1992; Schleifer und Ludwig, 1995).

Der Einsatz von Milchsäurebakterien inklusive Laktobazillen stellt aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung antimikrobieller Substanzen (z.B. Wasserstoffperoxid, Benzoesäure, Diacetyl, Reuterin, Bakteriozine, organische Säuren wie Essig- und Milchsäure, Reutericyclin) einen wichtigen Beitrag zur Produktion sicherer Lebensmittel dar (Daeschel, 1989; Hammes und Tichaczek, 1994, Gänzle *et al.*, 2000).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Mikroorganismen, die aus einem Getreidehabitat isoliert wurden, bei Versuchen *in vitro* und *in vivo* auf ihre Fähigkeit zur Hemmung des *Fusarium*-Wachstums beziehungsweise der Mykotoxinbildung untersucht werden. Bakterien aus diesem Habitat besitzen eine Vielzahl von möglichen Stoffwechselwegen. Damit sind sie in der Lage, sich an veränderte Bedingungen schnell anzupassen und auf eine Nährstoffkonkurrenz durch Pilzbefall zu reagieren. Es war daher wahrscheinlich, auf der Getreidepflanze oder im Prozeß der Malzbereitung Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Verminderung des Fusarienwachstums beziehungsweise der Mykotoxinbildung zu finden und zu identifizieren.

Verschiedene Bodenproben und Pflanzenteile sollten auf das Vorkommen antagonistisch wirksamer Mikroorganismen untersucht werden. Da bei verschiedenen Milchsäurebakterien Hinweise auf eine fungistatische oder fungizide Wirkung sowie die Fähigkeit zum Abbau von Mykotoxinen *in vitro* beschrieben wurde, sollte das Screening auf Antagonisten auch auf die institutseigene umfangreiche Sammlung von Milchsäurebakterien ausgedehnt werden (El-Nezami, 1998; Gourama, 1997; Kurzak *et al.*, 1998). Dabei ist von besonderer Bedeutung, daß die meisten dieser Stämme aus Getreidefermentationen isoliert wurden. Aus den oben genannten Gründen konnte hier mit Mikroorganismen gerechnet werden, welche eine Hemmwirkung auf das Wachstum von Fusarien ausübten und/oder zu einer Verstoffwechslung von Mykotoxinen in der Lage waren.

Als Ziel wurde ein Einsatz von antagonistisch wirksamen Mikroorganismen bei der Mälzung von Gerste und Weizen angestrebt. Da es sich bei der Mälzung um einen lebensmitteltechnologischen Prozeß handelt, war von Bedeutung, daß die untersuchten Mikroorganismen zu den Laktobazillen gehörten und damit als „GRAS“ (generally recognized as safe) eingestuft wurden. Aufgrund dieses Sachverhaltes wurde ein verstärktes Augenmerk auf Laktobazillen gelegt. Sporenbildende Bakterien und ubiquitär verbreitete Bodenmikroorganismen sollten wegen ihrer zum Teil pathogenen Eigenschaften nur in den vergleichenden Screening-Studien einbezogen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Laborgeräte sind zusammenfassend in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Verwendete Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	B 5042 E	Heraeus Instruments GmbH
Brutschrank	CERTOMAT® BS-1	B. Braun Biotech International
Brutschrank	UE 500	Memmert GmbH & Co. KG
Bad/Umwälzthermostat	MA 6 B	Lauda
Dampfsterilisator	Modell H-Lösungen	Webeco GmbH
Hochdrucksterilisator	Sanoclav LaM-201	Adolf Wolf SANOclav
HPLC	s. 2.1.2	Gynkotek
Membran-Vakuumpumpe	ME4	Vakuubrand GmbH & Co.
pH-Meter	Mikroprozessor-pH-Meter761 calimatic	Knick
Reinstwassersystem	RS 90-4 / UF	SG Wasseraufbereitung u Re- generierstation GmbH
Sicherheitswerkbank	HERA Safe	Heraeus
Spektrophotometer	Biochrom 4060	Pharmacia Biotech Norden AB
Sterilschrank	SLP 500	Memmert GmbH & Co. KG
Tischzentrifuge	1 K 15	Sigma Laborzentrifugen
Vakuum- und Brutschrank	VT 5042 EK/N <sub>2</sub>	Heraeus Instruments GmbH
Vakuumzentrifuge	Maxi dry plus / Iyo	Heto Lab Equipment A/S
Vibrationsschüttler	Vortex Genie2 G560-E	Scientific Industries, Inc.
Analysenwaage	BP 210 S	Sartorius AG
Waage	SBA 52	Scaltec
Waage	SAC 63	Scaltec

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Wasser-Ionenaustauscher	SG 2000	SG Wasseraufbereitung u. Regenerierstation GmbH
Wasserbad-Thermostat	MD-19 A	Julabo
Wasserenthärtung	C 16-100	SG Wasseraufbereitung u. Regenerierstation GmbH
Wasserfiltrations- und Entsalzungsanlage	EuRO-25	SG Wasseraufbereitung u. Regenerierstation GmbH
Zentrifuge	Z E2 K	Hermle Labortechnik GmbH
Ultraschallprozessor	UP 200s	dr. hielscher GmbH
Ultraschallprozessor	UP 50H	dr. hielscher GmbH
Ultra Turrax	Art Micra D-8	Moderne Labortechnik, Mühlheim
Tischzentrifuge	Sigma 112	B. Braun Biotech International
Vibrationsschüttler	MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co.KG
Überkopfschüttler	REAX 2	Heidolph
Getreidestecher	Probesteher nach Barth	Glasbläserei d. VLSF
Rotationsverdampfer	Vaccumcontroller	Neuberger
	Laboport	Neuberger
	VV 2000	Heidolph
	WB 2000	Heidolph

### 2.1.2 HPLC-Komponenten

Probengeber:	GINA 50; Gynkotec
Entgasung:	Degasser; Gynkotec
Pumpe:	High Precision Pump Model 480; Gynkotec
Trennsäule:	LUNA 5u, C18(2), 250×4,6 mm; phenomenex
Säulenofen:	Kühlofen Modell K-5, Techlab
Detektion:	UV-Detektor UVD 320S; Gynkotec Spectrofluorometric Detector RF-551; Shimadzu
Auswertungssoftware:	Chromeleon Client Version 4.12A Build 301

### 2.1.3 Elektrophorese-Komponenten

Spannungsquelle:	Power supply PPS 200-10, MWG-Biotech
Gel-Kammer:	12 × 14 cm, MWG-Biotech
Gel-Dokumentation:	Herolab E.A.S.Y. Store, Geldokumentationssystem E.A.S.Y. 429 K Kamera UV-Licht Transilluminator UVT 28 M

## 2.2 Mikroorganismen und Stammhaltung

### 2.2.1 Mikroorganismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2 : Verwendete Organismen

<b>Organismus</b>	<b>Stammbezeichnung</b>
<i>Bacillus licheniformis</i>	Jord B
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM347
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Jord D
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Jord C
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Jord A
<i>Fusarium crookwellense</i>	TMW4.0171
<i>Fusarium culmorum</i>	DSM62191
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW4.0547
<i>Fusarium equiseti</i>	TMW4.0242
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM4527
<i>Fusarium poae</i>	TMW4.0213
<i>Fusarium poae</i>	TMW4.0216
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	TMW4.0320
<i>Fusarium tricinctum</i>	TMW4.0257
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	TMW1.988
<i>Lactobacillus animalis</i>	TMW1.972
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LTH2354
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.25

<b>Organismus</b>	<b>Stammbezeichnung</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.281
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.289
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.294
<i>Lactobacillus pontis</i>	TMW1.1101
<i>Lactobacillus reuteri</i>	LTH2584
<i>Lactobacillus reuteri</i>	TMW1.55
<i>Lactobacillus reuteri</i>	TMW1.970
<i>Lactobacillus reuteri</i>	TMW1.975
<i>Lactobacillus salivarius</i>	TMW1.962
<i>Lactobacillus salivarius</i>	TMW1.992
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	ATCC27651
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.726
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.854
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.855
<i>Lactobacillus spec.</i>	TMW1.81
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Li2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM20336 <sup>T</sup>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LTH520
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TMW2.149
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TMW2.8
<i>Pichia anomala</i>	DSM70263
<i>Pichia fermentans</i>	DSM70090
<i>Pichia membranaefaciens</i>	DSM70366 (TMW3.017)
<i>Pichia membranaefaciens</i>	TMW3.076
<i>Pichia membranaefaciens</i>	DSM70169
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DSM50170 <sup>T</sup>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DSM8573
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	TMW2.418
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	TMW1.1001
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	TMW1.101
<i>Weissella paramesenteroides</i>	TMW1.983

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Gewebekulturen, Braunschweig

TMW: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie TUM, Weihenstephan

LTH: Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim

ATCC: American Type Culture Collection

### 2.2.2 Stammhaltung

Die Bakterienkulturen wurden bei -75 °C in den jeweils optimalen Nährlösungen mit 40 % (v/v) Glycerin gehalten. Pilzkulturen wurden in 2 % Malzextraktbouillon mit porösem Leca-Granulat (ca. 5 mm Korngröße) bei Raumtemperatur kultiviert. Aus den ausgewaschenen Kulturen wurde Granulat in steriles 80 % (v/v) Glycerin gegeben und bei -75 °C eingefroren.

### 2.2.3 Versuchsmaterial Getreide

Als Versuchsmaterial wurde während der Getreideblüte mit *Fusarium culmorum* infiziertes Getreide verwendet. Die Infizierungen wurden von der Bundesanstalt für Saatzucht/Resistenzgenetik, Grünbach bei Erding, durchgeführt.

Bei dem verwendeten Getreide handelte es sich im einzelnen um:

- Winterweizen Ernte 1998 (100 kg Gemisch aus verschiedenen Sorten)
- Sommergerste Ernte 1998 (100 kg Gemisch aus verschiedenen Sorten)

Alle Getreidesorten wurden mit einem Gemisch aus 20 Stämmen *Fusarium culmorum*, mit unterschiedlicher Virulenz, infiziert.

### 2.2.4 Chemikalien und Lösungen

3-Acetyl-Deoxynivalenol, Sigma

Acetonitril, Baker

Deoxynivalenol, Sigma

Kalbsthymus DNA, Sigma

Methanol, Baker

Polyvinylpyrrolidon, Sigma

Wasser für die Molekularbiologie, Fluka

Zearalenon, Sigma

Alle hier nicht erwähnten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

**2.2.4.1 TE-Puffer für Fluoreszenzmessungen**

Tris-HCl (10 mM)	1,58 g
EDTA (1 mM)	0,37 g
pH-Wert	7,5
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

**2.2.4.2 Lysepuffer 3,3fach**

EDTA (20 mM)	24,56 g
Tris (10 mM)	4,03 g
Triton X-100 (1 %)	33,0 g
Guanidin-HCl (500 mM)	157,6 g
NaCl (250 mM)	48,21 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1,0 L

**2.2.4.3 TBE-Puffer (10fach konzentriert)**

Tris (1 M)	108,0 g
Borsäure (0,83 M)	55,0 g
EDTA (0,5 mM, pH=8,0)	40,0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

vor Gebrauch mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 0,5fache Konzentration verdünnen

**2.2.4.4 Ethidiumbromid**

Ethidiumbromid	1,0 µg/mL in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
----------------	---

### 2.2.4.5 Stopppuffer

25 % (w/v) Ficoll 400 (Sigma, Deisenhofen)

50 mM EDTA

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

Der Stopppuffer wird in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst.

### 2.2.5 Nährmedien

#### 2.2.5.1 Waksman-Agar

(Huber *et al.*, 1987)

Fleischextrakt	3,0 g
Bacto-Pepton	5,0 g
NaCl	5,0 g
Tween80	1,0 g
D(+)-Glucose	10,0 g
Agar-Agar	20,0 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	1,0 L
pH-Wert	6,8

Sterilisation: 30 min, 121 °C

#### 2.2.5.2 MRS-Bouillon bzw. MRS-Agar

(modifiziert nach De Man *et al.*, 1960)

MRS-Bouillon:

Fleischextrakt	2,0 g
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	10,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Tween80	1,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	2,5 g
(oder $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,8 g

---

Na-Acetat×3H <sub>2</sub> O	5,0 g
di-Ammoniumhydrogencitrat	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,05 g
(oder MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	0,038 g)
D(+)-Glucose	20,0 g
(oder D(+)-Glucose×H <sub>2</sub> O	22,0 g)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

Sterilisation: 15 min, 121 °C

MRS-Agar:

MRS-Bouillon	1,0 L
Agar-Agar	15,0 g

### 2.2.5.3 Bakteriocin-Screening-Medium (BSM)

Fleischextrakt	10,0 g
Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)	2,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Tween80	1,0 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -H-Citrat	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,05 g
D(+)-Glucose	2,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

Sterilisation: 15 min, 121 °C, pH 6,4 - 6,5

Die Zugabe von sterilfiltrierter Katalase (Sigma, Deisenhofen) zum autoklavierten Medium erfolgte nach dem Abkühlen auf 50 °C, so daß eine Endkonzentration von 1 mg Katalase/mL vorhanden war.

#### 2.2.5.4 Verdünnungslösung zur Keimzahlbestimmung

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	1,5 g
NaCl	8,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

Sterilisation: 15 min, 121 °C

#### 2.2.5.5 Kartoffel-Dextrose-Agar (Potato Dextrose Agar, PDA)

PDA ist besonders zur Beurteilung von Farben der Kulturober- und -unterseiten bei *Fusarium*-Arten geeignet.

Kartoffeln	200,0 g
D(+)-Glucose	20,0 g
Agar-Agar	20,0 g
H <sub>2</sub> O	1,0 L

Kartoffeln schälen, waschen und in Würfel (ca. 2 cm) schneiden. Anschließend 1 h kochen und durch ein feines Sieb abgießen. Keine neuen Kartoffeln verwenden! Glucose und Agar-Agar zugeben, lösen und 15 min autoklavieren.

#### 2.2.5.6 Synthetischer nährstoffarmer Agar (SNA)

SNA ist ein Magernährboden, auf dem *Fusarium*-Arten sehr leicht zur Ausbildung typischer Konidienformen gebracht werden können.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KNO <sub>3</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
D(+)-Glucose	0,2 g
Saccharose	0,2 g
Agar-Agar	20,0 g

H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 1,0 L

Salze in wenig H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen, Agar lösen und mit dem restlichen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auffüllen. 20 min autoklavieren.

### 2.2.5.7 Nelkenblatt-Agar (Carnation Leaf Agar, CLA)

Bei CLA handelt es sich um einen Nährboden, auf dem *Fusarium*-Arten sehr gut zur Sporulation gebracht werden können. Die Konidienformen entsprechen denen auf natürlich infizierten Substraten. Der Nährboden ist besonders für die Artdifferenzierung geeignet.

Agar-Agar	20,0 g
H <sub>2</sub> O	1,0 L
Nelkenblätter	4-5 Stück

Agar in Wasser lösen und 15 min autoklavieren. Je 5 Nelkenblattstücke in eine Petrischale legen und mit dem noch heißen Wasseragar überschichten. In der Regel werden Petrischalen mit 6 cm Durchmesser verwendet.

### 2.2.5.8 YPG-Agar

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
D(+)-Glucose	20,0 g
Agar-Agar	15,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L
pH-Wert	6,5

Sterilisation: 15 min, 121 °C

**2.2.5.9 Selektiver Fusarien-Agar**

D(+)-Glucose	20,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Hefeextrakt	1,0 g
1 % FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1,0 mL

Sterilisation: 15 min, 121 °C

Nach dem Autoklavieren dazugeben:

Aureomycin	10,0 mg
Streptomycinsulfat	100,0 mg
Dichloran 1 % in H <sub>2</sub> O	5,0 mL

**2.2.5.10 Pepton-PCNB-Agar**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1,0 g
Pepton	15,0 g
Agar-Agar	20,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L
Pentachlornitrobenzol (PCNB)	0,75 g

Sterilisation: 15 min, 121 °C

PCNB in wenig Toluol lösen und zum heißen Agar bereits vor dem Autoklavieren geben. Nach dem Autoklavieren wird 1,0 g Streptomycinsulfat zugefügt. Um das wasserunlösliche PCNB anschließend gut verteilen zu können, muß der Agar beim Abfüllen in Petrischalen ständig gerührt werden.

### 2.2.5.11 Mannit-PCNB-Agar

Dieser Nährboden wird zum selektiven Nachweis von *Fusarium graminearum* verwendet.

Mannit	2,0 g
Agar-Agar	20,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

Sterilisation: 15 min, 121 °C

Zum ca. 60 °C warmen Agar werden nach dem Autoklavieren als Antibiotika je 30 mg/L Aureomycin und Streptomycinsulfat sowie als Fungizid entweder 1 g/L PCNB (Pentachloronitrobenzol) oder 2 mg/L Dichloran (2,6-Dichloro-4-nitroanilin) steril zugegeben.

### 2.2.5.12 Mannit-Malachitgrün-Agar

Dieser Nährboden findet Verwendung beim selektiven Nachweis von *Fusarium culmorum*.

Mannit	2,0 g
Agar-Agar	20,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,0 L

Sterilisation: 15 min, 121 °C

Zum ca. 60 °C warmen Agar werden nach dem Autoklavieren als Antibiotika je 30 mg/L Aureomycin und Streptomycinsulfat sowie als Fungizid 15,62 mg/L Malachitgrün steril zugegeben.

## 2.3 Bakteriozin-Assay

Zur Identifizierung von Bakteriozinproduzenten unter den Milchsäurebakterien wurde von Tichaczek *et al.* (1992) ein spezielles Bakteriozin-Screening-Medium durch Modifikation des MRS-Mediums entwickelt. Durch den Einsatz des Mediums können andere Hemmeffekte auf die Indikatororganismen, wie Wasserstoffperoxid und/oder Säure ausgeschlossen werden. Der Zusatz von Katalase soll eventuell gebildetes Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbauen. Der geringe Gehalt an Glucose und das gewählte Puffersystem soll eine Hemmung des Indikators durch Säurebildung verhindern.

### 2.3.1 Agar-Diffusions-Test

Das Prinzip des Agar-Diffusions-Test beruht auf der Abgabe von Bakteriozinen in das Medium. Aus diesem Grund wird der Kulturüberstand für diesen Test verwendet. Die Bakteriozine diffundieren in den Agar und es kommt zur Ausbildung von Hemmhöfen. Folgende Vorgehensweise wurde gewählt:

- zellfreien Kulturüberstand einer ÜN-Kultur herstellen
- 1 mL zellfreien Überstand in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C, 150 min und 1 mbar auf 0,1 mL aufkonzentrieren
- in BSM-Nährstoffplatten Löcher mit 7 mm Durchmesser ausstechen
- 50 µL der Kulturüberstände bzw. der konzentrierten Kulturüberstände in die Löcher pipettieren und eindiffundieren lassen
- BSM-Nährstoffplatten mit 7 mL verflüssigtem Überschicht-Agar überschichten, der zuvor mit 140 µL ÜN-Kultur eines Indikatororganismus (*Bacillus subtilis* DSM347) versetzt wurde
- Vermessen der Hemmhofdurchmesser um die ausgestanzten Löcher

### 2.4 Isolierung der Antagonisten

Unter Verwendung einer nach Herr (1959) veränderten Mehrschichtagarmethode wurden Proben vom Boden und den sich darin entwickelnden Gerstenpflanzen auf hemmstoffproduzierende Mikroorganismen untersucht, die in der Lage waren, das Wachstum von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* zu hemmen.

Dazu wurden Pflanzen aus dem Freiland samt ihren Wurzeln ausgegraben und der größte Teil der Erde abgeschüttelt. In 500-mL-Bechergläsern wurde die etwas fester anhaftende Rhizosphärenerde (ca. 10-15 g) mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült und suspendiert. Die von Erde befreiten Wurzeln wurden in weiteren 50 mL isotonischer Kochsalzlösung mit einem Dispersionsgerät, Ultra Turrax (Moderne Labortechnik, Mülheim), homogenisiert.

Nach geeigneter Verdünnung wurde je 1 mL Homogenat mit 9 mL Agarmedium (45 °C) in Plastikpetrischalen vermischt. Als Medium fand Waksman-Agar (Huber *et al.*, 1987) pH 6,8 Verwendung. Nach dem Erkalten des Agars wurde jede Platte mit weiteren 4 mL des sterilen Agarmediums überschichtet, um Wachstum auf der Oberfläche zu verhindern. Nach 48 h bei 20 °C wurden alle Platten mit je 5 mL Waksman-Agar überschichtet, der 10<sup>4</sup> Konidien der Testpilze *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* pro mL Agar enthielt.

Nach weiteren 48 h bei 20 °C wurden Kolonien, die von einem klaren Hemmhof im Testpilzrasen

umgeben waren, mit einer Impföse abgestochen und auf entsprechendem Agarmedium ausgestrichen. Durch wiederholtes Überimpfen und Vereinzeln wurde eine Reinkultur jedes antagonistischen Isolates hergestellt.

## 2.5 Agarkultur der Antagonisten mit verschiedenen Testorganismen

Bei der Verwendung von Pilzen als Testorganismen (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium avenaceum*) wurde das wirkstoffproduzierende Bakterium in der Mitte einer Petrischale (Waksman-Agar) strichförmig aufgeimpft. Nach 72 h bei Raumtemperatur wurde auf jede Seite des Impfstriches je einer der Testpilze in Form eines Agarscheibchens (Ø 5 mm) in 30 mm Entfernung aufgeimpft. Nach weiteren 7 Tagen bei Raumtemperatur, während der ungehemmte Testpilzkolonien bereits die Plattenmitte erreicht hatten, wurde der Hemmhof als Abstand zwischen Koloniefrente des Testpilzes und dem Rand des strichförmig gewachsenen Antagonisten gemessen.

Außerdem wurde die dem wirkstoffproduzierenden Mikroorganismus zugewandte Koloniefrente des Testpilzes lichtmikroskopisch nach morphologischen Veränderungen der Hyphen untersucht. Bei der Testung der antagonistischen Mikroorganismen gegen Fusarien wurde 7 Tage nach der Ausmessung der Hemmzone festgestellt, ob diese konstant geblieben war oder sich verringert hatte.

## 2.6 Saatgutbehandlung mit Antagonisten

Zunächst wurden alle gemäß 2.4 isolierten antagonistischen Mikroorganismen in je 20 mL Standard I-Nährlösung pH 7,0 für 20-48 h (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) angezogen. Gerstensenen der Sorte „Alexis“, welche zunächst 3 min in 1 % NaOCl oberflächensterilisiert und anschließend achtmal in sterilem Wasser gewaschen wurden, wurden 15 min in einer Suspension des jeweiligen Antagonisten geschüttelt. Die auf diese Weise mit den Antagonisten ummantelten Samen wurden dann auf Filterpapier 2-3 h getrocknet. Die Samen für die Kontrollansätze wurden in einer Standard I-Nährlösung geschüttelt.

## 2.7 Untersuchungen zur Mykoflora von Getreide

Für diese Untersuchungen wurden SNA-Nährböden mit Zusatz von Antibiotika und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Hemmstoff der pflanzlichen Keimung) verwendet (siehe 2.2.5.6).

### Auslegen von Getreide nach Oberflächendesinfektion

- ca. 100 g Getreide wurden für 10 min mit NaOCl (1 % aktiver Chlorgehalt) in einem 250-mL-Scheidetrichter mit Stopfen inkubiert. Während der Inkubation wurde mehrmals geschüttelt.
- Die Probe wurde 2× mit sterilen H<sub>2</sub>O im Scheidetrichter gewaschen.
- Der Inhalt des Scheidetrichters wurde in einer LAF auf sterile Papiertücher ausgeleert und mit sterilen Papiertüchern trockengetupft.
- Je Probe wurden 100 zufällig gewählte Körner zu je 5 Stück auf SNA (mit Zusatz von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) ausgelegt. Dabei wurde auf möglichst großen Abstand zwischen den Körnern geachtet.
- Die Proben wurden 14 Tage bei 17 °C in einem klimatisierten Raum inkubiert. Zur Förderung der Sporulation von *Fusarium*- und anderen Pilzarten wurde während der 12-stündigen Tagphase neben weißem Licht auch UV-Licht (365 nm) appliziert.

### Auswertung des Pilzbefalls

- Die Auswertung des Pilzbefalles wurde direkt von der geöffneten Petrischale bei 100facher Vergrößerung im Durchlichtmikroskop durchgeführt.
- Zur Artbestimmung morphologisch zweifelhafter Isolate wurden mikroskopische Präparate in H<sub>2</sub>O hergestellt und mikroskopiert.

Als Maß für die Befallsstärke wurde für jede Art der Prozentsatz befallener Körner angegeben.

## **2.8 Keimzahlbestimmung von Fusarien auf Getreide**

### **2.8.1 Bestimmung der Keimzahlen auf der Kornaußenseite**

10 g Getreide wurden in Schraubflaschen mit 90 mL physiologischer Kochsalzlösung gegeben und 20 min gut geschüttelt (200 U/min). Anschließend wurden 2 mL vom Überstand entnommen, in 18 mL Kochsalzlösung gegeben und folgende Verdünnungsreihen angesetzt

1:100

1:1000

1:10000

Es wurden je Verdünnung 5 Petrischalen mit 1 mL bzw. 2 mL angeimpft und mit Agar (siehe 2.2.5.12) überschichtet. Die Proben wurden bei 25 °C für 3-5 Tage im Dunkeln inkubiert. Der Befallsgrad wurde in CFU/g angegeben.

### **2.8.2 Bestimmung der Keimzahlen im Korninneren**

10 g Getreide wurden mit 70 %igem Isopropanol 1 min überschichtet. Die Oberflächen mit NaOCl (1 % aktiver Chlorgehalt) desinfiziert, trockengetupft mit sterilem Papier und mit dem Ultra Turrax 15-30 s bei höchster Stufe zerkleinert. Jeweils 1 mL wurden in 10 Petrischalen verteilt und mit ca. 55 °C warmem Agar überschichtet. Die Probe dabei möglichst gleichmäßig verteilt.

Für die Bestimmung von *Fusarium culmorum* auf Getreide wurde Mannit-Malachitgrün-Agar (siehe 2.2.5.12) verwendet. Die Proben wurden bei 25 °C für 3-5 Tage im Dunkeln inkubiert. Der Befallsgrad wurde in CFU/g angegeben.

## 2.9 Isolierung und Reinigung von DNA

### 2.9.1 DNA-Isolierung mit „Puregene DNA Isolation Kits“

#### Lyse der Zellen

- 1 mL einer frischen ÜN-Kultur wurde in ein 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt, und 5 min bei 13000-15000×g zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Der Überstand wurde verworfen.
- Nach Zugabe von 600 µL „Cell Lysis Solution“ wurde die Probe mit der Pipette mehrmals durchmischt, anschließend bei 80 °C 5 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren und danach auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### RNase-Behandlung

- Zum Zellysat wurden 3 µL „RNase A Solution“ hinzugegeben und nach Durchmischen bei 37 °C 30 min inkubiert.

#### Fällung von Proteinen

- Die Probe wurde auf Raumtemperatur abgekühlt.
- 200 µL „Protein Precipitation Solution“ wurden zur Probe hinzugefügt und unter Verwendung des Vibrationsschüttlers (Vortex) durchmischt.
- Die Probe wurde 3 min bei 13000-15000×g zentrifugiert. Die gefällten Proteine bildeten ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes.

#### DNA-Fällung

- Der Überstand (enthielt die DNA) wurde in ein frisches 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt, mit 600 µL 100 % Isopropanol versetzt und durchmischt.
- Die Probe wurde 1 min bei 13000-15000×g zentrifugiert. Die gefällte DNA bildete ein weißes Pellet am Gefäßboden. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt.
- Zur Reinigung der DNA wurden 600 µL 70 % Ethanol zugesetzt, der Ansatz durchmischt und anschließend 1 min bei 13000-15000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt.
- Die DNA wurde danach für 15 min gut getrocknet.
- 100 µL „DNA Hydration Solution“ wurden zur DNA gegeben und über Nacht inkubiert.
- Die Lagerung der DNA erfolgte bei 2-8 °C.

### 2.9.2 Isolierung von Fusarien-DNA aus Getreide- und Malzproben (Knoll *et al.*, 2000)

- 20 g der gemahlene Probe wurden mit 55 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  und 25 mL Lysepuffer (mit 6 % PVP, siehe 2.2.4.2) versetzt.
- Die durchmischte Probe wurde 1 min mit der Ultraschallsonde (UP 200s) behandelt.
- 0,8 mL des Überstandes wurden in ein 2-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 0,4 mL  $\text{Ethanol}_{\text{abs}}$  (-20 °C) hinzugegeben und die Probe durchmischt.
- Die Probe wurde in zwei Schritten zu je 0,6 mL auf die Säulen (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche oder QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) gebracht.
- Die Säule wurde mit 500  $\mu\text{L}$  „Inhibitor Removal“ Lösung gewaschen und zentrifugiert.
- Anschließend wurde 2× mit je 500  $\mu\text{L}$  Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert und danach zur Trocknung zentrifugiert.
- Die Elution der DNA erfolgte mit 2× 100  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer (72 °C, 1 min Einwirkzeit) in sterile Reaktionsgefäße.

### 2.9.3 *In-vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988)

#### Verwendete Lösungen und Geräte

Primer (siehe 2.9.6)	50 pmol/ $\mu\text{L}$ Oligonukleotid
Nukleotid-Stammlösung (dNTP's):	10 mM ATP 10 mM CTP 10 mM GTP 10 mM TTP
10 × Reaktionspuffer für Tox5-PCR:	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl 20 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mL Glycerin (100 %ig) in 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ pH-Wert: 9,2

Reaktionsansatz für „Tox5“ (20 µL):	2 µL 10 x Reaktionspuffer Tox5 0,4 µL dNTP's 0,2 µL Opt18F Primer 0,2 µL Opt18R Primer 0,2 µL Taq-Polymerase 17 µL H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub> 1 µL DNA
Reaktionsansatz für „Opt18“ (25 µL):	2,5 µL 10 x Reaktionspuffer Tox5 0,25 µL dNTP's 0,25 µL Tox5-1 Primer 0,25 µL Tox5-2 Primer 0,25 µL Taq-Polymerase 20,5 µL H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub> 1 µL DNA

### PCR-Programme

Programm für Tox5-PCR im programmierbaren Thermoblock (MWG-Biotech, Ebersberg):

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl
94,0	4 min	1
94,0	1 min	5
67,5	2 min	
75,0	3 min	
94,0	30 sec	30
67,5	30 sec	
75,0	30 sec	
72,0	5 min	1

Programm für Tox5-PCR im programmierbaren Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg), Deckelheizung 100°C:

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl
94,0	4 min	1
94,0	20 sec	40
65,0	20 sec	
72,0	30 sec	
72,0	5 min	1

Programm für Opt18-PCR im programmierbaren Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg), Deckelheizung 100°C:

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl
94,0	4 min	1
94,0	20 sec	39
63,0	20 sec	
72,0	30 sec	
72,0	5 min	1

Für die PCR-Reaktion wurden folgende Reaktionsgefäße verwendet: 0,2-mL-Micro-Strips LP, ABgene®House. Da diese Reaktionsgefäße dicht verschließen, konnte bei der PCR auf leichtes Mineralöl oder Paraffin verzichtet werden, welche die im Anschluß an die PCR erfolgte Fluoreszenzmessung beeinträchtigt hätten.

#### 2.9.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden 1,3 %ige TBE-Gele eingesetzt. Dazu wurde die in TBE-Puffer aufgenommene Agarose aufgeschmolzen und nach Abkühlung auf 55 °C in die mit Kämmen versehene Gelkammer blasenfrei gegossen. Nach ca. 30 min wurden die Kämmen aus dem erstarrten Gel entfernt.

10 µL des PCR-Produktes (siehe 2.9.3) wurden mit 2 µL Stoppuffer gemischt und in die Gelta-schen pipettiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente bei einer Spannung von 80 V innerhalb von ca. 110 min aufgetrennt. Zur Färbung der DNA-Fragmente wurde das Gel für 15 min in eine Ethidiumbromidlösung (siehe 2.2.4) gelegt und anschließend 10 min in H<sub>2</sub>O das überschüssige Ethidiumbromid ausgewaschen.

Die Größe der linearen doppelsträngigen DNA-Moleküle konnte durch Elektrophorese zusammen mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Größe bestimmt werden. Dazu wurde mit Hilfe des Standards eine Eichkurve erstellt (log der Fragmentgröße [kb] gegen die Laufstrecke [cm]), aus der die Größe der unbekanntenen DNA-Fragmente abgeleitet werden konnte. Als Standard wurde 100 Base-Pair Ladder (1µg/µL, Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) verwendet.

### 2.9.5 Sequenzanalyse von DNA-Amplifikaten

Die Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte wurde als Auftragsarbeit von Dr. W. Metzger (Sequiserie, Martinsried) durchgeführt. Dazu wurden der Sequenzierautomat ABI 373 stretch (Perkin Elmer, Weiterstadt) und der ABI Prism Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kit mit AmpliTaq Polymerase FS (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet. Als Sequenzierprimer wurden bei der Gesamtsequenzierung der 16S-rRNA die jeweiligen PCR-Primer verwendet. Bei der Sequenzierung der ersten 300 bp der 16S-rRNA wurde der Primer 97k (siehe 2.9.6) verwendet.

### 2.9.6 In der vorliegenden Studie verwendete PCR-Primer

**Tabelle 1.** Primer für den Nachweis von Trichothecen produzierenden *Fusarium spp.* (Niessen und Vogel, 1998)

<i>Name der Oligonukleotide</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
Tox5-1	GCT GCT CAT CAC TTT GCT CAG
Tox5-2	CTG ATC TGG TCA CGC TCA TC

**Tabelle 2.** Primer für den Nachweis von *Fusarium culmorum* (artspezifisch) (Schilling *et al.*, 1996)

<i>Name der Oligonukleotide</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
OPT18 F	GAT GCC AGA CCA AGA CGA AG
OPT18 R	GAT GCC AGA CGC ACT AAG AT

**Tabelle 3.** Primer für die Sequenzierung der 16S-rRNA von Prokaryonten

<i>Name der Oligonukleotide</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
610R	GTA TTA CCG CGG CTG
609R	ACT ACY NGG GTA TCT AAK CC
612R	GTA AGG TTY TNC GCG T
607R	ACG TGT GTA GCC C
606R	GGT GTG ACG GGC GGT
607V	GGG CTA CAC ACG TGC
97k	CTG CTG CCT CCC GTA
616V	AGA GTT TGA TGG CTC AGA TT
630R	ATA TGC GGC CGC CAK AAA GGA GGT GAT CC

## 2.10 Phylogenetische Analyse

Die kompletten 16S-rRNA-Sequenzen von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 und *Pae-nibacillus polymyxa* (Polymyxa) wurden mit Sequenzen von 16282 Mikroorganismen (Gesamtbeziehungsweise Teilsequenzen) verglichen. Als Software diente das Programm ARB (W. Ludwig & O. Strunk; <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation>). Die Sequenzen der Mikroorganismen stammten aus dem „Ribosomal Database Project II, Version 8.0“ der Michigan State University, Center for microbial ecology. Die phylogenetische Position im Stammbaum wurde nach „maximum parsimony“ und „maximum-likelihood“ Methoden der ARB-Software bestimmt.

## 2.11 Messung der *Fusarium*-DNA mittels Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen®

Der Farbstoff PicoGreen® (Molecular Probes, Eugene, USA) wurde mit TE-Puffer (enthält 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) 1:200 verdünnt.

Zur Eichung wurde aus einer Kalbsthymus-DNA-Lösung bekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe von 10 ng/mL – 500 ng/mL erstellt. Die Messung erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten (FluoreNunc F16 black Polysorb, Nalge Nunc Int.). Zehn Mikroliter des amplifizierten PCR-Produktes sowie der Eichpunkte wurden mit TE-Puffer auf 100 µL aufgefüllt. Anschließend wurden 100 µL der PicoGreen®-Verdünnung dazupipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten erfolgte die Messung bei 485 nm Extinktion und 520 nm Emission in einem Fluoreszenzreader SPECTRAFLUOR (TECAN Austria GmbH).

## 2.12 Bestimmung von Konservierungsstoffen mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Da die Extraktion der Konservierungsstoffe mit organischen Lösungsmitteln erfolgte, mußten Benzoe- und Sorbinsäure zunächst durch Ansäuern der Probe protoniert werden (Überführung in die lipophilere Form). Anschließend wurde mit Ether/Petrolether (Verhältnis 1:1) extrahiert. Nach Waschen und vollständiger Evaporation konnte der Rückstand in Ethanol aufgenommen und auf die DC-Platte aufgetragen werden. Nach dem Entwickeln konnten die Konservierungsstoffe unter dem UV-Licht identifiziert werden.

### DC-Bedingungen:

Platte:	Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (Merck, Darmstadt)
Fließmittel:	Petrolether/Xylol/Chloroform/Ameisensäure/Eisessig (50/40/20/8/2, v/v/v/v/v)
Standards:	0,1 %ig in Ethanol
Detektion:	UV-Licht (254 nm)

## 2.13 Bestimmung von Deoxynivalenol mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

### 2.13.1 Isolierung von DON aus Kulturflüssigkeiten oder Bier

50 mL Bier oder Kulturflüssigkeit wurden durch ein Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde anschließend mit 50 mL Ethylacetat in einem Scheidetrichter extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 µL Methanol aufgenommen und für die Dünnschichtchromatographie verwandt.

### 2.13.2 Dünnschichtchromatographie von Deoxynivalenol

**DC-Bedingungen:**

Platte: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt)

Fließmittel: Chloroform/Methanol (9/1, v/v)

Detektion: 1 g AlCl<sub>3</sub> in 100 mL Ethanol

Die Probe wurde punktförmig auf die DC-Platte aufgetragen. Zur Detektion der Trichothecene wurde die Platte mit dem Detektionsmittel besprüht und 30 min bei 130 °C entwickelt. Trichothecene reagieren mit AlCl<sub>3</sub> zu blau fluoreszierenden Verbindungen, welche im UV-Bereich bei 366 nm sichtbar werden.

## **2.14 Bestimmung der Mykotoxine mittels HPLC**

### **2.14.1 Bestimmung von DON mittels MycoSep-DON-Säulen**

#### **2.14.1.1 Extraktion und Aufreinigung von DON aus Getreide und Malz**

25 g gemahlene Probenmaterial wurden mit 100 mL Acetonitril-Wasser-Gemisch (86/14, v/v) im Überkopfschüttler 2 h extrahiert. Nach der Extraktion wurden ca. 10 mL über ein Faltenfilter in ein Glasgefäß filtriert. Von der filtrierten klaren Extraktionslösung wurden 8 mL in ein Kulturröhrchen überführt.

Die MycoSep-DON-Säule (Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim.) wurde gemäß der Anleitung des Herstellers mit dem roten Gummi-Ende voran auf das Kulturröhrchen aufgesetzt und von Hand gleichmäßig innerhalb von 30 Sekunden durch die Lösung im Kulturröhrchen gedrückt.

#### **2.14.1.2 Aufkonzentrierung**

4 mL des aufgereinigten Überstandes aus der DON-Säule wurden unter schwachem Vakuum bei 60 °C zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 1 mL mobiler Phase 30 Sekunden im Ultraschallbad gelöst, anschließend membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

### **2.14.2 Bestimmung von DON mittels Immunoaffinitätssäulen**

50 g gemahlene Probenmaterial wurden mit 10 g Polyethylenglykol 8000 (PEG) und 200 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> im Überkopfschüttler 30 min extrahiert. Nach der Extraktion wurde über ein Faltenfilter in ein Glasgefäß filtriert. Vom Filtrat wurden ca. 5 mL über ein Membranfilter in einen Spitzkolben filtriert.

1 mL dieses membranfiltrierten Extraktes wurde mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sec auf die Immunoaffinitätssäule aufgetragen und die Säule anschließend mit 5 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen (Durchlaufgeschwindigkeit: 2 Tropfen/sec). DON wurde mittels 1 mL Methanol vom monoklonalen Antikörper der Immunoaffinitätssäule gelöst.

Das Eluat wurde ohne weitere Aufarbeitung mittels HPLC analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung von Antagonisten aus Bodenproben

Zur Isolierung natürlicher Antagonisten, wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen (alle 3 Wochen) auf einem Versuchsfeld der Firma Bayer AG in Dingolfing Bodenproben und Pflanzmaterial entnommen. Auf diesem Versuchsfeld wurde als Vorfrucht Mais angebaut, gefolgt von Gerste.

Die Erde und die Pflanzenteile wurden in isotonischer Kochsalzlösung zerkleinert und auf einem Magnetrührer ca. 15 min gerührt. Anschließend wurde die so erzeugte Suspension zur Herstellung von Gußplatten (Standard I + II, Merck, Darmstadt) verwendet. Diese Platten wurden mit einer Konidiensuspension, bestehend aus Konidien von *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum*, überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden aus den Hemmzonen die jeweiligen Mikroorganismen isoliert und Reinkulturen hergestellt. Mit jeder dieser Kulturen wurde erneut ein Hemmtest durchgeführt. Nach erfolgreichem Hemmtest wurden diese Mikroorganismen identifiziert. Zu diesem Zweck wurde die DNA isoliert, um die 16S-rRNA zu sequenzieren, sowie verschiedene Stoffwechseleigenschaften der Keime charakterisiert (z.B. Zuckerspektren). Auf diese Art gelang die Isolierung von 2 antagonistisch wirksamen Stämmen, welche im Verlauf der Arbeit als *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 und *Paenibacillus polymyxa* (Li2) identifiziert wurden.

#### 3.2 *in vitro*-Wirksamkeit der aus Bodenproben isolierten Antagonisten

Die auf diese Weise erhaltenen hemmstoffproduzierenden Bakterien wurden auf ihre wachstumshemmende Wirkung auf ausgewählte Fusarien in Agarkultur getestet (siehe 2.5).

Tabelle 3.1 zeigt die Hemmwirkung der verschiedenen Antagonisten auf die unterschiedlichen Testorganismen, wobei die Größe der Hemmzone und die morphologische Veränderung der verwendeten Testpilze angegeben sind.

Im Vergleich zu Petrischalen mit ungehemmten Testpilzkolonien war in jedem Fall eine deutliche Hemmung zu sehen. Diese äußerte sich durch eine Verringerung des Wachstums sowie ein ausgedünntes Erscheinungsbild des Myzels. Beispielsweise zeigte das Isolat TMW2.418 eine deutliche Hemmung des Wachstums von *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium tricinctum*, jedoch eine deutlich schwächere Hemmung bei *Fusarium equiseti*. Das Isolat Li2 wirkte am stärksten gegen *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*

und *Fusarium equiseti*. *Fusarium tricinctum* und *Fusarium sporotrichioides* wurden deutlich schwächer gehemmt (siehe Abbildung 4).

Zusätzlich wurden in diesen Hemmtests Mikroorganismen eingesetzt, welche bei Kerak (Jordanien) aus Bodenproben von dortigen Getreidefeldern isoliert wurden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden diese Isolate als *Brevibacillus laterosporus* (Jord A, Jord C und Jord D) und *Bacillus licheniformis* (Jord B) identifiziert (siehe Kapitel 8.3 und 8.4).

Die Konstanz der Hemmzone zwischen den Testpilzkolonien und den antagonistischen Bakterien war mit Ausnahme des Isolates Li2 gegeben. Bei den Petrischalen, welche mit dem Isolat Li2 beimpft waren, wurde nach 7 Tagen die beobachtete Hemmung überwunden, da danach eine Zunahme des Wachstums der Testpilze beobachtet wurde.

Tabelle 3.1 Größe der Hemmzone zwischen den antagonistischen Mikroorganismen und den Testkeimen in cm sowie morphologische bzw. cytologische Veränderungen der Testpilze (**S** – Sporulation der Pilzkolonie an der Wachstumsfront, **D** – Verdichtung des Myzels, **A** – Ausdünnung des Myzels, **O** – kein lichtmikroskopisch sichtbarer Effekt). Mittelwerte aus jeweils 3 Bestimmungen. Abk.: Fc - *F. culmorum*, Fg - *F. graminearum*, Fe - *F. equiseti*, Ft - *F. tricinctum*, Fs - *F. sporotrichioides*

Antagonistisch wirksame Bakterien	Fg	Fc	Fe	Ft	Fs
TMW2.418	2,3 A	2,5 A	1,3	2,0	2,0
Li2	2,3 A	2,3 S	2,0	1,2	1,2
Jord A	2,2 D	1,9 D	1,4	1,9	1,9
Jord B	2,1 A	1,8 S	2,3	1,0	1,0
Jord C	2,5 D	1,7 S	1,8	1,1	1,1
Jord D	2,3 S	2,5 S	2,0	2,2	2,2

Als zusätzlicher Test wurden unter Verwendung antagonistisch wirksamer Mikroorganismen Gußplatten hergestellt. Nach dem Erkalten des Agars wurde in die Mitte der Petrischalen ein ausgestochenes Agarstückchen von 5 mm Durchmesser aus einer Pilzkultur aufgelegt. Dieser Test bestätigte nochmals die zuvor beschriebenen Ergebnisse (siehe Abbildung 5).

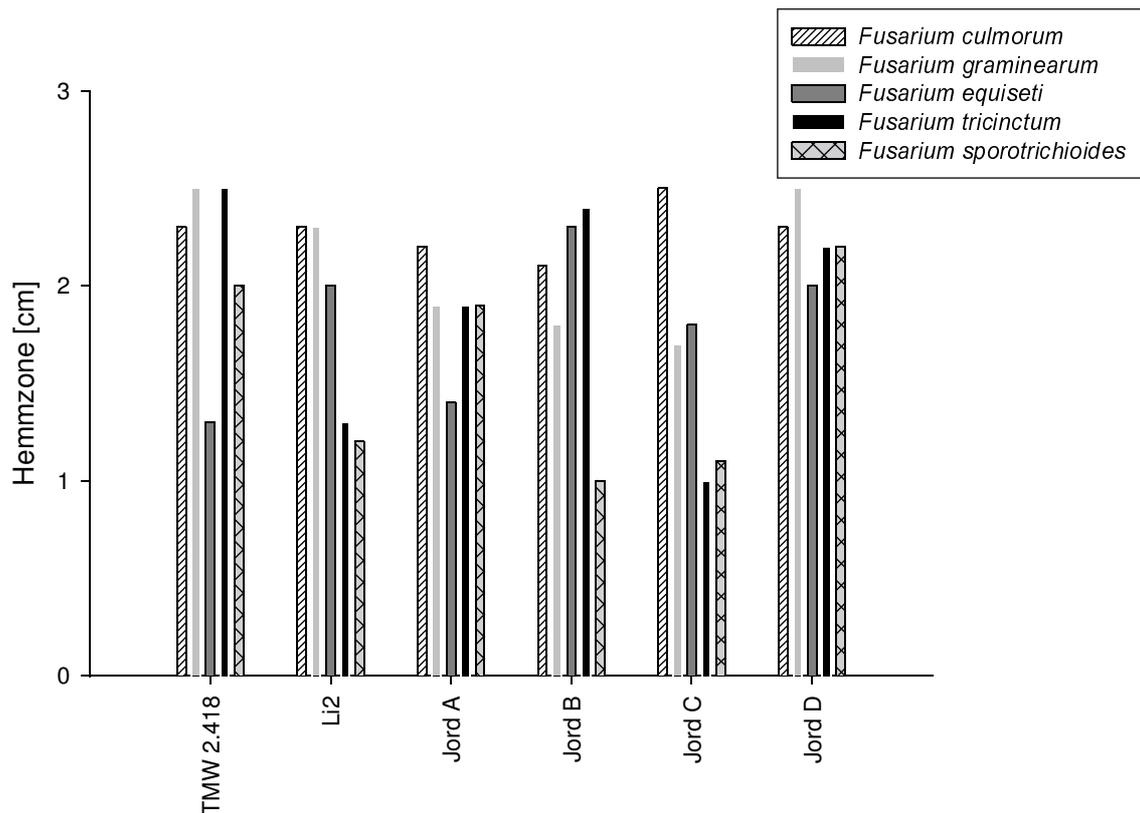


Abbildung 4 Darstellung der Hemmzonen. Angegeben sind die Größe der Hemmzone in cm zwischen gehemmtem Testpilz und antagonistischem Mikroorganismus, welcher in der Mitte der Petrischale strichförmig ausgestrichen wurde

Eine Konkurrenz um die Kohlenstoffquelle als Ursache der Hemmung wurde durch den folgenden Versuch ausgeschlossen: Kulturen von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 wurden in einer Standardnährlösung 24 h vorbebrütet. Danach wurden die Zellen gerntet und in der verbliebenen Nährlösung die Zuckermengen mittels HPLC bestimmt.

Anschließend wurde ein Nährboden angesetzt, dem nur die verminderten Zuckermengen hinzugefügt wurden. Als Kontrolle diente eine normale Standard I Agarplatte. Beide Nährböden wurden mit den Testpilzen *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium tricinctum* und *Fusarium sporotrichioides* beimpft. Ein Unterschied in der Geschwindigkeit des Wachstums oder dem Erscheinungsbild der Myzelien war nicht zu erkennen.



Abbildung 5 Vergleich der Hemmwirkung von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 auf *Fusarium culmorum* gegenüber einer unbehandelten Kontrolle nach 14 Tagen

Auch die Veränderung des pH-Wertes durch die antagonistischen Mikroorganismen als mögliche Ursache der Hemmung mußte untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Veränderung des pH-Wertes des Mediums beim Wachstum von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 und *Paenibacillus polymyxa* bestimmt. *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 verschob den pH-Wert in den basischen Bereich. Werte bis pH 8 konnten hierbei gemessen werden. *Paenibacillus polymyxa* dagegen verschob den pH-Wert von 5,7 nach 4.

Auf Agarplatten, welche auf verschiedene saure und basische pH-Werte im oben angegebenen Bereich eingestellt wurden, war wiederum keine nennenswerte Hemmung von *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* festzustellen.

Bei *Paenibacillus polymyxa* ist die Bildung des Antibiotikums Polymyxin bekannt. Zur Überprüfung ob Polymyxin bei der Hemmung der Zielpilze beteiligt ist, wurden Agardrop-Tests mit verschiedenen Konzentrationen reinem Polymyxin-B-Sulfat durchgeführt. Hierbei konnte eine deutliche Hemmung der Testpilze durch das Antibiotikum beobachtet werden. Nach wenigen Tagen ließ die Hemmwirkung von Polymyxin jedoch nach, da die Substanz lichtempfindlich ist (siehe Abbildung 6). Allerdings waren bei den verschiedenen Testpilzen unterschiedlich starke Tendenzen zur Überwindung dieser Hemmung zu erkennen. Die gleichen Beobachtungen wurden bei Hemmtests mit *Paenibacillus polymyxa* (Isolat Li2) gemacht. Eine anfängliche Hemmwirkung des Keims läßt nach einigen Tagen nach (siehe Abbildung 7).

Es gelang nicht, einen hemmaktiven Kulturüberstand von *Stenotrophomonas maltophilia* und *Paenibacillus polymyxa* zu gewinnen. Die Hemmung fand immer nur in Anwesenheit der Mikroorganismen statt.

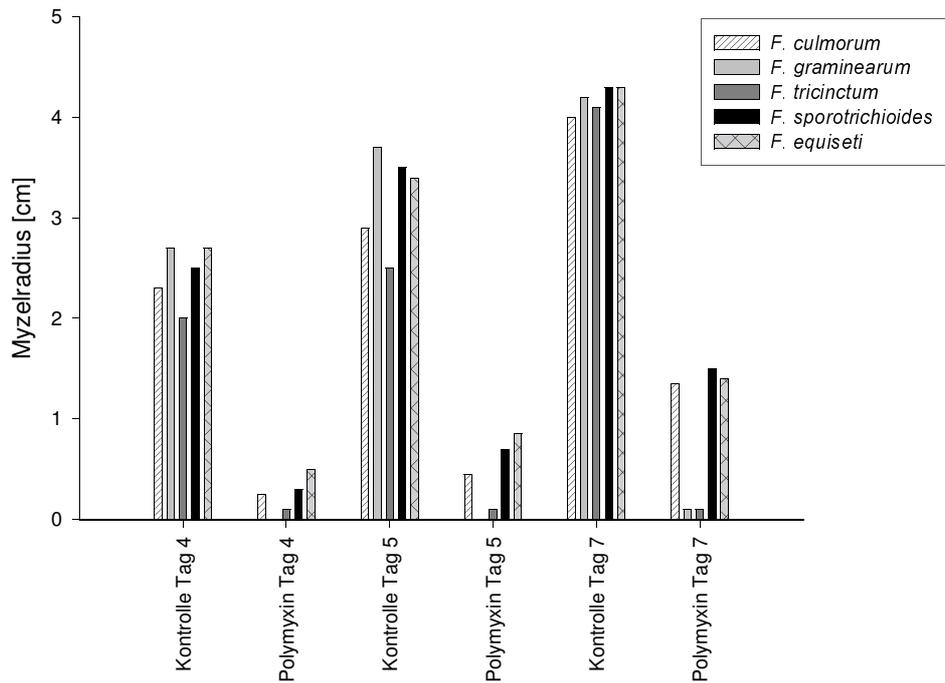


Abbildung 6 Einfluß von Polymyxin-B-Sulfat (0,02 g/L) auf die Myzelradien von *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. tricinatum*, *F. sporotrichioides* und *F. equiseti* auf Standard-Nährböden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen

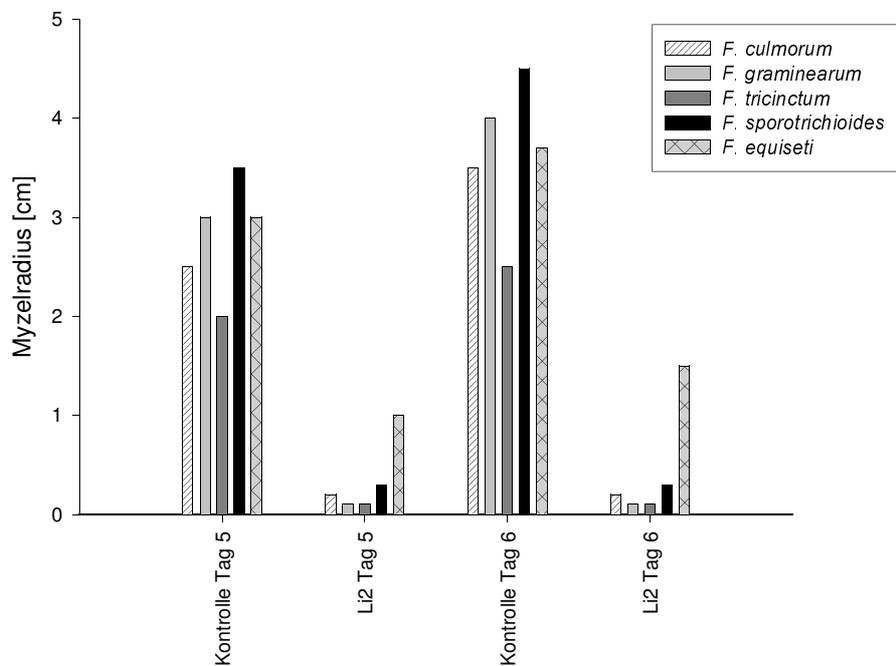


Abbildung 7 Einfluß von *Paenibacillus polymyxa* (Li2) auf die Myzelradien von *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. tricinatum*, *F. sporotrichioides* und *F. equiseti* auf Standard-Nährböden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen

### **3.3 Wirksamkeit der *in vitro* wachstumshemmenden Mikroorganismen in einem *in planta*-Versuchssystem**

Die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über die antagonistische Wirkung der getesteten Mikroorganismen sollten in einem Topfversuch an Gerste (Sorte: Alexis) in die Praxis übertragen werden. Zu diesem Zweck wurde autoklavierte Pflanzenerde mit einer Konidienlösung ( $10^4$ - $10^5$  cfu/g) von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* versetzt und vier Tage in zuvor mit 70 % Ethanol sterilisierten Töpfen vorinkubiert.

Pro Topf wurden zehn mit antagonistischen Mikroorganismen behandelte Gerstenkörner (siehe 2.6) eingesetzt und 14 Tage bei Raumtemperatur beleuchtet inkubiert. Dabei konnte keine wesentliche Befallsminderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden.

Die Gerstenkörner, welche eine vorhergehende Samenbehandlung mit Antagonisten erfahren hatten, waren zu 50 % nicht mehr keimfähig.

### **3.4 Identifizierung des Isolates TMW2.418 als *Stenotrophomonas maltophilia***

#### **3.4.1 Physiologische und morphologische Charakterisierung des Isolates TMW2.418**

Eine erste Charakterisierung des Isolates TMW2.418 wurde anhand seiner physiologischen und morphologischen Eigenschaften durchgeführt. TMW2.418 bildet kurze Stäbchen, die eine bis mehrere polare Geißeln besitzen. In Nährbouillon bildet TMW2.418 einen schleimigen Biofilm, welcher aus Polysacchariden besteht. Das Wachstum findet unter aeroben Bedingungen statt.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Zuckerspektren unter Verwendung des Testsystems „api 50 CH, BioMérieux“ bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei *Stenotrophomonas maltophilia*-Stämme (DSM50170<sup>T</sup> und DSM8573) herangezogen.

Tabelle 3.2 Vergleichende Darstellung der Zuckerspektren des Isolates TMW2.418 und der *Stenotrophomonas maltophilia*-Stämme DSM50170<sup>T</sup> und DSM8573. Abk.: + Zucker wurde verwertet, - Zucker wurde nicht verwertet

<b>Kohlenhydrat</b>	<b>TMW2.418</b>	<b>DSM50170<sup>T</sup></b>	<b>DSM8573</b>
Glycerin	-	-	-
Erythrit	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	-	-
Ribose	-	-	-
D-Xylose	-	-	+
L-Xylose	-	-	-
Adonit	-	-	-
β-Methylxylosid	-	-	-
Galactose	-	-	-
D-Glucose	-	-	-
D-Fructose	+	-	-
D-Mannose	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Dulcit	-	-	-
Inosit	-	-	-
Mannit	-	-	+
Sorbit	-	-	-
α-Methyl-D-mannosid	-	-	-
α-Methyl-D-glucosid	-	-	-
N Acetylglucosamin	-	-	-
Amygdalin	+	-	-
Arbutin	-	-	-
Esculin	-	-	-
Salicin	-	-	-
Cellobiose	-	-	-
Maltose	+	-	-
Lactose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Trehalose	-	-	-

<b>Kohlenhydrat</b>	<b>TMW2.418</b>	<b>DSM50170<sup>T</sup></b>	<b>DSM8573</b>
Inulin	+	-	-
Melezitose	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-
Amidon	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylit	-	-	-
β-Gentiobiose	-	-	-
D-Turanose	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabit	-	-	-
L-Arabit	-	-	-
Gluconat	-	-	-
2-Ketogluconat	-	-	-
5-Ketogluconat	-	-	-

Tabelle 3.3 Vergleichende Darstellung einiger Eigenschaften des Isolates TMW2.418 und *Stenotrophomonas maltophilia* DSM8573. Abk.: + Reaktion war sichtbar, - keine Reaktion sichtbar, - / + Reaktion wurde im späteren Verlauf positiv

<b>Eigenschaft</b>	<b>TMW2.418</b>	<b>DSM8573</b>
Sauerstoffbedarf	aerob	aerob
Katalase-Test	+	+
Oxidase-Test	-	-
Oxidation/Fermentation	- / -	- / -
Tryptophan-Abbau	-	-
Citratverwertung	+	+
Amylase-Test	- / +	- / +
Protease-Test	+	+
Lipase-Test	+	+
Gramfärbung	-	-

Ein Vergleich der mikroskopischen Merkmale und der physiologischen Charakteristika des Isolates TMW2.418 mit den Beschreibungen der Art *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh, 1981; Pal-

leroni *et al.*, 1993; Stanier, 1966) zeigte eine weitgehende Übereinstimmung der Daten.

Für weitere Studien über das Wachstum von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 wurde eine Wachstumskurve bei 30 °C in Standard-I-Nährbouillon aufgenommen. Anhand dieser Kurve konnte der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 bestimmt werden (siehe Abbildung 8).

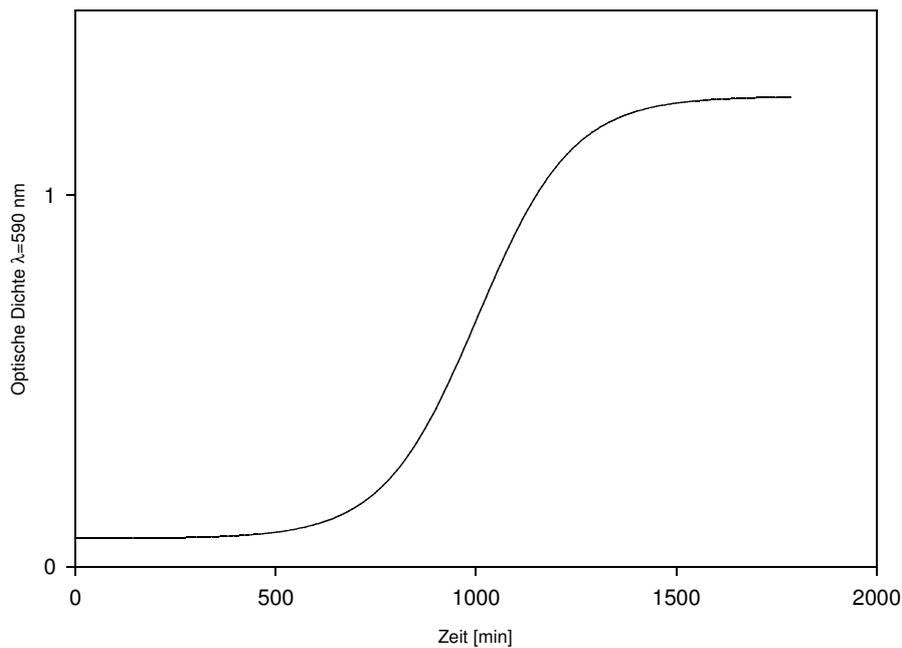


Abbildung 8 Wachstumskurve von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 bei 30 °C in Standard-I-Nährmedium (Merck, Darmstadt)

### 3.4.2 Partielle 16S-rRNA-Sequenzierung des Isolates TMW 2.418

Mit Hilfe der vergleichenden Analyse der 16S-rRNA-Sequenz sollten das Isolat TMW2.418 genauer charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die ersten 300 Basenpaare der 16S-rRNA des Isolates sequenziert und mit der Datenbank ARB (W. Ludwig & O. Strunk; <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation>) verglichen (siehe Abbildung 9). Das Isolat TMW 2.418 zeigte dabei gute Übereinstimmung mit *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC13637.

	1	11	21	31	41	50		
1	NNUAAGUGAA	GAGUUUGAUC	CUGGCUCAGA	GUGAACGCUA	GCGGUAGGCC		50	ATCC13637
1	.....	.....	...GCUCAGA	GUGAACGCUG	GCGGUAGGCC		27	TMW2.418
	51	61	71	81	91	100		
51	UAACACAUGC	AAGUCGAACG	GCAGCACAGG	AGAGCUUGCU	C.UCUGGNAN		99	ATCC13637
28	UAACACAUGC	AAGUCGAACG	GCAGCACAGA	GGAGCUUGNU	CCUUGGGUGG		77	TMW2.418
	101	111	121	131	141	150		
100	-NAGUGGCGG	ACGGGUGAGG	AAUACAUCGG	AAUCUACUUU	UUCGUNG GGG		148	ATCC13637
78	CGAGUGGCGG	ACGGGUGAGG	AAUACAUCGG	AAUCUACUUU	UUCGUGGGGG		127	TMW2.418
	151	161	171	181	191	200		
149	AUAACGUAGG	GAAACUUACG	CUAAUACCGC	AUACGACCUA	CGGGUGAAAAG		198	ATCC13637
128	AUAACGUAGG	GAAACUUACG	CUAAUACCGC	AUACGACCUA	CGGGUGAAAAG		177	TMW2.418
	201	211	221	231	241	250		
199	CAGGGGAUCU	UCGGACCUUG	CGCGAUUGAA	UGAGCCGAUG	UCGGAUUAGC		248	ATCC13637
178	CAGGGGANCU	UCGGACCUUG	CGCGAUUGAA	UGAGCCGAUG	UCGGAUUAGC		227	TMW2.418
	251	261	271	281	291	300		
249	UAGUUGGCGG	GGUAAAAGGCC	CACCAAGGCN	ACGAUCCGNA	GCUNGUCUGA		298	ATCC13637
228	UAGUUGGCGG	GGUAAAAGGCC	CACCAAGGCG	ACGAUCCGUA	GCUGGUCUGA		277	TMW2.418
	301	311	321	331	341	350		
299	GAGGAUGAUC	AGCCACACUG	GAACUGAGAC	ACGGUCCAGA	CUCCUACGGG		348	ATCC13637
278	GAGGAUGAUC	AGCCACACUG	GAACUGAGAC	ACG.UCCAGA	U.....		317	TMW2.418
	351	361	371	381	391	400		
349	AGGCNNNAGU	GGGGAAUAUU	GGACAAUGGG	CGCAAGCCNG	AUCCAGCCAU		398	ATCC13637
318	.....	.....	.....	.....	.....		317	TMW2.418

Abbildung 9 Alignment von partiellen 16S-rRNA-Sequenzen von *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 und dem Isolat TMW 2.418 aus Bodenproben.

Anhand der Vergleiche der 16S-rRNA-Daten wurde das neue Isolat in den in Abbildung 10 dargestellten phylogenetischen Stammbaum integriert. Dabei wurden nur die Gesamtsequenzen von *Stenotrophomonas maltophilia* und nahestehenden Gattungen aus dem „Ribosomal Database Project II, Version 8.0“ der Michigan State University, Center for microbial ecology verwendet. Die phylogenetische Position im Stammbaum wurde nach „maximum parsimony“ und „maximum-likelihood“ Methoden der ARB-Software bestimmt. In Kapitel 8.2 sind die kompletten 16S-rRNA-Sequenzen der Isolate *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418, *Stenotrophomonas maltophilia* DSM50170 und *Stenotrophomonas maltophilia* DSM8573 gegenübergestellt.

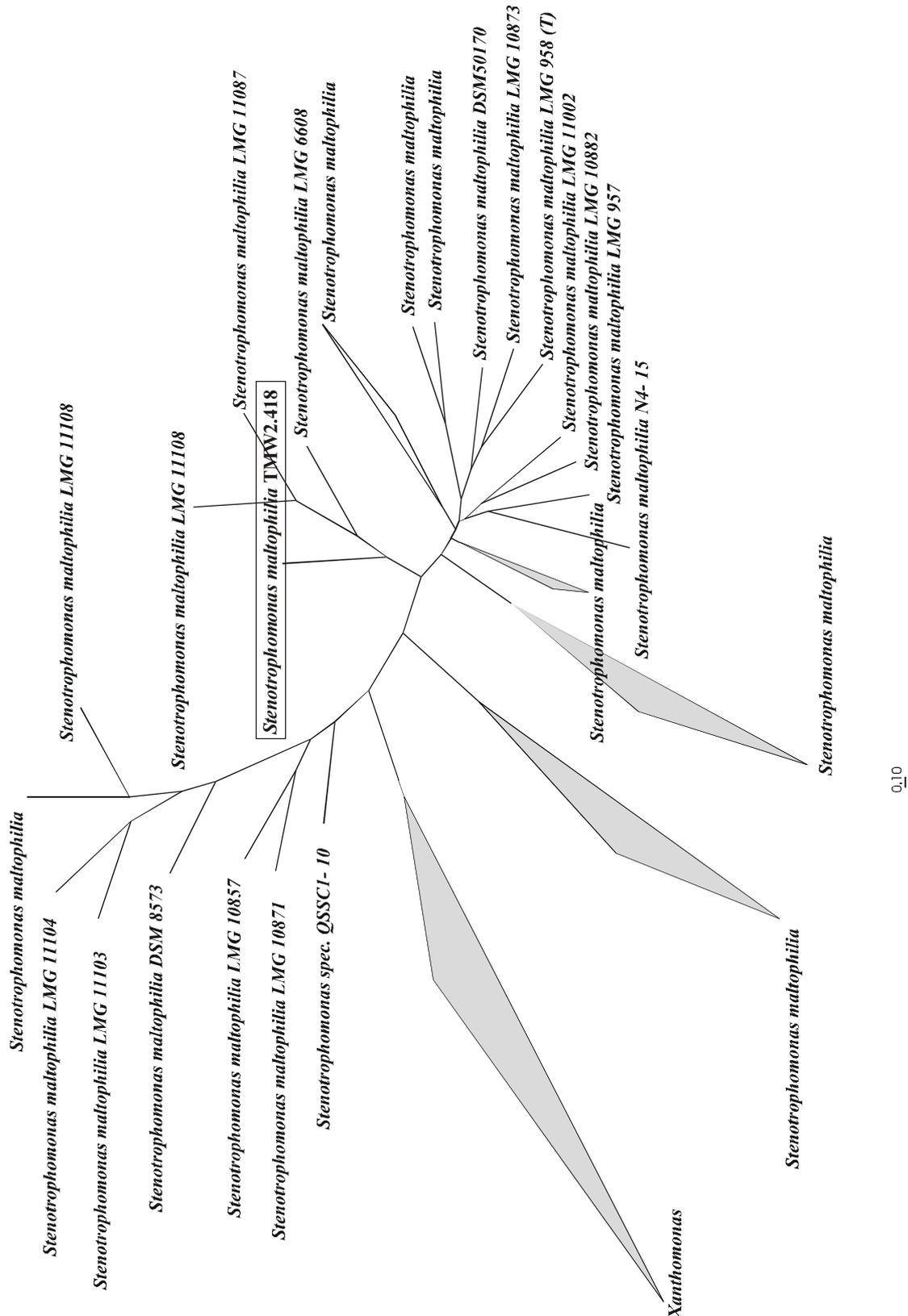


Abbildung 10 Stammbaum, der die phylogenetische Verwandtschaft des Isolates TMW2.418 mit *Stenotrophomonas maltophilia* zeigt. Die phylogenetische Position im Stammbaum wurde nach „maximum parsimony“ und „maximum-likelihood“ Methoden der ARB-Software bestimmt. Der Maßstab präsentiert 10 % Homologieunterschied

### 3.5 Identifizierung des Isolates Li2 als *Paenibacillus polymyxa*

#### 3.5.1 Physiologische und morphologische Charakterisierung des Isolates Li2

Eine erste Charakterisierung des Isolates Li2 wurde anhand seiner physiologischen und morphologischen Eigenschaften durchgeführt. Das Isolat Li2 bildet kettenförmige Stäbchen mit tönchchenförmigen Sporen. Die ovalen Sporen sind breiter als die Mutterzelle. Das Wachstum findet unter aeroben Bedingungen statt.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Zuckerspektren unter Verwendung des Testsystems „api 50 CH, BioMérieux“ ermittelt.

Tabelle 3.4 Vergleichende Darstellung des Zuckerspektrums des Isolates Li2 mit Literaturangaben zu *Paenibacillus polymyxa* (+ Zucker wurde verwertet, - Zucker wurde nicht verwertet, ? Ergebnis war nicht eindeutig auswertbar, k.A. keine Angaben)

Kohlenhydrat	Li2	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
Glycerin	+	+
Erythrit	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	+	+
Ribose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Xylose	?	-
Adonit	?	-
$\beta$ -Methylxylosid	?	-
Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	?	k. A.
Rhamnose	?	k. A.
Dulcit	-	-
Inosit	-	-
Mannit	+	+
Sorbit	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannosid	-	-

<b>Kohlenhydrat</b>	<b>Li2</b>	<b><i>Paenibacillus polymyxa</i></b>
$\alpha$ -Methyl-D-glucosid	+	+
N-Acetylglucosamin	?	k. A.
Amygdalin	+	+
Arbutin	+	+
Esculin	?	k. A.
Salicin	+	+
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	+	+
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
Inulin	?	k. A.
Melezitose	?	k. A.
D-Raffinose	+	+
Amidon	+	+
Glycogen	+	+
Xylit	-	k. A.
$\beta$ -Gentiobiose	+	+
D-Turanose	+	+
D-Lyxose	-	k. A.
D-Tagatose	-	k. A.
D-Fucose	-	k. A.
L-Fucose	-	k. A.
D-Arabit	-	k. A.
L-Arabit	-	k. A.
Gluconat	-	k. A.
2-Ketogluconat	-	k. A.
5-Ketogluconat	-	k. A.

Tabelle 3.5 Vergleichende Darstellung einiger Eigenschaften des Isolates Li2 mit Literaturangaben zu *Paenibacillus polymyxa* (Mersch-Sundermann, 1989). Abk.: + Reaktion war sichtbar, - keine Reaktion sichtbar

<b>Eigenschaft</b>	<b>Li2</b>	<b><i>Paenibacillus polymyxa</i></b>
Gramfärbung	+	+
Mobilität	+	+
Länge > 1 µm	-	-
Anaerobes Wachstum	+	+
Wachstum bei 7 % NaCl	-	-
Wachstum bei 50 °C	-	-
Hämolyse	-	-
Lecithinasebildung	-	-
Gelatinehydrolyse	+	+
Harnstoffspaltung	-	-
Voges-Proskauer-Reaktion	+	+
Nitratreduktion	+	+
Gasbildung aus Glucose	+	+
Arabinosespaltung	+	+
Xylospaltung	+	+

Ein Vergleich der mikroskopischen Merkmale und der physiologischen Charakteristika des Isolates Li2 mit den Beschreibungen von *Paenibacillus polymyxa* (Fahmy *et al*, 1985; Skerman *et al*, 1980) zeigte eine weitgehende Übereinstimmung mit der Art *Paenibacillus polymyxa*.

Für weitere Studien über das Wachstum von *Paenibacillus polymyxa* (Li2) wurde eine Wachstumskurve bei 30 °C in Standard-I-Nährbouillon aufgenommen. Anhand dieser Kurve konnte der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *Paenibacillus polymyxa* bestimmt werden (siehe Abbildung 11).

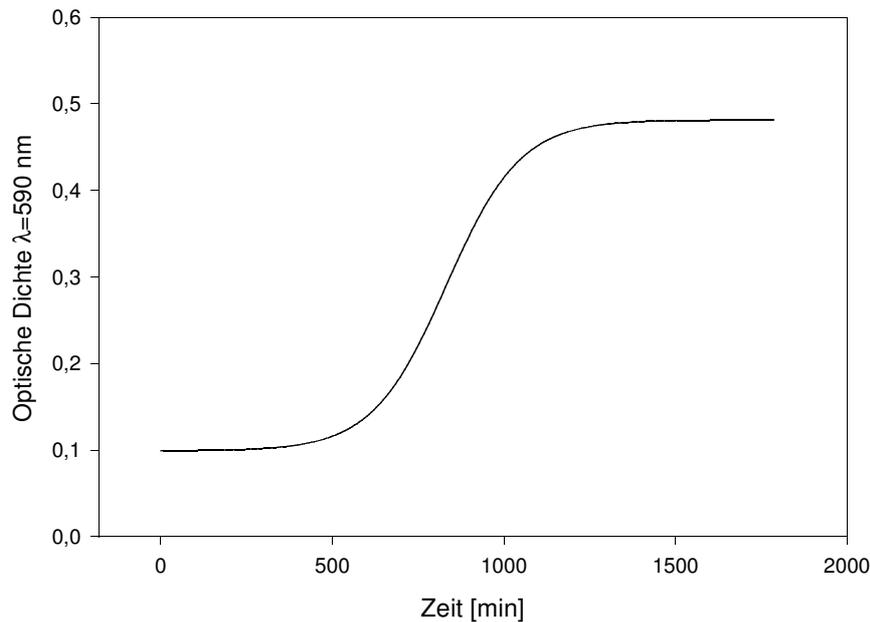


Abbildung 11 Wachstumskurve von *Paenibacillus polymyxa* (Li2) bei 30 °C in Standard-I-Nährmedium (Merck, Darmstadt)

### 3.5.2 Partielle 16S-rRNA-Sequenzierung des Isolates Li2

Mit Hilfe der vergleichenden Analyse der 16S-rRNA-Sequenz sollte das Isolat Li2 genauer charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die ersten 300 Basenpaare der 16S-rRNA-Sequenz des Isolates sequenziert und mit der Datenbank ARB (W. Ludwig & O. Strunk; <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation>) verglichen (siehe Abbildung 12). Das Isolat Li2 zeigte dabei gute Übereinstimmung mit *Paenibacillus polymyxa* AJ223988 bzw. AJ23989 (Achouak *et al.*, 1999).

	1	11	21	31	41	50		
1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	9	AJ223988
1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	9	AJ223989
1	GUCUUGUGGG	CAGGUUGCCU	ACGUGUUACU	CACCCGUCCS	CGCUAGUAUU		50	Li2
	51	61	71	81	91	100		
10	CCUGUCUCAG	CACGAAGCCU	GGCGGCGUGC	CUAAUACAUG	CAAGUCGAGC		59	AJ223988
10	CCUGUCUCAG	CACGAAGCCU	GGCGGCGUGC	CUAAUACAUG	CAAGUCGAGC		59	AJ223989
51	GAAGCAAGUC	MMMUAMCCCU	RACUGVGGGU	GGCCCVNUM	ANUUCUGCCA		100	Li2

	101	111	121	131	141	150		
60	GGG--GUUGU	AGAAGCUUGC	UUCUAUAGCC	UAGCGGCGGA	CGGGUGAGUA	107	AJ223988	
60	GGG--GUUGU	AGAAGCUUGC	UUCUAUAGCC	UAGCGGCGGA	CGGGUGAGUA	107	AJ223989	
101	GCGACCUUU	AGAAGCUUGC	UUCUAAAACC	UAGCGGCGGA	CGGGUCAGUA	150	Li2	
	151	161	171	181	191	200		
108	ACACGUAGGC	ACCUGCCAC	AAGACAGGGA	UAACUACCGG	AAACGGUAGC	157	AJ223988	
108	ACACGUAGGC	ACCUGCCAC	AAGACAGGGA	UAACUACCGG	AAACGGUAGC	157	AJ223989	
151	ACACGUAGGC	ACCUGCCAC	AAGACAGGGA	UAACUACCGG	AAACGGUAGC	200	Li2	
	201	211	221	231	241	250		
158	UAAUACCCGA	UACACCUGCA	UGGGGAAAGA	CGGAGCAAUC	UGUCACUUGU	207	AJ223988	
158	UAAUACCCGA	UACACCUGCA	UGGGGAAAGA	CGGAGCAAUC	UGUCACUUGU	207	AJ223989	
201	UAAUACCCGA	UACACCUGCA	UGGGGAAAGA	CGGAGCAAUC	UGUCACUUGU	250	Li2	
	251	261	271	281	291	300		
208	GGAUGGGCCU	GCGGCGCAUU	AGCUAGUUGG	UGGGGUAAAAG	GCCUACCAAG	257	AJ223988	
208	GGAUGGGCCU	GCGGCGCAUU	AGCUAGUUGG	UGGGGUAAAAG	GCCUACCAAG	257	AJ223989	
251	GGAUG-GCCU	GCGGCGCAUU	AGCUAGUUGG	UGGGGUAAAAG	GCCUACCAAG	299	Li2	
	301	311	321	331	341	350		
258	GCGACGAUGC	GUAGCCGACC	UGAGAGGGUG	AUCGGCCACA	CUGGGACUGA	307	AJ223988	
258	GCGACGAUGC	GUAGCCGACC	UGAGAGGGUG	AUCGGCCACA	CUGGGACUGA	307	AJ223989	
300	GCGACGAUGC	GUAGCCGACC	UGAGAGGGUG	AUCGGCCACA	CUGGGACUG.	348	Li2	

Abbildung 12 Alignment von partiellen 16S-rRNA-Sequenzen von *Paenibacillus polymyxa* (Li2) und *Paenibacillus polymyxa* AJ223988 und AJ223989

Anhand der Vergleiche der 16S-rRNA-Daten wurde das neue Isolat in den in Abbildung 13 dargestellten phylogenetischen Stammbaum integriert. Dabei wurden nur die Gesamtsequenzen von *Paenibacillus polymyxa* und nahestehenden Gattungen aus dem „Ribosomal Database Project II, Version 8.0“ der Michigan State University, Center for microbial ecology verwendet. Die phylogenetische Position im Stammbaum wurde nach „maximum parsimony“ und „maximum-likelihood“ Methoden der ARB-Software bestimmt.

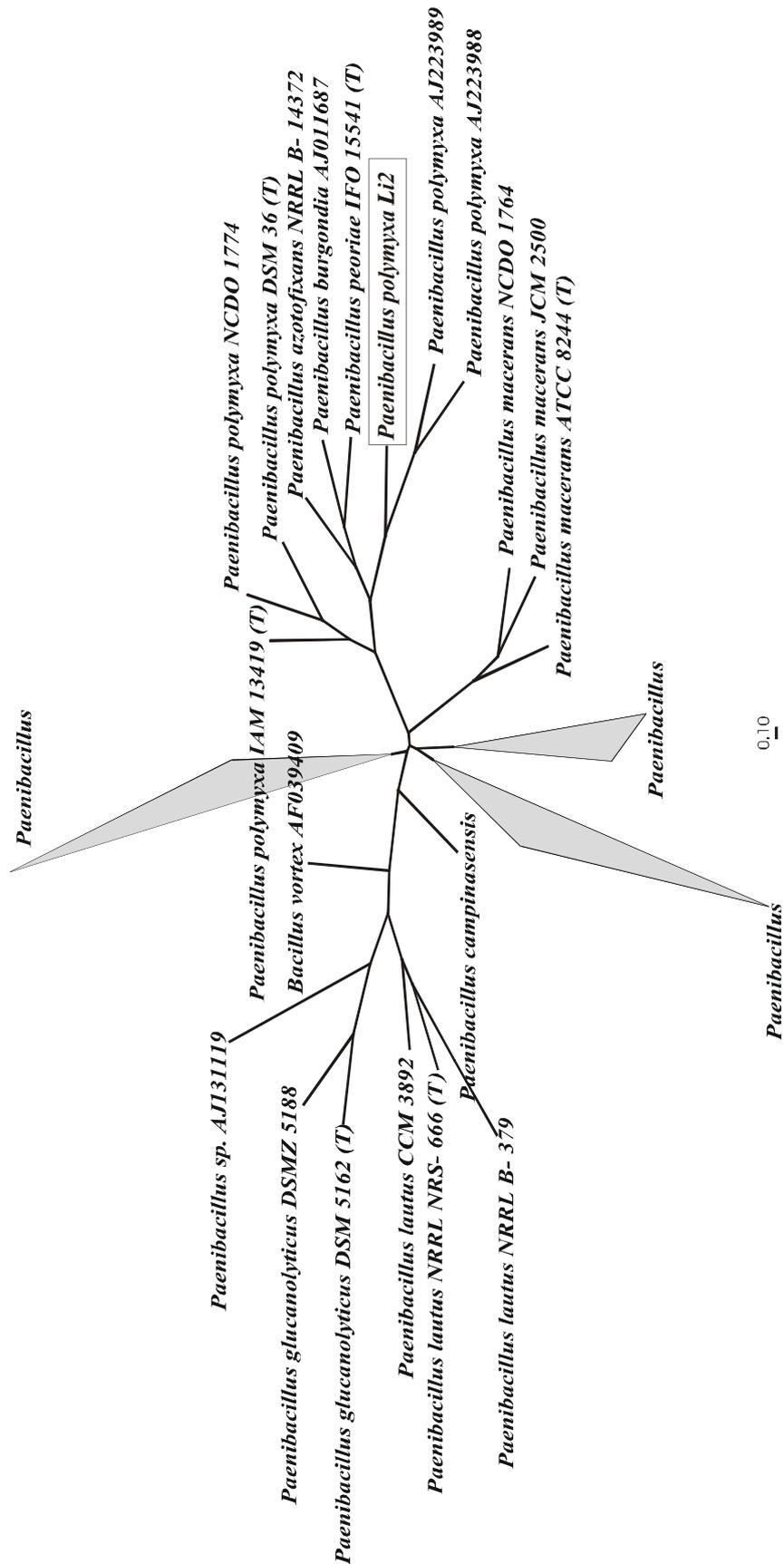


Abbildung 13 Stammbaum, der die phylogenetische Verwandtschaft des Isolates Li2 mit *Paenibacillus polymyxa* zeigt. Die phylogenetische Position im Stammbaum wurde nach „maximum parsimony“ und „maximum-likelihood“ Methoden der ARB-Software bestimmt. Der Maßstab präsentiert 10 % Homologieunterschied

### 3.6 Charakterisierung des Versuchsmaterials Gerste und Weizen

Das von der Bundesanstalt für Saatzucht/Resistenzgenetik in Grünbach bei Erding erhaltene Versuchsmaterial (jeweils 100 kg Gerste und Weizen) wurde zunächst auf die Zusammensetzung der Mykoflora untersucht. Dazu wurden wie in Kapitel 2.7 beschrieben 100 zufällig gewählte oberflächendesinfizierte Getreidekörner auf SNA-Nährböden ausgelegt und 14 Tage bei 17 °C in einem klimatisierten Raum inkubiert. Die Auswertung des Pilzbefalls erfolgte bei 100facher Vergrößerung, direkt auf der geöffneten Petrischale, im Durchlichtmikroskop. Zur Artbestimmung morphologisch zweifelhafter Isolate wurden mikroskopische Präparate in H<sub>2</sub>O hergestellt und mikroskopiert. Als Maß für die Befallsstärke wurde für jede Art der Prozentsatz befallener Körner angegeben (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Schimmelpilzbefall [%] von Gerste und Weizen nach Oberflächendesinfektion.

<b>Pilzart</b>	<b>Sommergerste [%]</b>	<b>Winterweizen [%]</b>
<i>Alternaria alternata</i>	2	12
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	1
<i>Drechslera teres</i>	-	2
<i>Fusarium culmorum</i>	75	75
<i>Fusarium graminearum</i>	-	1
<i>Microdochium nivale var. nivale</i>	-	1

Als Resultat war eine deutliche Infektion des Versuchsmaterials mit *Fusarium culmorum* festzustellen. Im Winterweizen ist neben *Fusarium culmorum* auch *Alternaria alternata* als Kontaminante von Bedeutung. In der Sommergerste konnten sich neben diesen Arten keine anderen Schimmelpilze durchsetzen. Dieses Versuchsmaterial sollte sich demzufolge bestens für Untersuchungen zur Hemmung von *Fusarium culmorum* eignen.

Da *Fusarium culmorum* zu den Gushing-relevanten Pilzen gehört, wurde mit dem Getreide ein Gushing-Test nach Donhauser durchgeführt (Donhauser *et al.*, 1990). Die Überschäumvolumina sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7 Überschäumvolumina beim Gushing-Test nach Donhauser. Es wurden die Mittelwerte aus 4 Untersuchungen gebildet

Getreideart	Überschäumvolumen [mL]
Winterweizen	273,7
Sommergerste	211,8

### 3.6.1 HPLC-Bestimmung des Deoxynivalenol-Gehaltes im Versuchsmaterial

Deoxynivalenol wurde aus Weizen und Gerste wie in Kapitel 2.14.1.1 beschrieben isoliert und mittels HPLC quantitativ bestimmt. Die Aufarbeitung erfolgte unter Verwendung von MycoSep-DON-Säulen (Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim.). Aus den Ergebnissen der Doppelansätze wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Zur Überprüfung dieser Methode wurde Deoxynivalenol im Weizen mit Hilfe von Immunoaffinitätssäulen DONtest™HPLC (VICAM, Watertown, USA) isoliert und bestimmt (siehe 2.14.2). Die Analysenergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung.

Getreide	DON-Gehalt [ $\mu\text{g/g}$ ]	Standardabweichung
Gerste <sub>MycoSep</sub>	8,85	0,78
Weizen <sub>MycoSep</sub>	16,02	1,09
Weizen <sub>Immunoaffinitätssäule</sub>	18,20	0,28

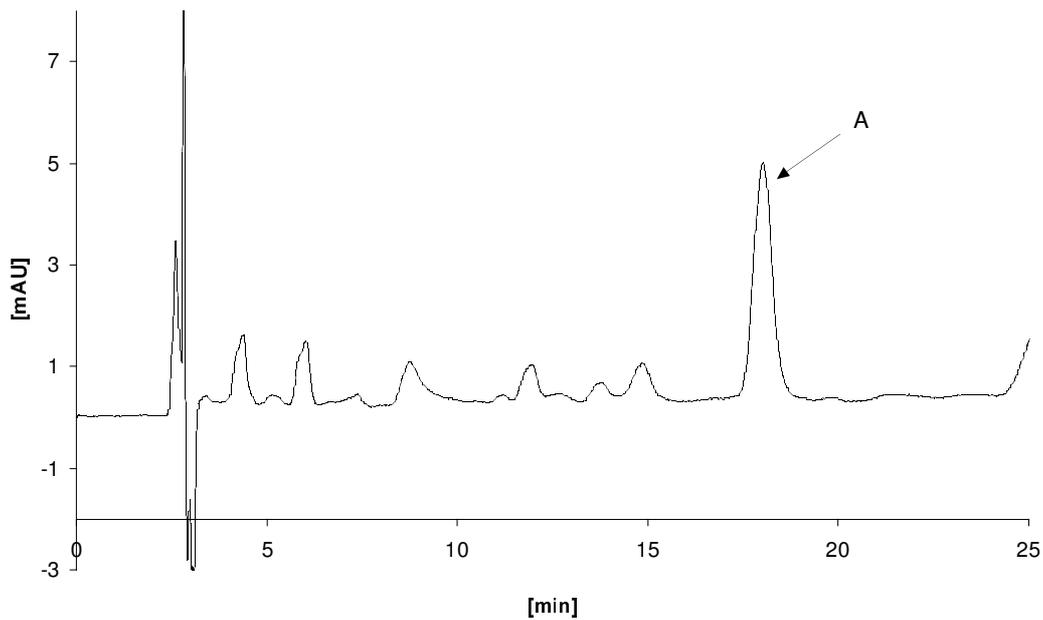


Abbildung 14 HPLC-Chromatogramm der Trennung von Deoxynivalenol in feldinfizierter Gerste. Die Aufarbeitung erfolgte mittels MycoSep-DON-Säulen. Mobile Phase: Methanol/H<sub>2</sub>O 15/85 (v/v); Flußrate: 1 mL/min; Detektion bei 227 nm. A: Deoxynivalenol

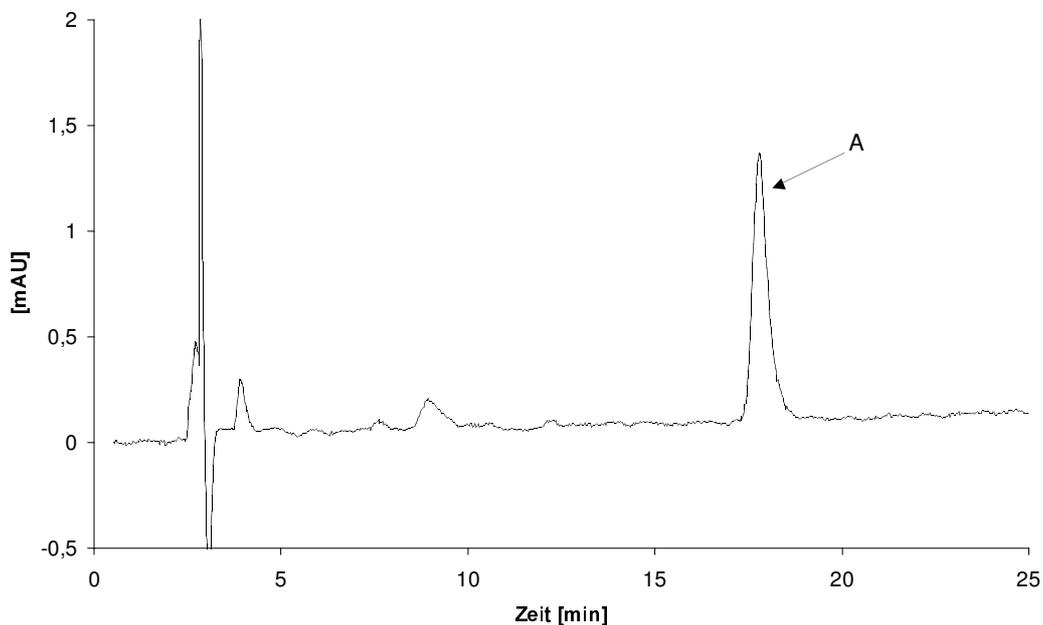


Abbildung 15 HPLC-Chromatogramm der Trennung von Deoxynivalenol in feldinfiziertem Weizen. Detektion bei 227 nm. Aufarbeitung erfolgte mittels einer Immunoaffinitätssäule. Mobile Phase: Methanol/H<sub>2</sub>O 15/85 (v/v); Flußrate: 1 mL/min; A: Deoxynivalenol

Mit MycoSep-DON-Säulen konnte ein sauberer Extrakt erhalten werden, aus welchem sich Deoxynivalenol sehr gut bestimmen ließ (siehe Abbildung 14 und Abbildung 16). Mit Immunoaf-

finitätssäulen wurde eine noch bessere Aufreinigung des Extraktes erreicht (siehe Abbildung 15). Die deutlich höheren Kosten der Immunoaffinitätssäulen machten diesen Vorteil jedoch schnell zunichte. Alle weiteren HPLC-Untersuchungen wurden daher unter Verwendung der MycoSep-DON-Säulen durchgeführt.

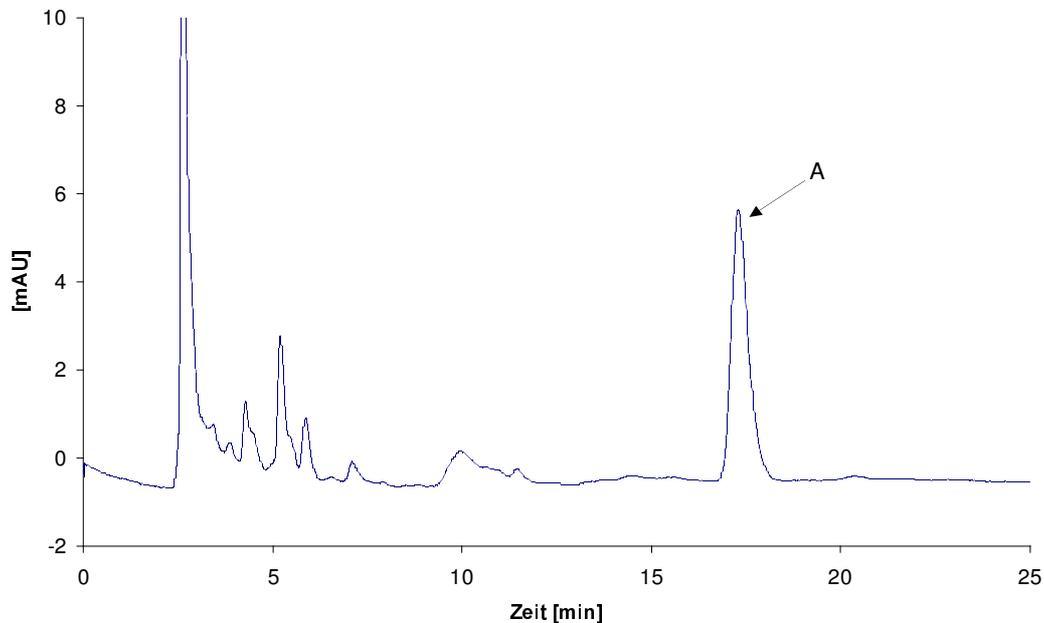


Abbildung 16 HPLC-Chromatogramm der Trennung von Deoxynivalenol in feldinfiziertem Weizen. Die Aufarbeitung erfolgte mittels MycoSep-DON-Säulen. Mobile Phase: Methanol/H<sub>2</sub>O 15/85 (v/v); Flußrate: 1 mL/min; Detektion bei 227 nm. A: Deoxynivalenol

### 3.7 Durchführung von Mälzungsversuchen mit Gerste und Weizen

Die im Agar-Test (siehe 2.5) beobachteten sehr guten Hemmwirkungen von *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418, *Paenibacillus polymyxa* Li2 und den Isolaten aus Jordanien konnten *in planta* nicht bestätigt werden. Die Behandlung von Getreide bzw. Malz mit antagonistischen Mikroorganismen zur Verminderung des Wachstums von Fusarien wurde deswegen in einem neuen Testsystem weiter verfolgt.

Zur Übertragung der *in vitro* erzielten Ergebnisse in die Praxis wurde die Mälzung von Getreide in Form eines modifizierten Kleinmälzungsmodells nach Narziss (1976) gewählt. Da ein Einsatz von Mikroorganismen im Weichwasser geplant war, konnten keine gebrauchstüblichen Kleinmälzungsanlagen verwendet werden. In diesen Anlagen werden mehrere kleine Getreidekästen in gemeinsamen Weichwasser eingeweicht. Aus diesem Grund wurde das Mälzungsmodell leicht modifiziert:

In Keimkästen aus Metall wurden jeweils 500 g Getreidematerial eingewogen und in separaten Schüsseln eingeweicht. Die zu überprüfenden Mikroorganismen wurden auf Malzextraktbouillon oder MRS-Bouillon vorkultiviert und dann dem Weichwasser mitsamt der Kulturlösung zugesetzt. Der pH-Wert der vorinkubierten Nährlösungen mit lebenden Keimen lag dabei in einem Bereich von 5,4 – 6,3. Alle Experimente wurden in einem Kühlraum bei 14 °C durchgeführt.

Das Getreide wurde nach folgendem Schema geweicht:

5 Stunden Naßweiche, 18 Stunden Luftrast, 2 Stunden Naßweiche, 168 Stunden Keimung. Das Getreide wurde während der Keimung zweimal täglich gewendet. Anschließend wurde das Getreide bei 60 °C 48 h lang im Trockenschrank getrocknet. Dabei wurde statt der üblichen 80 °C eine Darrtemperatur von 60 °C gewählt, um die Bildung weiterer Maillard-Produkte im Malz zu verhindern, welche die folgenden Analysen erschwert hätten. Nach Abschluß der Mälzung war der pH-Wert des Weichwassers < 4,0.

Nach der Mälzung wurden Proben zur Ermittlung der Fusarien-Keimzahl entnommen. Die Fusarien-Keimzahl im Grünmalz sollte mit Hilfe von selektiven Medien bestimmt werden (Böhm-Schraml *et al.*, 1993; Bragulat *et al.*, 1995). Das Probenmaterial wurde gemäß Kapitel 2.8.2 aufgearbeitet und inkubiert. Bei der Auswertung konnte festgestellt werden, daß *Fusarium culmorum* fest an den Malzpartikeln haftete und somit in weiteren Verdünnungsstufen nicht mehr nachweisbar war. Nach der Trocknung des Malzes konnten keine Lebendkeime von *Fusarium culmorum* auf Mannit-Malachitgrün-Agar nachgewiesen werden. Da sich diese Methode zur Bestimmung der Fusarien-Keimzahlen im Malz für diese Versuchsanordnung nicht eignete, mußte eine neue Methode entwickelt werden.

### **3.8 Indirekte Keimzahlbestimmung von *Fusarium culmorum* durch Anwendung der Tox5-PCR in einem quantitativen System**

#### **3.8.1 Tox5-PCR**

Wie in der Einleitung erwähnt ist die Biosynthese der Trichothecene in Cluster von Genen aufgeteilt, welche für Enzyme, die an der Bildung der Mykotoxine beteiligt sind, kodieren. *Tri5* (= *Tox5*) ist das erste Gen in der Biosynthese aller Trichothecene. Es kodiert für die Trichodien-Synthase, ein Enzym, welches die Ringbildung von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien katalysiert (siehe Abbildung 1 und Kapitel 1.3.2). Die Nukleotidsequenz von *tri5* wurde charakterisiert in *Fusarium sporotrichioides* (Hohn und Beremand, 1989), *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sam-*

*bucinum*) (Hohn und Desjardins, 1992), *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (Proctor *et al.*, 1995), *Fusarium poae* (Fekete *et al.*, 1995), *Myrothecium roridum* (Trapp *et al.*, 1995) und in *Stachybotrys chartarum* (Straus *et al.*, 1999).

Auf dem *tri5*-Gen basierend wurden die PCR-Primer Tox5-1 (vorwärts) und Tox5-2 (rückwärts) entworfen (siehe 2.9.6). Die Länge des PCR-Produktes beträgt 658 bp (Niessen und Vogel, 1998).

### 3.8.2 Quantifizierungsmethode mittels Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen®

Mittels Tox5-PCR konnte die vorhandene DNA aller in den untersuchten Getreide- und Malzproben vorkommenden Trichothecen-bildenden Fusarien-Arten nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung des erhaltenen PCR-Produktes wurde eine fluoreszenzoptische Methode entwickelt (siehe 2.11). Verwendet wurde dabei der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® (Molecular Probes, Eugene, USA), welcher nur mit doppelsträngiger DNA reagiert. Die Empfindlichkeit dieser Reaktion erlaubt es, DNA bis zu einer Konzentration von 25 pg/mL zu detektieren. Die Fluoreszenzwerte von PicoGreen® sind über den gesamten Meßbereich von 25 pg/mL – 1000 ng/mL linear (siehe Abbildung 17). Weiterhin wird die Fluoreszenz nicht durch einzelsträngige DNA, RNA, Proteine oder andere bei der Aufarbeitung der DNA eingebrachte Verunreinigungen beeinflusst.

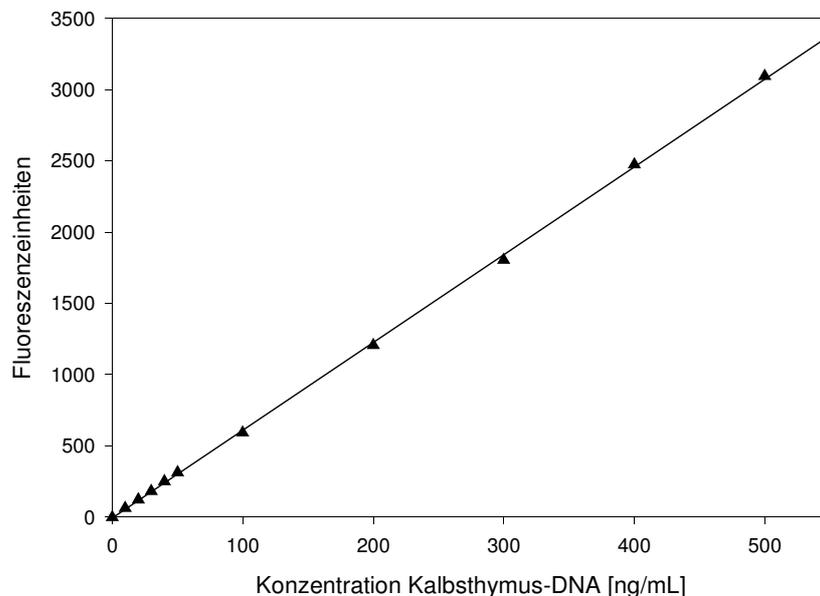


Abbildung 17 Bestimmung der Konzentrationen von Kalbsthymus-DNA mit PicoGreen® (Molecular Probes, Eugene, USA): die Proben wurden bei 485 nm Extinktion und 520 nm Emission gemessen

Die Meßmethode umfasste 3 Schritte:

1. Mit der aus dem Probenmaterial isolierten DNA wurde eine PCR durchgeführt unter Verwendung der Primer Tox5-1 und Tox5-2 (im späteren Verlauf der Arbeit wurden die Primer OPT18 F und OPT18 R (siehe Kapitel 2.9.6) verwendet).
2. 10 µL des PCR-Produktes wurden zur Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® eingesetzt und wie in Kapitel 2.11 beschrieben vermessen.
3. Ein Aliquot des erhaltenen PCR-Produktes wurde auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, um mittels Elektrophorese die Basenpaarlänge des Amplifikates zu überprüfen.

### 3.8.3 Korrelation zwischen Tox5-PCR-Produkt und Pilz-Biomasse

Zur Überprüfung, ob von der Menge an erhaltenem Tox5-PCR-Produkt der isolierten *Fusarium culmorum*-DNA auf die Biomasse des Pilzes geschlossen werden kann, wurde eine Wachstumskurve von *Fusarium culmorum* in Malzextrakt aufgenommen. In zeitlichen Abständen wurden parallel je zwei Proben entnommen. Das Myzel einer der beiden Proben wurde gewaschen, getrocknet und auf der Feinwaage gravimetrisch bestimmt. Daraus resultierte die Trockenbiomasse von *Fusarium culmorum* in mg/mL. In der zweiten Probe wurde das Myzel lysiert (siehe 2.9.2) und mit einem Aliquot der isolierten DNA eine Tox5-PCR durchgeführt. Die erhaltenen Meßdaten sind in Abbildung 18 dargestellt.

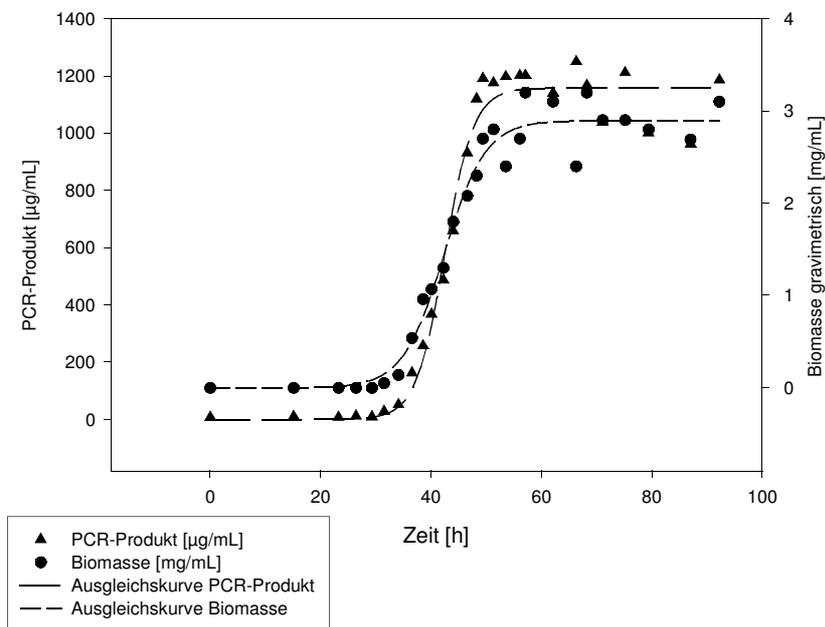


Abbildung 18 Gegenüberstellung der Wachstumskurve von *Fusarium culmorum* in Malzextrakt (bei Raumtemperatur) und der erhaltenen Mengen an Tox5-PCR-Produkt, der jeweiligen DNA-Isolate

Trägt man die Meßwerte des linearen Bereichs beider Graphen gegeneinander auf, wird eine Korrelation deutlich (siehe Abbildung 19).

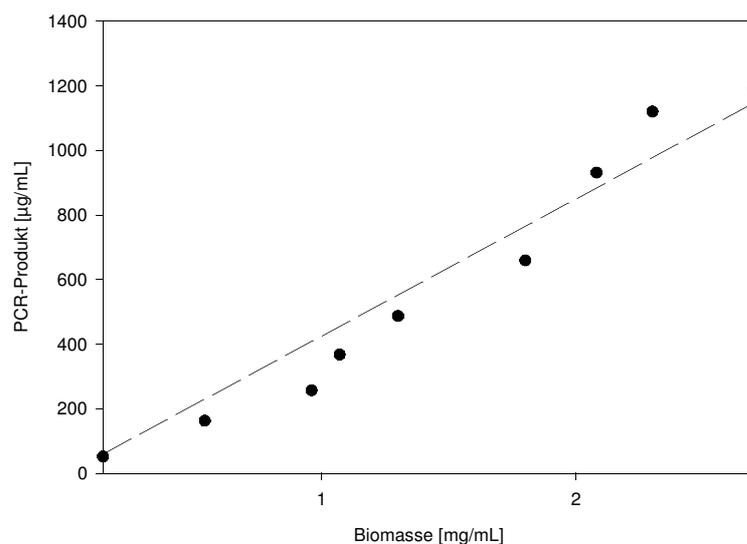


Abbildung 19 Graphische Darstellung der Korrelation zwischen Biomasse und PCR-Produkt nach Tox5-PCR mit *Fusarium culmorum*-DNA

### 3.9 Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von PCR-Produkten mittels Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen®

Es wurde geprüft, ob die bestehende PCR-Methode mit den Primern Tox5-1 und Tox5-2 für die quantitative Analyse von *Fusarium culmorum*-DNA geeignet ist.

Der Verlauf einer PCR entspricht einer sigmoiden Funktion. Für die quantitative Analyse ist es daher sehr wichtig, im linearen Bereich der Reaktionskurve zu messen. Dies hängt neben der Menge an vorhandenen Nukleotiden, der Konzentration der Taq-Polymerase sowie der Zyklenanzahl vor allem von der eingesetzten DNA-Menge zu Beginn der PCR ab.

Aus diesem Grund wurde mit einer Verdünnungsreihe von *Fusarium graminearum*-DNA unter den in Kapitel 2.9.3 genannten Reaktionsbedingungen eine Tox5-PCR (siehe Abbildung 20) mit anschließender Fluoreszenzmessung vorgenommen (siehe 2.11 und Abbildung 21).

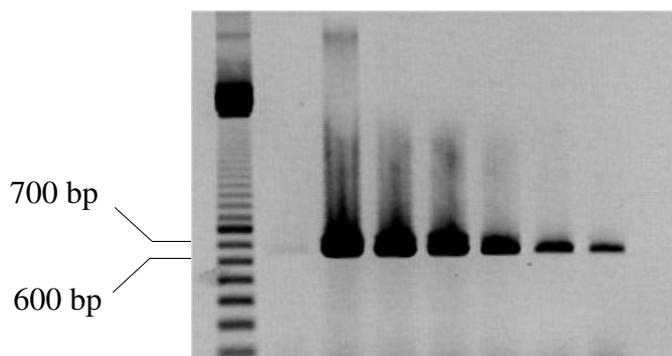


Abbildung 20 Tox5-PCR mit DNA von *Fusarium graminearum* (Verdünnungsstufen wie in Abbildung 21 angegeben). Die Größe des PCR-Produktes betrug 658 bp.

Auf diese Weise konnte festgestellt werden, welche DNA-Ausgangskonzentration nicht überschritten werden durfte, um bei bekannten Reaktionsbedingungen den linearen Bereich nicht zu verlassen. Durch Vergleich der Fluoreszenz bzw. der Bandenstärke der Proben mit einer mitgeführten DNA-Kontrolle (*F. culmorum*-DNA in bekannter Konzentration) konnte sichergestellt werden, daß die Menge an erhaltenem PCR-Produkt der untersuchten Proben im linearen Meßbereich lag (Voraussetzung: gleichbleibende Reaktionsbedingungen).

Die Aufarbeitung der Probe war ebenfalls von großer Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der PCR-Methode. Um eine verlässliche quantitative Aussage über den Fusarienbefall einer Getreidecharge zu erhalten, mußte eine hinreichend große Menge an Getreide untersucht werden. In früheren Arbeiten basierte die Aufreinigung der DNA vor allem auf der Isolierung der Fusarien-DNA von der Kornoberfläche mittels Schütteln und Ultraschallbehandlung (Mulfinger *et al.*, 2000). Bei

dem Versuch, mittels DNA-Isolierung von der Oberfläche des Getreidekorns zu wiederholbaren Ergebnissen zu gelangen, wurde schnell klar, daß diese Methode keineswegs zur quantitativen Analyse geeignet ist. Es traten große Schwankungen bei den Fluoreszenzmessungen der Fusarien-DNA von Parallelansätzen auf (siehe Tabelle 3.8).

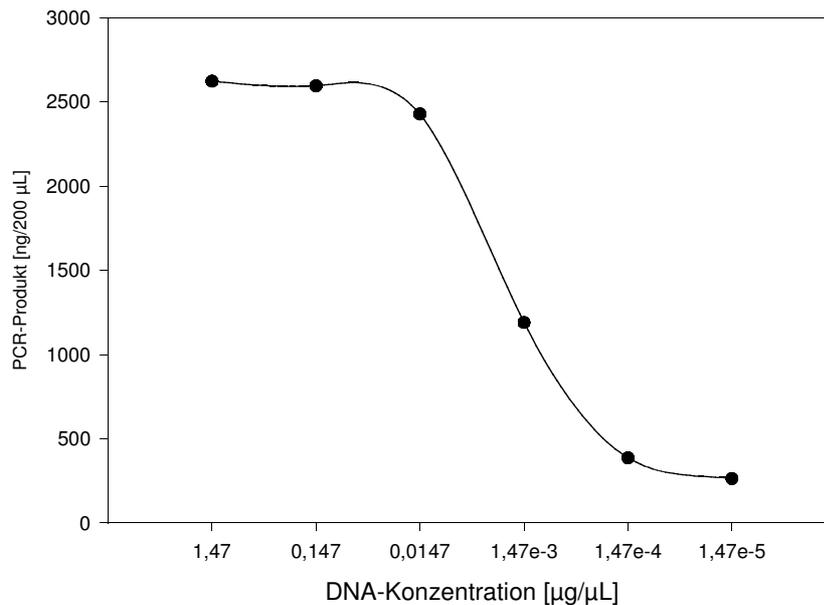


Abbildung 21 Sigmoider Verlauf einer PCR mit *Fusarium graminearum*-DNA in verschiedenen Konzentrationen; aufgetragen wurden die DNA-Konzentrationen vor der PCR gegen das erhaltene PCR-Produkt

Die Ausbeute an *Fusarium*-DNA konnte durch Mahlen der Getreideproben um ein Vielfaches erhöht werden (siehe Abbildung 22). Dabei wurden die gesamten 500 g Malz eines Versuches gemahlen, was zu einer besseren Durchmischung der Probe führte. Die Reproduzierbarkeit wurde auf diesem Weg ebenfalls verbessert (siehe Tabelle 3.9).

Tabelle 3.8 Fluoreszenzmessung von Tox5-PCR-Produkten mit PicoGreen®. DNA-Isolierung erfolgte von der Kornoberfläche einer Malzcharge. Ansatz A – D: 4 verschiedene DNA-Isolierungen aus derselben Malzcharge, Ansatz 1 – 6: aus einer DNA-Isolierung 6 Ansätze zur PCR entnommen. Gleichung der linearen Regression (Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA):  $x = \frac{(y - 135,86)}{34,486}$   $r^2 = 0,9997$

Probe	Fluoreszenz-einheiten	berechnete DNA-Menge [ $\mu\text{g/g}$ ]	Mittelwert	Standardabweichung
A	1788	1,25		0,87
B	4529	3,31		
C	3422	2,48		
D	2782	2,00	2,3	
1	3611	2,62		0,86
2	6069	4,47		
3	5955	4,39		
4	4431	3,24		
5	4574	3,35		
6	3375	2,44	3,4	

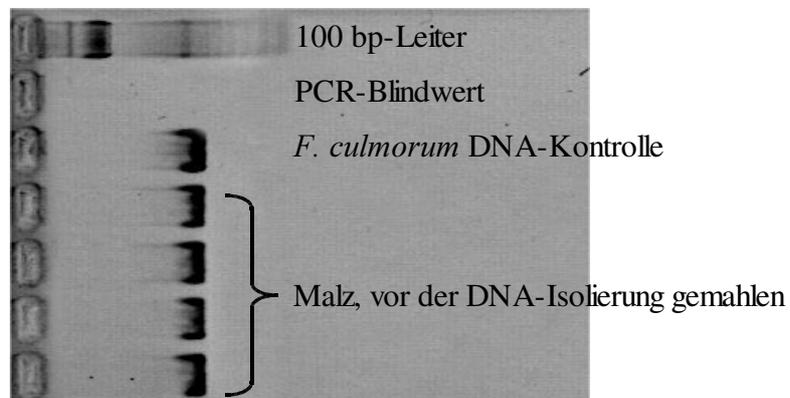


Abbildung 22 Tox5-PCR mit Fusarien-DNA, welche aus einem mit *Lactobacillus animalis* TMW1.972 behandelten Malz isoliert wurde. Das Malz wurde vor der DNA-Isolierung gemahlen

Tabelle 3.9 Fluoreszenzmessung von Tox5-PCR-Produkten mit PicoGreen®. DNA-Isolierung erfolgte nach dem Mahlen der gesamten Malzcharge. Ansatz A – D: 4 verschiedene DNA-Isolierungen aus derselben Malzcharge. Gleichung der linearen Regression (Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA):

$$x = \frac{(y + 6,8149)}{38,048} \quad r^2 = 0,9998$$

<b>Proben</b>	<b>Fluoreszenz-einheiten</b>	<b>berechnete DNA-Menge [µg/g]</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardab- weichung</b>
A	<b>2412</b>	2,56	2,9	0,33
B	<b>2548</b>	2,69		
C	<b>2748</b>	2,93		
D	<b>3147</b>	3,30		

Versuche mit Ultraschallbehandlungen unterschiedlicher Dauer zeigten, daß die DNA-Ausbeute bei einer Ultraschallbehandlung von 2 min am größten war. Längere Behandlungen führten zu geringeren Ausbeuten. Dieser Befund läßt sich durch frühere Untersuchungen erklären, wonach Ultraschallbehandlungen eine Fragmentierung der DNA zur Folge haben können (Maidan *et al.*, 1997). Besonders stark trat dieser Effekt bei einer Behandlung der DNA mit einem Ultraschallbad zutage. Diese Effekte konnten bei der Benutzung einer Ultraschallsonde nicht festgestellt werden. Für weitere Isolierungen von DNA wurde daher eine Ultraschallsonde verwendet. Die Analysenzeit für die Aufarbeitung der Probe sollte möglichst gering gehalten werden, aus diesem Grund wurde die Dauer der Ultraschallbehandlung auf 60 sec festgelegt.

Verschiedene Ansatzmöglichkeiten wurden getestet, um nach der PCR gleiche Volumina zu erhalten. Eine mögliche Methode war die Überschichtung der PCR mit Mineralöl, was jedoch die anschließende Fluoreszenzmessung empfindlich störte. Das Überschichten der Proben mit Paraffin führte zu verbesserten Ergebnissen, die verbleibenden Paraffin-Partikel von erstarrtem Paraffin waren jedoch ebenfalls problematisch bei der Fluoreszenzmessung. Die Verwendung von 0,2-mL-Micro-Strips LP (ABgene®House, Hamburg) brachte ausreichend reproduzierbare Ergebnisse ohne störende Faktoren (siehe Tabelle 3.12). Aufgrund des dichten Abschlusses der Micro-Strips-Deckel traten keine Volumenschwankungen auf.

Tabelle 3.10 Fluoreszenzmessung von Tox5-PCR-Produkten mit PicoGreen®. DNA-Isolierung erfolgte nach Mahlen des Getreides. Bei der anschließenden PCR wurden die Ansätze mit Mineralöl überschichtet. Ansatz A – D: 4 verschiedene DNA-Isolierungen aus derselben Malzcharge; Ansatz 1 – 6: aus einer DNA-Isolierung 6 Ansätze zur PCR entnommen. Gleichung der linearen Regression (Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA):

$$x = \frac{(y - 97,756)}{31,281} \quad r^2 = 0,9998$$

Probe	Fluoreszenzeinheiten	berechnete DNA-Menge [µg/g]	Mittelwert	Standardabweichung
A	2222	1,77	2,4	0,42
B	3691	2,68		
C	3627	2,63		
D	3373	2,44		
1	3738	2,72	2,6	0,76
2	4311	3,15		
3	4703	3,44		
4	3912	2,85		
5	2446	1,74		
6	2219	1,57		

Tabelle 3.11 Fluoreszenzmessung von Tox5-PCR-Produkten mit PicoGreen®. DNA-Isolierung erfolgte nach Mahlen des Getreides. Bei der anschließenden PCR wurden die Ansätze mit Paraffin überschichtet. Ansatz A – D: 4 verschiedene DNA-Isolierungen aus derselben Malzcharge; Ansatz 1 – 6: aus einer DNA-Isolierung 6 Ansätze zur PCR entnommen. Gleichung der linearen Regression (Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA):

$$x = \frac{(y + 7,8296)}{36,62} \quad r^2 = 0,9999$$

Probe	Fluoreszenzeinheiten	berechnete DNA-Menge [µg/g]	Mittelwert	Standardabweichung
A	3450	2,46	2,6	0,18
B	3818	2,78		
C	3351	2,42		
D	3755	2,73		
1	3426	2,48	2,6	0,22
2	3741	2,72		
3	3916	2,85		
4	3972	2,89		
5	3389	2,45		
6	3315	2,40		

Tabelle 3.12 Fluoreszenzmessung von Tox5-PCR-Produkten mit PicoGreen®. DNA-Isolierung erfolgte nach Mahlen des Getreides. Die anschließende PCR wurde in 0,2 mL-Micro-Strips LP (Abgene®House, Hamburg) durchgeführt. Ansatz A – D: 4 verschiedene DNA-Isolierungen aus derselben Malzcharge; Ansatz 1 – 6: aus einer DNA-Isolierung 6 Ansätze zur PCR entnommen. Gleichung der linearen Regression

$$\text{(Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA): } x = \frac{(y - 1,1883)}{27,988} \quad r^2 = 0,9999$$

Probe	Fluoreszenzeinheiten	berechnete DNA-Menge [µg/g]	Mittelwert	Standardabweichung
A	2890	2,58	2,5	0,10
B	2856	2,55		
C	2755	2,46		
D	2912	2,60		
1	3113	2,78	2,5	0,10
2	2744	2,45		
3	2755	2,46		
4	2912	2,60		
5	2845	2,54		
6	2841	2,54		

Alle weiteren Mälzungen wurden anschließend mit Tox5-Primern gemäß Kapitel 2.9.3 analysiert und die erhaltenen PCR-Produkte mit dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® quantifiziert (siehe Kapitel 2.11).

### 3.10 Indirekte Keimzahlbestimmung von *Fusarium culmorum* durch Quantifizierung des PCR-Produktes nach Mälzungen mit ausgewählten Mikroorganismen

Aufgrund eigener Vorarbeiten (siehe 3.2) und von anderen am Lehrstuhl durchgeführten Arbeiten wurden die in diesen Untersuchungen verwendeten Mikroorganismen zu Mälzungsversuchen eingesetzt. Organismen, deren hemmende Wirkung in der Literatur beschrieben wurde, kamen in den folgenden Testreihen ebenfalls zum Einsatz.

#### 3.10.1 Mälzungen von Weizen unter Zusatz von Mikroorganismen zum Weichwasser

Alle Mälzungen wurden als Doppelbestimmungen (wie in Kapitel 3.7 beschrieben) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.13 aufgeführt und in Teilen in Abbildung 25 graphisch dargestellt.

Tabelle 3.13 Menge des Amplifikates der Tox5-PCR nach der Mälzung von Weizen unter Zusatz der unten aufgeführten Mikroorganismen. Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

Probe	PCR-Produkt [ $\mu\text{g/g}$ ]
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975	0,16
Kontrolle1	1,95
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983	0,22
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962	0,68
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.726	1,98
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.992	3,61
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.418	1,73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.420	4,30
Kontrolle2	1,89
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.419	3,45
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Li2	2,17
<i>Bacillus licheniformis</i> Jord B	2,38
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.55	1,84
Kontrolle3	1,97
Kontrolle4	1,90
<i>Lactobacillus pontis</i> TMW1.1101	1,30
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.970	3,10
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TMW1.988	2,20
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855	0,66
<i>Pichia membranaefaciens</i> TMW3.076	1,40
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854	0,70
<i>Pichia anomala</i> DSM70263	1,30
Kontrolle5	1,85
Kontrolle6	1,60
Kontrolle7	2,40
<i>Pichia membranaefaciens</i> DSM70169	3,20
<i>Pichia membranaefaciens</i> TMW3.017	2,30
<i>Lactobacillus plantarum</i> LTH2354	1,95
<i>Lactobacillus reuteri</i> LTH2584	2,10
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.970	1,95
<i>Lactobacillus animalis</i> TMW1.972	2,30
<i>Pichia fermentans</i> DSM70090	0,50
Kontrolle8	1,60
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001	0,10

In Abbildung 23 und Abbildung 24 sind Beispielgele für die Tox5-PCR mit Fusarien-DNA, wel-

che aus Weizenmalzen isoliert wurde, dargestellt. Die dazugehörigen Meßdaten sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

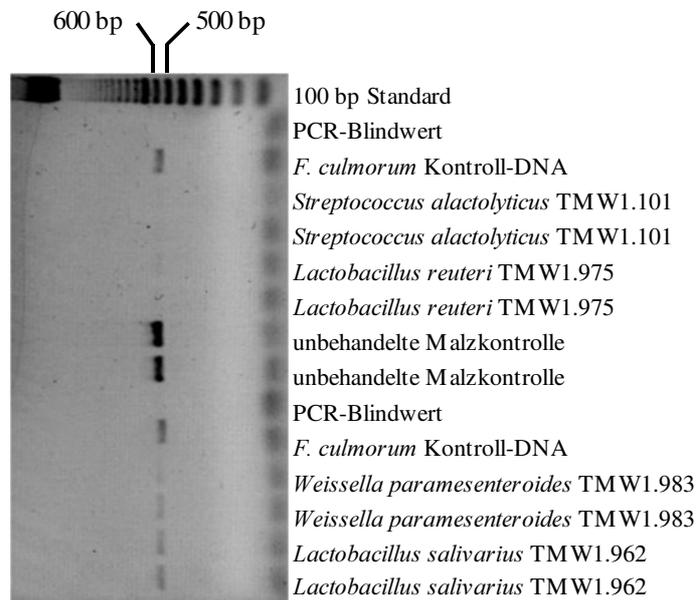


Abbildung 23 Vergleichende Tox5-PCR verschiedener mit antagonistischen Mikroorganismen behandelter Weizen-Mälzungen bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle. In den Mälzungen wurden die oben angegebenen Mikroorganismen eingesetzt

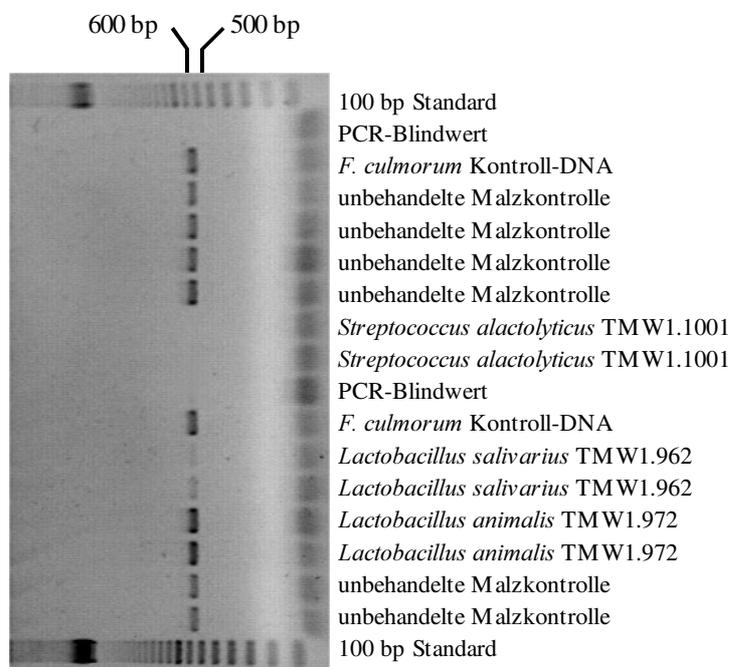


Abbildung 24 Vergleichende Tox5-PCR verschiedener mit antagonistischen Mikroorganismen behandelter Weizen-Mälzungen bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle. In den Mälzungen wurden die oben angegebenen Mikroorganismen eingesetzt

Folgende Organismen zeichneten sich durch Verminderung der nachweisbaren DNA-Menge um

über 50 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle aus: *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001, *Streptococcus alactolyticus* TMW1.101, *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854, *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.855, *Lactobacillus salivarius* TMW1.962, *Lactobacillus reuteri* TMW1.975 und *Weissella paramesenteroides* TMW1.983.

Organismen, welche das Wachstum von Fusarien gegenüber der Kontrolle förderten, waren: *Lactobacillus reuteri* TMW1.970 und *Lactobacillus acidophilus* TMW1.988.

Die Organismen, die in *in vitro* Untersuchungen Hemmeffekte zeigten, konnten in der Mälzung das Wachstum von Fusarien kaum beeinflussen.

### 3.10.2 Mälzungen von Gerste unter Zusatz von Mikroorganismen zum Weichwasser

Für die Mälzungen mit Gerste wurden nur noch diejenigen Mikroorganismen eingesetzt, die bei Mälzungen mit Weizen signifikante Unterschiede in der nachweisbaren Biomasse von *F. culmorum* gegenüber den mitgeführten Kontrollen bewirkten. Zu diesem Zweck wurden die Organismen verwandt, die die besten Wachstumshemmungen bei den vorangegangenen Mälzungen von Weizen zeigten. Auch Organismen, die in den Versuchen mit Weizen das *Fusarium culmorum*-Wachstum begünstigten, kamen bei den Gerste-Mälzungen zum Einsatz. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die aus den Weizen-Mälzungen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich Hemmung bzw. Förderung des *Fusarium culmorum*-Wachstums auch für Gerste-Mälzungen Gültigkeit hatten.

Tabelle 3.14 Menge des Amplifikates der Tox5-PCR nach der Mälzung von Gerste unter Zusatz der unten aufgeführten Mikroorganismen. Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

Probe	PCR-Produkt (Mittelwert) [ $\mu\text{g/g}$ ]
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001	n. n.
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.970	9,6
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975	6,5
<i>Lactobacillus pontis</i> TMW1.1101	0,1
Kontrolle1	6,9
Kontrolle2	7,3
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983	3,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TMW1.988	8,2
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962	1,1

<b>Probe</b>	<b>PCR-Produkt (Mittelwert) [<math>\mu\text{g/g}</math>]</b>
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.726	8,9
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.101	0,8
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854	4,7
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855	3,4
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.992	n. n.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.418	7,1
<i>Pichia anomala</i> DSM70263	3,3

Die Trends - Verringerung bzw. Verstärkung des PCR-Signals beim Tox5-Nachweis -, welche bei Mälzungen mit Weizen erkennbar wurden, konnten bei Mälzungen mit Gerste erneut bestätigt werden. Da bei der PCR mit Tox5-Primern in Gerstenmalz größere Schwierigkeiten auftraten (im Gegensatz zur Opt18-PCR konnten mit der Tox5-PCR keine reproduzierbaren Signale im Gerstenmalz erhalten werden), wurde die PCR in den weiteren Versuchen mit Opt18-Primern (spezi-fische Primer für *Fusarium culmorum*) durchgeführt (siehe 2.9.3 und 2.9.6). Zum Vergleich der Mälzungen wurden die Kontrollen beider Getreidemälzungen gleich 100 Prozent gesetzt. Ein Vergleich der relativen Zahlen ist in Abbildung 25 zu sehen. Es ist erkennbar, daß in den meisten Fällen der Trend aus den Ergebnissen der Weizenmälzungen bei den Gerstemälzungen bestätigt wurde.

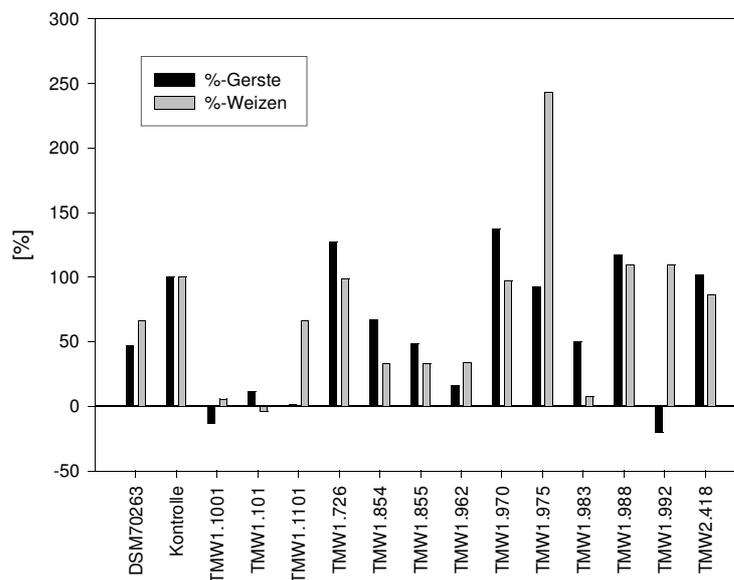


Abbildung 25 Vergleich der relativen Zahlen der amplifizierten DNA-Fragmente von *Fusarium culmorum* aus Versuchsmälzungen mit Gerste und Weizen unter Zusatz von antagonistisch wirksamen Mikroorganismen (Stämme siehe Tabelle 3.14). Die Mittelwerte beider Kontrollen wurden = 100 Prozent gesetzt

Zur Ermittlung möglicher Ursachen der Hemmung wurden erneut Mälzungen nach folgendem Schema durchgeführt: Die Mikroorganismen wurden wie bisher inkubiert, der Ansatz jedoch in 2 Teile geteilt. Ein Teil wurde vollständig zum Weichwasser der Mälzung zugesetzt (1.v). Nach Ablauf der Naßweichen wurde dasselbe Weichwasser erneut für eine weitere Mälzung mit einer neuen Gersten-Charge eingesetzt (2.v). Nachdem aus dem 2. Teil der Nährlösung die Zellen durch Zentrifugieren entfernt wurden, wurde die verbleibende Lösung zum Weichwasser der Mälzung zugesetzt (o).

Durch diesen Ansatz sollte geklärt werden, ob die Zellen der Mikroorganismen direkt an der Hemmung beteiligt sind oder ob hemmende Stoffwechselprodukte beim Inkubieren der Mikroorganismen gebildet und in das Medium abgegeben wurden. Durch die erneute Mälzung im zuvor benutzten Weichwasser sollte eine induzierte Abwehrreaktion durch das keimende Gerstenkorn festgestellt werden. Die Versuchsansätze sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.15 Fluoreszenzmessung von Opt18-PCR-Produkten. DNA-Isolierung erfolgte aus Gerste-Mälzungen unter Zusatz antagonistisch wirksamer Mikroorganismen bzw. aus unbehandelten Kontrollansätzen (K1-K3). Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt. Gleichung der linearen Regression (Eichkurve

mit Kalbsthymus-DNA):  $x = \frac{(y - 25,477)}{19,42} \quad r^2 = 0,999$

<b>Probe</b>	<b>Fluoreszenzeinheiten</b>	<b>berechnete DNA-Menge [µg/g]</b>
K2	5190	6,91
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983 o	3825	5,09
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983 1.v	3148	4,18
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983 2.v	3051	4,05
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962 o	3182	4,23
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962 1.v	2407	3,19
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962 2.v	4832	6,44
K3	5595	7,46
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854 o	1029	1,34
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854 1.v	2521	3,34
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854 2.v	1185	1,55
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975 o	2829	3,75
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975 1.v	2796	3,71
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975 2.v	1801	2,38
K1	4968	6,62
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001 o	5516	7,35
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001 1.v	2869	3,81
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001 2.v	5199	6,93
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855 o	4161	5,54
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855 1.v	3611	4,80
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855 2.v	3627	4,82

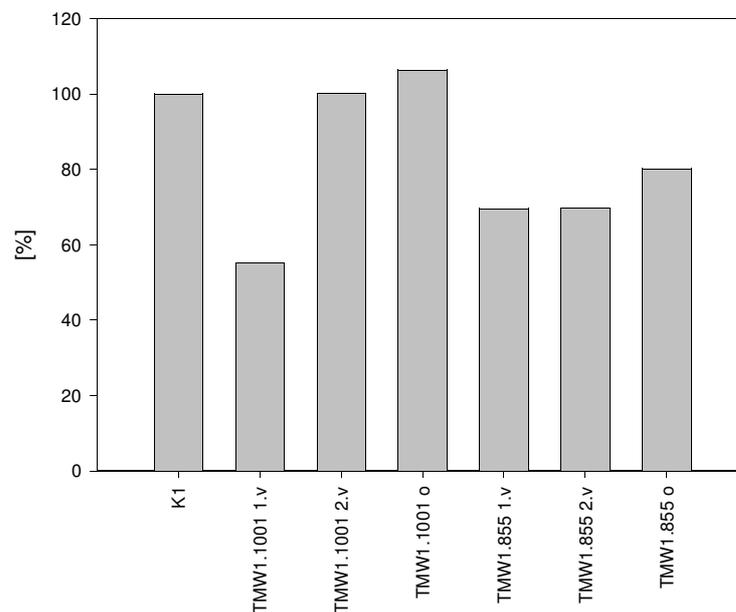


Abbildung 26 Vergleich des relativen Fusarium-DNA-Gehaltes einer mit antagonistischen Mikroorganismen behandelten Mälzung (Gerste) bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K1). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001, *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.855. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

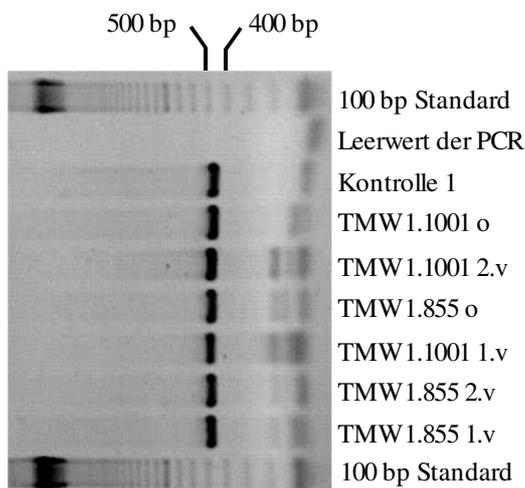


Abbildung 27 Vergleichende Opt18-PCR einer mit antagonistischen Mikroorganismen behandelten Mälzung (Gerste) bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K1). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001, *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.855. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

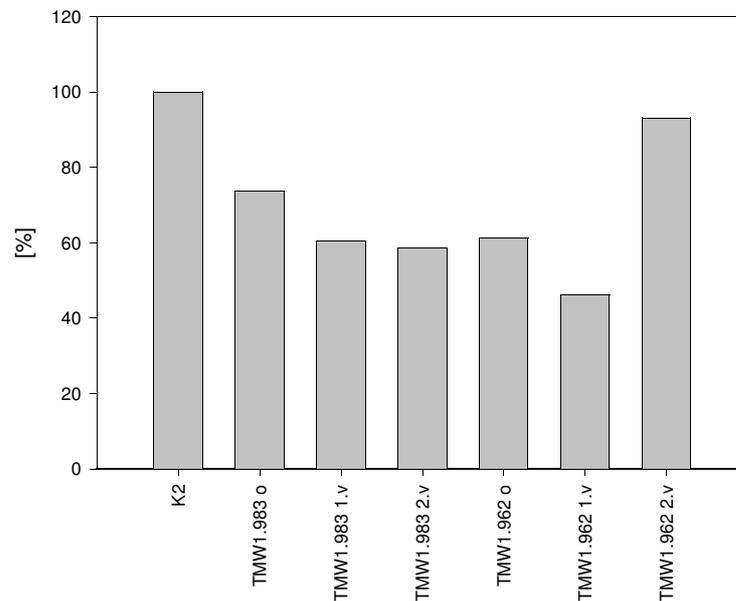


Abbildung 28 Vergleich des relativen Fusarium-DNA-Gehaltes einer mit antagonistischen Mikroorganismen behandelten Mälzung (Gerste) bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K2). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Weissella paramesenteroides* TMW1.983, *Lactobacillus salivarius* TMW1.962. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

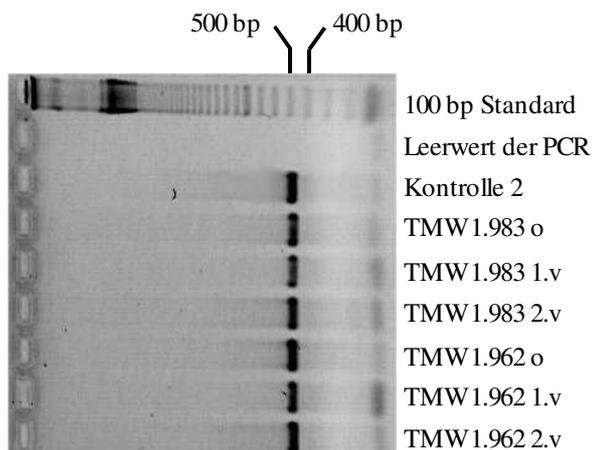


Abbildung 29 Vergleichende Opt18-PCR einer mit antagonistischen Mikroorganismen behandelten Mälzung (Gerste) bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K2). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Weissella paramesenteroides* TMW1.983, *Lactobacillus salivarius* TMW1.962. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

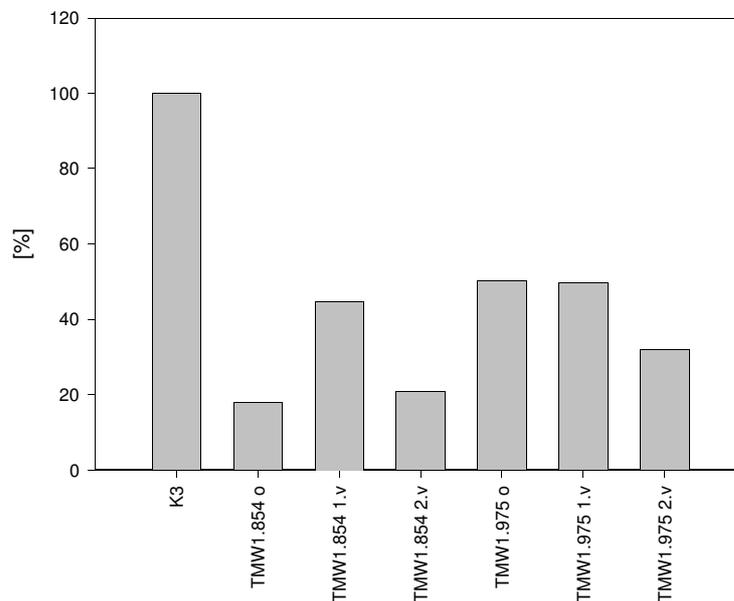


Abbildung 30 Vergleich des relativen Fusarium-DNA-Gehaltes einer mit antagonistischen Mikroorganismen behandelten Mälzung (Gerste) bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K3). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.854, *Lactobacillus reuteri* TMW1.975. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

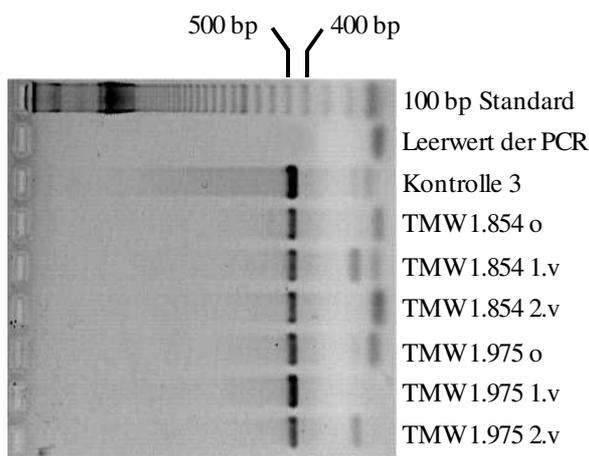


Abbildung 31 Vergleichende Opt18-PCR einer mit antagonistischen Mikroorganismen behandelten Mälzung (Gerste) bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K3). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.854, *Lactobacillus reuteri* TMW1.975. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

### 3.11 Einfluß von Antagonisten auf die Bildung des Mykotoxins Deoxynivalenol während der Mälzung mit Weizen- und Gerste

Aus den Mälzungen, welche als Test für die Hemmung des Wachstums von *Fusarium culmorum* stammten, wurden Aliquots für die Untersuchung von Deoxynivalenol entnommen. Die Malzproben wurden wie in Kapitel 2.14.1.1 beschrieben, bearbeitet und die dabei erhaltenen Extrakte mittels HPLC analysiert. Die Mykotoxine der Weizenmälzungen wurden mit einer mobilen Phase von Methanol/H<sub>2</sub>O 15/85 (v/v) isokratisch an einer „reversed phase“-Chromatographiesäule getrennt (siehe Abbildung 32). Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 3.16 dargestellt.

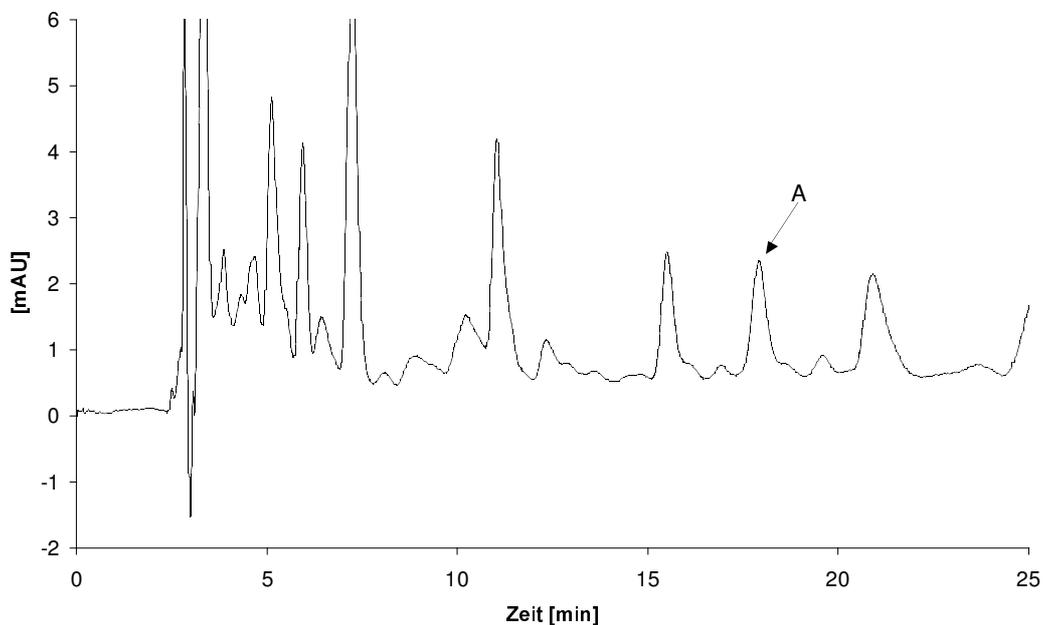


Abbildung 32 HPLC-Chromatogramm der Trennung von Deoxynivalenol in mit *Lactobacillus reuteri* TMW1.975 behandeltem Weizenmalz. Die Aufarbeitung erfolgte mit MycoSep-DON-Säulen. Mobile Phase: Methanol/H<sub>2</sub>O 15/85 (v/v); Flußrate: 1 mL/min; Detektion bei 227 nm. A: Deoxynivalenol

Tabelle 3.16 Gegenüberstellung der Menge des Amplifikates der Tox5-PCR mit den DON-Gehalten in Weizen nach der Mälzung mit den unten aufgeführten Mikroorganismen. Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

Probe	amplifizierte DNA [µg/g]	DON [µg/g]
<i>Bacillus licheniformis</i> Jord B	2,38	n. n.
Kontrolle1	1,95	7,70
Kontrolle2	1,89	3,04
Kontrolle3	1,97	6,50

<b>Probe</b>	<b>amplifizierte DNA [µg/g]</b>	<b>DON [µg/g]</b>
Kontrolle4	1,85	7,80
Kontrolle5	1,85	7,20
Kontrolle6	1,64	6,50
Kontrolle7	2,37	8,50
Kontrolle8	1,59	8,05
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TMW1.988	2,19	7,15
<i>Lactobacillus animalis</i> TMW1.972	2,28	9,01
<i>Lactobacillus plantarum</i> LTH2354	1,95	n. n.
<i>Lactobacillus pontis</i> TMW1.1101	1,32	4,27
<i>Lactobacillus reuteri</i> LTH2584	2,09	n. n.
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.55	1,84	n. n.
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.970	3,1	10,09
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975	0,16	5,60
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962	0,68	3,46
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.992	3,61	n. n.
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.726	1,98	4,56
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854	0,67	3,88
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855	0,66	3,89
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Li2	2,17	5,01
<i>Pichia anomala</i> DSM70263	1,32	4,92
<i>Pichia fermentans</i> DSM70090	0,49	2,96
<i>Pichia membranaefaciens</i> DSM70169	3,18	2,66
<i>Pichia membranaefaciens</i> TMW3.017	2,3	n. n.
<i>Pichia membranaefaciens</i> TMW3.076	1,43	n. n.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.418	1,73	7,67
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.419	3,45	n. n.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TMW2.420	4,3	2,75
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001	0,11	7,13
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.101	n. n.	6,38
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983	0,22	6,66

Ein graphischer Vergleich der Daten von amplifizierter DNA und DON aus den Mälzungen von Weizen ist in Abbildung 34 (siehe 91) dargestellt.

Für die Bestimmung der Mykotoxine DON, 15-Acetyl-DON und 3-Acetyl-DON in Gerste wurde die HPLC-Methode modifiziert. Als mobile Phase fand ein Acetonitril/H<sub>2</sub>O-Gemisch Verwendung, welches bei einem Fluß von 1 mL/min als Gradient (10% Acetonitril zu 25 % Acetonitril) gefahren wurde. Die Trennung erfolgte an einer „reversed phase“-Chromatographiesäule. Ein Standardchromatogramm ist in Abbildung 33 dargestellt.

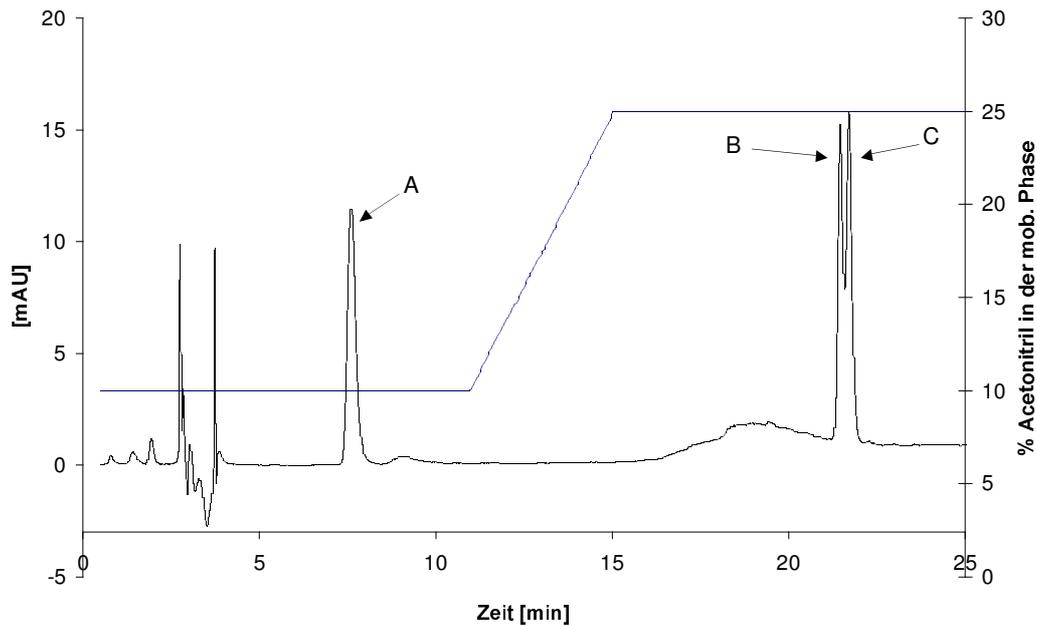


Abbildung 33 HPLC-Chromatogramm der Trennung von Fusarien-Mykotoxinen. Flußrate: 1 mL/min, Detektion bei 227 nm. A: Deoxynivalenol, B: 15-Acetyl-DON, C: 3-Acetyl-DON

Die erhaltenen Daten von Deoxynivalenol, 15-Acetyl-DON und 3-Acetyl-DON sind in Tabelle 3.17 dargestellt.

Tabelle 3.17 Gegenüberstellung der Gehalte an Deoxynivalenol, 3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON nach der Mälzung von Gerste unter Zusatz der unten aufgeführten Mikroorganismen und der Mälzung unbehandelter Kontrollansätze (K1-K3). Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

Probe	DON [µg/g]	3-Acetyl-DON [µg/g]	15-Acetyl-DON [µg/g]
K2	4,63	1,15	n. n.
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983 o	4,10	1,51	n. n.
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983 1.v	3,39	1,65	n. n.
<i>Weissella paramesenteroides</i> TMW1.983 2.v	3,91	1,28	n. n.
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962 o	5,06	1,42	n. n.
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962 1.v	4,10	1,40	n. n.
<i>Lactobacillus salivarius</i> TMW1.962 2.v	4,06	1,48	n. n.
K3	3,21	1,12	n. n.
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975 o	2,19	0,65	n. n.
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975 1.v	3,82	1,51	n. n.
<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.975 2.v	2,98	0,92	n. n.
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854 o	4,11	0,75	0,94
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854 1.v	4,92	0,72	n. n.
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.854 2.v	4,75	1,37	0,11
K1	5,60	2,01	0,47
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855 o	8,75	4,42	0,24
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855 1.v	6,54	0,32	0,29
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.855 2.v	3,45	1,41	n. n.
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001 o	7,93	0,73	n. n.
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001 1.v	7,10	4,20	n. n.
<i>Streptococcus alactolyticus</i> TMW1.1001 2.v	3,67	0,77	n. n.

### 3.11.1 Korrelation zwischen DNA- und DON-Gehalt

In Abbildung 34 sind die vergleichenden Ergebnisse von PCR-Produkt und DON-Gehalt bei Weizenmälzungen dargestellt. Aus den einzelnen Kontrollen wurde der Mittelwert bestimmt, um die Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Mälzungen festzustellen. Die Schwankung der amplifizierten DNA-Mengen lag bei  $\pm 0,24$  µg/g. Die Schwankung der Mykotoxinwerte lag bei  $\pm 1,7$  µg/g. Dies erklärt sich aus den anfänglichen Schwierigkeiten bei der Mälzung und den verschiedenen Methoden zur Darre des Malzes.

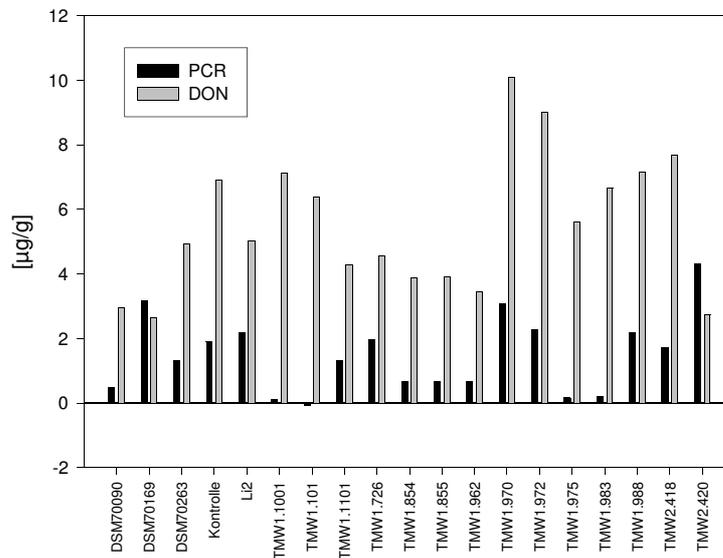


Abbildung 34 Vergleich der Menge an amplifizierter DNA (Tox5-Primer) von *Fusarium culmorum* mit den DON-Gehalten mit antagonistischen Mikroorganismen (Vergleich Tabelle 3.16) behandelte Weizen-Mälzungen bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle

Bei der Auswertung der Ergebnisse aus den Weizenmälzungen waren 3 Kategorien zu erkennen (siehe Abbildung 34):

1. Die Höhe des PCR-Signals und des DON-Gehaltes schwankte zwischen den einzelnen Ansätzen mit verschiedenen eingesetzten Testorganismen. Dabei blieb das Verhältnis zwischen PCR-Signal und DON-Gehalt nahezu gleich.
2. Das Verhältnis zwischen PCR-Signal und DON-Gehalt kehrte sich um. Es kam zu einem Anstieg der Pilzbiomasse bei gleichzeitiger verminderter DON-Produktion. Ein erfolgter Abbau von DON in diesen Mälzungen wäre demnach nicht auszuschließen.
3. Es kam zu einer starken Verminderung des PCR-Signals bei gleichzeitigem Anstieg des DON-Gehaltes. Hier scheint starker Streß auf *Fusarium culmorum* ausgeübt worden zu sein, hervorgerufen durch die Behandlung mit antagonistisch wirksamen Mikroorganismen.

In den Abbildungen 35-37 sind die DNA-Gehalte von *Fusarium culmorum* nach Amplifikation mit Opt18-Primern den Mykotoxinmengen von Deoxynivalenol und 3-Acetyl-DON vergleichend gegenübergestellt. Jede Abbildung stellt einen eigenständigen Mälzungsversuch dar. Die absoluten Meßwerte der Mälzungen können aufgrund der Schwankungen zwischen den einzelnen An-

sätzen nur innerhalb eines Versuches, nicht aber untereinander verglichen werden. Die Meßdaten sind in Tabelle 3.15 und Tabelle 3.17 dargestellt.

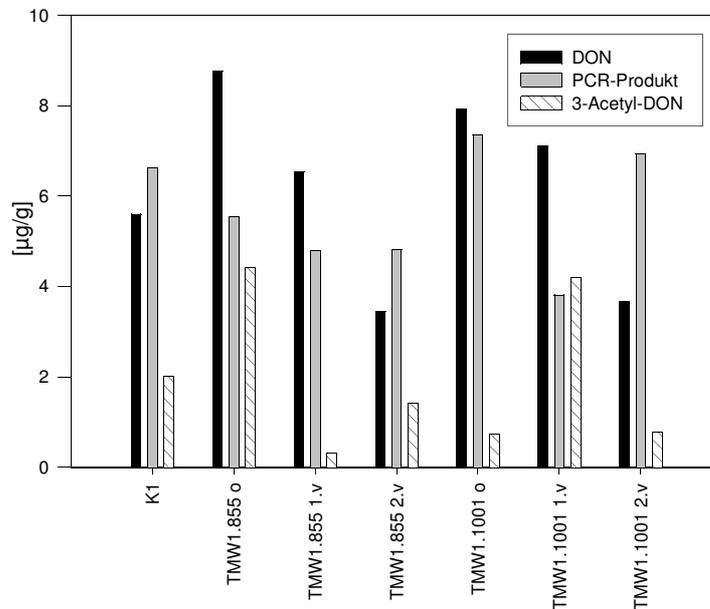


Abbildung 35 Vergleich der Menge an amplifizierter DNA (Opt18-Primer) von *Fusarium culmorum* mit den DON- und 3-Acetyl-DON-Gehalten mit antagonistischen Mikroorganismen behandelte Gerste-Mälzungen bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K1). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001, *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.855. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

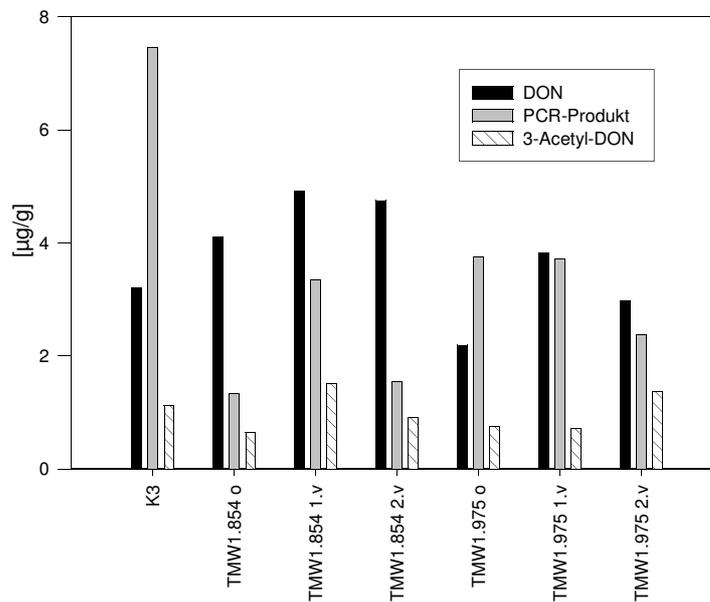


Abbildung 36 Vergleich der Menge an amplifizierter DNA (Opt18-Primer) von *Fusarium culmorum* mit den DON- und 3-Acetyl-DON-Gehalten mit antagonistischen Mikroorganismen behandelte Gerste-Mälzungen bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K3). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.854, *Lactobacillus reuteri* TMW1.975. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

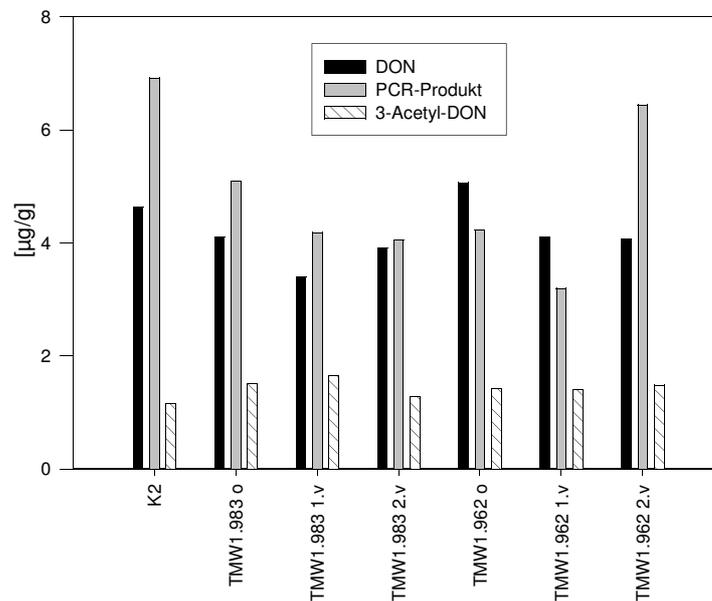


Abbildung 37 Vergleich der Menge an amplifizierter DNA (Opt18-Primer) von *Fusarium culmorum* mit den DON- und 3-Acetyl-DON-Gehalten mit antagonistischen Mikroorganismen behandelte Gerste-Mälzungen bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle (unbehandelte Mälzung K2). Zur Mälzung wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: *Weissella paramesenteroides* TMW1.983, *Lactobacillus salivarius* TMW1.962. Abk.: o=Nährlösung nach Entfernen der Zellen; 1.v=Nährlösung mit Zellen; 2.v=Das Weichwasser des Versuches 1.v wurde nochmals zur Mälzung eingesetzt

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Mälzungsversuche (siehe Abbildungen 35-37) konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Der Einsatz von Mikroorganismen zum Weichwasser bei der Mälzung beeinflusste das Wachstum und die Mykotoxinbildung von *Fusarium culmorum*. In fast allen Ansätzen war der Einfluß durch Zusatz von lebenden Mikroorganismen zum Weichwasser am stärksten. In einzelnen Fällen (*Lactobacillus reuteri* TMW1.975 und *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854) konnte ein Einfluß der zellfreien Nährlösung auf das Wachstum und die Mykotoxinbildung von *Fusarium culmorum* festgestellt werden.

### 3.12 Test auf Bakteriozinbildung durch Antagonisten

Aufgrund der beobachteten Hemmung von *Fusarium culmorum* durch die eingesetzten Milchsäurebakterien wurde ein Agar-Diffusions-Test (siehe 2.3.1) durchgeführt. Das Prinzip des Agar-Diffusions-Test beruht auf der Abgabe von Bakteriozinen in das Medium. Aus diesem Grund wurde der Kulturüberstand für diesen Test verwendet. Die Bakteriozine diffundieren in den Agar, und es kommt zur Ausbildung von Hemmhöfen.

Aus der Literatur und Arbeiten an unserem Lehrstuhl war von einigen Laktobazillen die Bildung von Bakteriozinen bekannt (Aymerich *et al.*, 2000; Remiger, 1998; Corsetti *et al.*, 1996). In den hier durchgeführten Versuchen konnten jedoch weder in den einzelnen Kulturen noch im Weichwasser oder Malz Bakteriozine nachgewiesen werden. Zur Untersuchung wurden hauptsächlich die Milchsäurebakterien aus den Mälzungsversuchen sowie die Stämme von *Stenotrophomonas maltophilia* herangezogen. Die untersuchten Organismen und die Ergebnisse sind in Tabelle 3.18 dargestellt.

Tabelle 3.18 Inhibition von *Bacillus subtilis* DSM347 als Indikatororganismus für die Bakteriozinbildung durch antagonistisch wirksame Mikroorganismen.

Mikroorganismen	Stammbezeichnung	Hemmung
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	TMW1.988	-
<i>Lactobacillus animalis</i>	TMW1.972	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.294	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.289	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.281	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW1.25	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LTH2354	-
<i>Lactobacillus pontis</i>	TMW1.1101	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	TMW1.975	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	TMW1.970	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	TMW1.55	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	LTH2584	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	TMW1.992	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	TMW1.962	-
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.855	-
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.854	-
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.726	-

Mikroorganismen	Stammbezeichnung	Hemmung
<i>Lactobacillus spec.</i>	TMW1.81	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TMW2.8	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TMW2.149	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LTH520	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM20336 <sup>T</sup>	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	TMW2.418	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DSM8573	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DSM50170 <sup>T</sup>	-
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	TMW1.101	-
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	TMW1.1001	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	TMW1.983	-

### 3.13 Untersuchungen zur Bildung von Konservierungsstoffen

Da in anderen Arbeiten von den Fähigkeiten von Milchsäurebakterien zur Bildung von Konservierungsstoffen (speziell Benzoesäure und deren Derivate) berichtet wurde, wurden die Malze auf Konservierungsstoffe wie in Kapitel 2.12 beschrieben mittels DC untersucht (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Gosselé, 1971). Von den letzten Mälzungen wurde auch das Weichwasser nach abgeschlossener Mälzung auf Konservierungsstoffe untersucht. Als Standards wurden Benzoesäure, pHB-Ester und Sorbinsäure verwendet.

Im Weichwasser sowie in den einzelnen Malzen konnten keine der oben genannten Konservierungsstoffe gefunden werden.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, natürlich vorkommende Mikroorganismen zu finden, welche hemmende Eigenschaften auf das Wachstum und die Deoxynivalenolbildung von Fusarien haben. Dabei sollten die in der Einleitung erwähnten Thesen zur natürlichen Biokontrolle von Fusarien überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden erste *in vitro* Versuche auf mögliche antagonistisch wirksame Keime durchgeführt. Diese Ergebnisse sollten auf ein *in vivo* Testsystem übertragen werden. Mangels geeigneter Agrarflächen für Feldversuche wurde deshalb als praxisnahes Modell die Mälzung von Gerste und Weizen gewählt. Die Mälzung wurde gewählt, weil es sich hierbei um einen lebensmittelrelevanten Prozeß handelt, bei dem wie in der Einleitung erwähnt Fusarien und ihre Mykotoxine eine bedeutende Rolle innehaben.

Eine Schwierigkeit stellte das geeignete Versuchsmaterial für diese Testreihen dar. In künstlich mit Fusarien infiziertem Getreide wird das Korn hauptsächlich auf der Kornoberfläche infiziert. An diesen Stellen ist es für antagonistisch wirksame Mikroorganismen nicht schwierig, tätig zu werden. Aus analytischer Sicht ist die Isolierung von Fusarien-DNA von der Kornoberfläche ein weit geringeres Problem als die Isolierung aus dem Korninneren.

Um eine möglichst große Praxisnähe bei den Versuchen mit infiziertem Getreide zu erreichen, wurden Weizen und Gerste von der Bundesanstalt für Saatzucht/Resistenzgenetik, Grünbach bei Erding, bezogen. Dieses Versuchsmaterial wurde dort infiziert, indem Maisstoppeln (infiziert mit 20 Stämmen *Fusarium culmorum* mit unterschiedlich starker Virulenz) auf dem Feld ausgestreut und zusätzlich Fusarien-Sporen zur Zeit der Getreideblüte ausgebracht wurden. Das erhaltene Material war fast ausschließlich mit *Fusarium culmorum* besetzt (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 3.6) und besaß mit 8,85 µg/g Deoxynivalenol in Gerste und 16,02 µg/g Deoxynivalenol in Weizen sehr hohe Mykotoxinwerte, welche in dieser Höhe in Deutschland eher selten vorkommen. Um aus den jeweils 100 kg großen Chargen von Gerste und Weizen statistisch gesicherte Proben zu entnehmen, wurde ein Getreidestecher (Probenstecher nach Barth, 1 Meter lang) verwendet. Mit diesem wurde wiederholt in die Getreidesäcke eingestochen, immer einem bestimmten Muster folgend, bis die Getreidemenge für eine Mälzung mit sieben Ansätzen ausreichend war. Nach erneutem Durchmischen der Getreideprobe wurde diese in sieben Ansätze à 500 g aufgeteilt. Auf diese Weise gelang eine gleichmäßige Verteilung von Pilzmyzel und Mykotoxinbelastung, was wiederholte Untersuchungen zeigten (siehe Kapitel 3.9).

#### 4.1 *In vitro* Hemmung von Fusarien durch Bodenisolat

Aus den Boden- und Pflanzenproben eines Versuchsfeldes der Fa. Bayer AG in Dingolfing, wurden Mikroorganismen isoliert. Dabei konnten zwei Isolate gefunden und identifiziert werden die eine natürliche antagonistische Wirkung gegenüber Fusarien-Arten hatten. Beide Isolate zeigten *in vitro* eine deutliche Hemmwirkung auf das Wachstum von *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium tricinctum*. Die zusätzlich eingesetzten Isolate, welche bei Kerak, Jordanien, aus Bodenproben von dortigen Getreidefeldern isoliert wurden, zeigten ebenfalls deutliche Hemmwirkungen auf das Wachstum von *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium tricinctum*.

Gut sichtbare Ergebnisse des Einsatzes dieser Isolate auf Nährstoffplatten, welche mit Fusarien angeimpft wurden, waren das verringerte Wachstum des Myzels sowie das kränkliche, dürre und ausgedünnte Myzel an der dem antagonistisch wirksamen Isolat zugekehrten Seite der Pilzkolonie.

Die Isolate aus den Bodenproben wurden im Verlauf der Arbeit als *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418, *Paenibacillus polymyxa* Li2, *Brevibacillus laterosporus* Jord A, Jord C und Jord D und *Bacillus licheniformis* Jord B identifiziert und charakterisiert.

Die Untersuchungen zur beobachteten Hemmung lassen den Schluß zu, daß die Einschränkung des Fusarien-Wachstums auf Stoffwechselprodukte der eingesetzten Mikroorganismen zurückgeführt werden kann. Als Ursache für das reduzierte Pilzwachstum durch *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 und *Paenibacillus polymyxa* Li2 können der pH-Wert oder die Verstoffwechselung der Kohlenstoffquellen ausgeschlossen werden. *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 verschiebt den pH-Wert in den basischen Bereich bis zu einem Wert von 8, während *Paenibacillus polymyxa* Li2 den pH-Wert in den sauren Bereich von 4,4 verschiebt. Auf Nährmedien, die mit diesen pH-Werten angesetzt wurden und/oder ein vermindertes Kohlenstoffangebot aufwiesen (wurde mittels HPLC überprüft), konnte keine Hemmung des Wachstums von *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium equiseti* bzw. *Fusarium sporotrichioides* festgestellt werden, wenn die betreffenden Bakterien nicht anwesend waren.

## 4.2 Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Systeme

### 4.2.1 Test in einem *in planta* System

Bei dem Versuch, die Beobachtungen der Hemmtests auf Petrischalen durch *in planta* Experimente zu bestätigen, konnte keine Hemmung des Wachstums von Fusarien festgestellt werden. Es konnte sogar eine starke Verminderung der Keimfähigkeit der Geste, welche eine vorhergehende Samenbehandlung mit Antagonisten erfahren hatte, beobachtet werden. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Höflich und Kühn (1996), welche einen wachstumsfördernden Einfluß von *Stenotrophomonas maltophilia* auf verschiedene Pflanzenarten beschreiben. Die dort durchgeführten Untersuchungen zur Nährstoffaufnahme junger Rapspflanzen zeigten, daß insbesondere in den frühen Entwicklungsstadien der Pflanze auch unter Feldbedingungen sowohl das Wachstum von Sproß und Wurzeln als auch die Aufnahme von Stickstoff, Phosphor, Kalium und Magnesium gefördert wurden. Die Untersuchungen zu diesem Thema wurden wegen Mangels an geeigneten Inkubationsflächen, welche optimale Wachstumsbedingungen für Gerste bieten, im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt.

### 4.2.2 Durchführung von Mälzungsuntersuchungen an Weizen und Gerste

Um die zuvor erhaltenen Ergebnisse in einem Versuchsmodell mit möglichst praxisnahem Bezug umzusetzen, wurde für weitere Untersuchungen die Mälzung von Getreide gewählt. Da während dieser Keimung von Weizen und Gerste in der Praxis der Malz- und Bierbereitung Fusarien große Probleme bereiten, wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde versucht, hier antagonistisch wirksame Mikroorganismen einzusetzen. Dabei wurden zunächst die antagonistisch wirksamen Mikroorganismen aus den *in vitro* Versuchen getestet.

Die *in vitro* beobachteten Ergebnisse konnten im Mälzungsmodell nicht beobachtet werden. Mit den Organismen *Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 und *Paenibacillus polymyxa* Li2 konnten zwar in den Hemmtests auf Petrischalen sehr gute Hemmungen erzielt werden. Bei dem Versuch, diese Hemmung auf die Mälzung zu übertragen, ließ sich jedoch keine Reduzierung der Biomasse von *Fusarium culmorum* erreichen. Die Ursachen für diese Ergebnisse sind sicherlich in den Bedingungen während der Mälzung zu suchen. So wird das feldinfizierte Getreide mit seiner natürlichen Wildflora zur Mälzung eingesetzt, wodurch die zugesetzten Organismen Schwierigkeiten haben, sich in diesem Habitat durchzusetzen. *Paenibacillus polymyxa* Li2 beginnt bei

hohem Sauerstoffpartialdruck mit der Sporulation und kann nach der Mälzung unter geeigneten Bedingungen wieder isoliert werden. Durch die schnelle Sporulation stellt dieser Organismus seinen Stoffwechsel ein und bildet keine hemmenden Substanzen in ausreichender Konzentration. Im Gegensatz zur Petrischale ist die Keimkonzentration bei der Mälzung wesentlich geringer. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, daß der Zusatz von fungiziden oder fungistatischen Substanzen in einer subletalen Konzentration auf das Pilzwachstum und die Bildung von Mykotoxinen anregend wirkt (D'Mello und Macdonald, 1997).

*Stenotrophomonas maltophilia* TMW2.418 war nach der Mälzung nicht mehr aus dem Weichwasser zu isolieren. Auch hier scheinen die natürlich auf Getreide vorkommenden Mikroorganismen sowie der sinkende pH-Wert bei der Mälzung, das Wachstum von *S. maltophilia* TMW2.418 zu hemmen.

Zu weitergehenden Untersuchungen wurden die Ergebnisse anderer Forschergruppen, die wiederholt fungizide Wirkungen im Zusammenhang mit Milchsäurebakterien und Hefen beobachteten, zum Anlaß genommen, die lehrstuhleigene Sammlung von Milchsäurebakterien und Hefen zu weiteren Testreihen heranzuziehen.

Für *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 wurden bereits hemmende Wirkungen gegen Pilze wie *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monilia* in der Literatur beschrieben (Corsetti *et al.*, 1998). Der Organismus stammt aus einer Sauerteigfermentation und ist in der Lage, eine ganze Reihe von organischen Säuren zu synthetisieren. Andere Laktobazillen wie *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 binden Aflatoxin B<sub>1</sub> und führen auf diese Weise zu einer Detoxifizierung von kontaminiertem Material (El-Nezami *et al.*, 1998). Milchsäurebakterien-Isolate von Früchten und Gemüse hemmen das Wachstum von *Penicillium* spp. und verhindern die Bildung der Mykotoxine Patulin und Citrinin (Gourama, 1997). Die Stoffwechselprodukte der Milchsäurebakterien sowie die dadurch bedingte pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich werden als Ursache der antagonistischen Aktivitäten von Milchsäurebakterien diskutiert (Lindgren und Dobrogosz, 1990).

Im Zusammenhang mit *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* und *Saccharomyces cerevisiae* konnten Hemmungen von Pilzen, die in der Getreidelagerung vorkommen (*Penicillium roqueforti*, *Aspergillus candidus*), beobachtet werden (Petersson und Schnürer, 1995; Björnberg und Schnürer, 1993). Auch aus Entenkröpfen konnte eine Vielzahl von Milchsäurebakterien isoliert und identifiziert werden (Kurzak *et al.*, 1998). Einige dieser Isolate (*Lactobacillus animalis* TMW1.972 und *Lactobacillus salivarius* TMW1.992) zeigten hemmende Wirkungen gegenüber *Salmonella* spp. (Kurzak, 2000). Da diese Beobachtungen sehr vielversprechend schienen und aufgrund der Stoffwechseleigenschaften dieser „Entenkropf-Isolate“, wurden einige dieser Milch-

säurebakterien zur Mälzung eingesetzt.

### 4.2.3 Auswertung der Mälzungsversuche

#### 4.2.3.1 Methodendiskussion

Die Ermittlung der Biomasse von *Fusarium culmorum* im Malz erwies sich als unerwartet schwierig. Nach der Mälzung wurden Proben zur Bestimmung der Fusarien-Keimzahl entnommen. Dazu sollten im Grünmalz selektive Medien verwendet werden (Böhm-Schraml *et al.*, 1993; Bragulat *et al.*, 1995). Das Probenmaterial wurde gemäß Kapitel 2.8.2 aufgearbeitet und inkubiert. Bei der Auswertung konnte festgestellt werden, daß in den ersten Verdünnungsstufen in denen keine Malzpartikel mehr vorhanden waren, kein *Fusarium culmorum* mehr nachgewiesen werden konnte. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß *Fusarium culmorum* fest an den Malzpartikeln haftete und somit in weiteren Verdünnungsstufen nicht mehr nachweisbar war. Nach der Trocknung des Malzes konnten keine Lebendkeime von *Fusarium culmorum* auf Mannit-Malachitgrün-Agar nachgewiesen werden. Mit der Erkenntnis, daß diese Methode zur Bestimmung der Keimzahlen von Fusarien im Malz bei dieser Versuchsanordnung nicht geeignet war, mußte eine neue Methode entwickelt werden.

Zu diesem Zweck wurde auf ein am Lehrstuhl vorhandenes Verfahren zur Bestimmung von Trichothecen-bildenden *Fusarium* spp. zurückgegriffen. Diese Methode basiert auf einem Nachweis des *tri5*-Gens mittels PCR. Da auch *F. culmorum* dieses Gen besitzt, konnte dieses Verfahren zum Nachweis von *F. culmorum* eingesetzt werden.

Wie in der Einleitung erwähnt ist die Biosynthese der Trichothecene in cluster von Genen, welche für Enzyme und Proteine kodieren, die an der Bildung der Mykotoxine beteiligt sind, aufgeteilt. *Tri5* (= *Tox5*) ist das erste Gen in der Biosynthese aller Trichothecene. Es kodiert für die Trichodien-Synthase, ein Enzym, welches die Ringbildung von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien katalysiert (siehe Abbildung 1). Die Nukleotidsequenz von *tri5* wurde charakterisiert in *Fusarium sporotrichioides* (Hohn und Beremand, 1989), *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) (Hohn und Desjardins, 1992), *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (Proctor *et al.*, 1995), *Fusarium poae* (Fekete *et al.*, 1995) und in *Myrothecium roridum* (Trapp *et al.*, 1995).

Vom *tri5*-Gen ausgehend wurden die PCR-Primer Tox5-1 (vorwärts) und Tox5-2 (rückwärts) abgeleitet (siehe Kapitel 2.9.6). Die Basenpaarlänge des PCR-Produktes beträgt 658 bp (Niessen und Vogel, 1998).

Mittels Tox5-PCR konnte die vorhandene DNA aller in der Probe vorkommenden Trichothecen-bildenden Pilze nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung des erhaltenen PCR-Produktes wurde eine fluoreszenzoptische Methode eingesetzt (siehe Kapitel 2.11). Verwendet wurde der Fluores-

zenzfarbstoff PicoGreen® (Molecular Probes, Eugene, USA). Dieser Farbstoff reagiert nur mit doppelsträngiger DNA und besitzt eine Empfindlichkeit, die es erlaubt, DNA bis zu einer Konzentration von 25 pg/mL zu detektieren. Das Verhältnis von Fluoreszenzemission und Konzentration ist bei PicoGreen® über einen Bereich von 25 pg/mL – 1000 ng/mL linear (siehe Abbildung 17). Weiterhin wird die Fluoreszenz nicht durch einzelsträngige DNA, RNA, Proteine oder andere bei der Aufarbeitung der DNA eingebrachte Verunreinigungen beeinflusst. Da es sich bei gemahlenem Malz um eine sehr komplexe Ausgangsmatrix mit vielen Störsubstanzen für die PCR und die anschließende DNA-Quantifizierung handelt, ist dieser Farbstoff aufgrund seiner zuvor erläuterten Unempfindlichkeit gut geeignet, um Messungen in diesem Testsystem durchzuführen. Im Vorfeld der PCR mußten bestehende Methoden noch hinsichtlich einer quantitativen Auswertung der Biomasse von *Fusarium culmorum* verändert werden. Dabei wurde von einer Methode ausgegangen, bei der die Fusarien-DNA mittels Ultraschallbehandlung aus ungemahlenden Proben von der Kornoberfläche erfolgte (Mulfinger *et al.*, 2000). Bei dem Versuch, mittels dieser Methode zu wiederholbaren quantitativen Ergebnissen zu gelangen, wurde schnell klar, daß diese Methode in dieser Form für die hier durchzuführenden Arbeiten nicht geeignet war. Dies erklärt sich durch die Infektionswege der Fusarien auf dem Getreide. In den seltensten Fällen besiedeln Fusarien nur die Oberfläche der Getreidekörner. Die Infektion erfolgt meist schon in der Keimphase des Getreides durch Sporen, die sich auf den Saatkörnern oder im Boden befinden. Bei Arten mit Hauptfruchtform wie *Fusarium graminearum* bildet die Verbreitung von Ascosporen mit dem Wind im Frühjahr einen der Hauptinfektionswege. Haben Fusarien den Keimling besiedelt, wachsen sie mit dem Keimling und können so während des Ährenschiebens die Ährenanlage des Getreides befallen (Thalman, 1983). Neben dem Rückgang der Kornzahl pro Ähre führt dies dazu, daß Fusarien sich im Korninneren befinden und dort Stärkekörnchen, Speicherproteine und Zellwände zerstören (Bechtel *et al.*, 1985; Snijders und Perkowski, 1990). Mit der Isolierung des Fusarienmyzels nur von der Kornoberfläche erfaßt man daher lediglich den kleineren Anteil der Fusarien-DNA, während der deutlich größere Anteil des Fusarienmyzels im Innenbereich des Korns unberücksichtigt bleibt. Durch das Mahlen des Probenmaterials konnte eine deutlich erhöhte Ausbeute an *Fusarium*-DNA erreicht und einer reproduzierbaren quantitativen Analytik zugänglich gemacht werden. Nicht zuletzt war es in der vorliegenden Arbeit für eine ausreichende statistische Zuverlässigkeit der Ergebnisse wichtig, die Versuchscharge zu mahlen und daraus die Proben zu entnehmen (Liske *et al.*, 2000).

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß die Tox5-PCR geeignet war, die Pilz-Biomasse im Weizenmalz reproduzierbar zu erfassen. Im Vergleich zur PCR mit Opt18-Primern zeigte die Tox5-PCR zwar eine geringere Empfindlichkeit; der Trend der Ergebnisse der Tox5-PCR wurde jedoch mit

der Opt18-PCR bestätigt. Im Gerstenmalz dagegen konnten mit Tox5-Primern keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, sondern nur mit Opt18-Primern. Dies liegt unter anderem an der Zusammensetzung des Gerstenmalzes. In Gerste sind ca. 0,1-0,3 % phenolische Substanzen vorhanden (Narziss, 1976). Diese Substanzen, vor allem Polyphenole, stören die PCR-Reaktion empfindlich. Hinzu kommt, daß die Tox5-Primer sehr anfällig auf Störsubstanzen reagieren. Das Design der Primer wurde für die gesamte Trichothecen-bildende Gruppe der Fusarien entwickelt. Bei der Amplifikation der DNA ist der Temperaturbereich für die spezifische Anbindung der Primer sehr begrenzt. So gibt es nicht sehr viele Möglichkeiten, die Störung der PCR durch die zuvor genannten Faktoren durch Variation der Amplifikationstemperatur zu umgehen.

#### **4.2.3.2 Korrelation zwischen gravimetrisch bestimmter Biomasse von *Fusarium culmorum* und dem PCR-Produkt von *Fusarium culmorum*-DNA**

Die Ermittlung der Biomasse von *Fusarium culmorum* in einer komplexen Matrix wie dem Malz stellt den Analytiker vor eine schwierige Aufgabe. Die klassische Methode der gravimetrischen Bestimmung der Menge an Myzel kann wegen der Malzbestandteile nicht angewandt werden, zumal andere Pilzarten ebenfalls im Malz vorhanden sind. Das Verfahren, anhand des gaschromatographisch bestimmten Ergosterol-Gehaltes die Myzelmasse von *Fusarium culmorum* zu berechnen, ist ebenfalls nur auf Reinkulturen anwendbar. Daher bietet sich die PCR mit artspezifischen Primern zur Bestimmung der Pilz-Biomasse an. Mit Hilfe dieser Primer ist es möglich, die DNA des Zielpilzes auch in einer komplexen Matrix zu identifizieren und zu quantifizieren. Daß die Tox5-PCR grundsätzlich geeignet ist, die Biomasse von Pilzen zu erfassen, kann man den Versuchsergebnissen in Kapitel 3.8.3 entnehmen. Trägt man die gravimetrisch bestimmten Werte der Biomasse von *F. culmorum* aus einer Reinkultur gegen die mittels PCR amplifizierte DNA-Mengen auf, so erhält man eine Gerade. Dies gilt nur für den linearen Bereich beider Kurven (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Auf diese Weise kann das PCR-Signal, welches aus Malzproben gewonnen wird, mit der Biomasse von *F. culmorum* korreliert werden. Wird die PCR in einem Lightcycler durchgeführt, kann die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge berechnet werden. Hieraus kann unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Gewichts des haploiden Genoms einer Pilzzelle ( $5,5 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ ) auf die Biomasse des Testpilzes geschlossen werden (Xu *et al.*, 1995).

#### 4.2.3.3 Bewertung und Diskussion der Ergebnisse

Bei den Mälzungen mit Laktobazillen war in vielen Fällen eine Verminderung des Wachstums von *Fusarium culmorum* festzustellen. Bei den ersten Mälzungen von Weizen wurden alle Mikroorganismen eingesetzt, die entweder in der Literatur oder bei lehrstuhleigenen Versuchen auffällige Stoffwechseleigenschaften zeigten. In Abbildung 34 (Seite 91) sind die Ergebnisse dieser Vorversuche zusammengefaßt. Dabei konnte festgestellt werden, daß einige Mikroorganismen im Gegensatz zu *in vitro* Testsystemen bei der Mälzung keine deutliche Wachstumshemmung im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen verursachten. Um eine optimale Trocknung des Malzes zu erzielen, wurden verschiedene Temperaturen und Darr-Zeiten getestet. Bei diesen Untersuchungen kam es zu hohen Schwankungen der Mykotoxingehalte im Malz, hervorgerufen durch unterschiedliche Behandlungen des Malzes während der Trocknung. Die Ergebnisse der Bestimmung der Biomasse zeigten deutlich geringere Schwankungen. Die Testergebnisse reichten nicht aus, um eine quantitative Aussage über die Biomasse oder den Mykotoxingehalt zu treffen. Sie zeigten aber deutlich die Trends, die für weitere Arbeiten in diese Richtung wichtig sind. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine weitergehende Charaktisierung der Isolate *Brevibacillus laterosporus* Jord A, Jord C und Jord D und *Bacillus licheniformis* Jord B verzichtet. Die Mikroorganismen, die in den o. g. Tests deutliche Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigten, wurden für weitere Mälzungen mit Gerste verwendet (siehe Tabelle 3.14). Wie in Abbildung 25 (Seite 82) zu erkennen ist, wurden die Trends, die sich bei der Mälzung mit Weizen zeigten, bei der Mälzung von Gerste mit diesen Mikroorganismen bestätigt.

Um genauere Aussagen über die Ursachen der festgestellten Hemmung des Wachstums von *F. culmorum* treffen zu können, wurde für weiterführende Mälzungen die Vorgehensweise bei der Mälzung modifiziert. Die Nährlösungen, in denen die Mikroorganismen vorbebrütet wurden, wurden nach der Inkubation geteilt und in einer Hälfte der Nährlösungen die Zellen geerntet. Diese zellfreie Nährlösung (im weiteren Verlauf der Arbeit und in den Tabellen und Abbildungen als „0“ bezeichnet) wurde parallel zur Nährlösung mit Zellen (im weiteren Verlauf der Arbeit und in den Tabellen und Abbildungen als „1. v“ bezeichnet) zur Mälzung eingesetzt. Nach abgeschlossener Naßweiche wurde das Weichwasser aus dem Test „1.v“ für eine weitere Mälzung eingesetzt (im weiteren Verlauf der Arbeit und in den Tabellen und Abbildungen als „2. v“ bezeichnet). In den ersten beiden Tagen der Naßweiche sind die Zellen der eingesetzten Milchsäurebakterien stoffwechselaktiv; erst im Laufe der 2. Mälzung mit diesem Weichwasser sind die Milchsäurebakterien aufgrund der niedrigen Temperatur und des hohen Sauerstoffpartialdrucks nicht mehr lebensfähig, wie Kulturvorversuche zeigten. Mikroskopische Untersuchungen des Weichwassers

deuteten darauf hin, daß es zur Lyse der Zellen kommt.

Ziel dieser Versuchsanordnung war es:

1. Rückschlüsse auf vorhandene extrazelluläre Substanzen ziehen zu können,
2. den Einfluß von lebenden Zellen auf das Wachstum von *F. culmorum* erkennen zu können.

Als Folge einer Behandlung mit einer zellfreien Nährlösung, in der zuvor *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.855 inkubiert wurde, ist der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse in Abbildung 35 (Seite 92) eine deutliche Erhöhung des DON- und 3-Acetyl-DON-Gehaltes zu entnehmen. Das Wachstum von *Fusarium culmorum* wird im Gegensatz zur mitgeführten Kontrolle leicht gehemmt. Bei den Mälzungen mit der Nährlösung mit Zellen wird das Wachstum im Gegensatz zur Mälzung mit zellfreier Nährlösung erneut leicht vermindert. Der Mykotoxingehalt des Malzes sinkt gegenüber der Behandlung mit zellfreier Nährlösung. Beim Einsatz des Weichwassers zu einer weiteren Mälzung sinkt der Mykotoxingehalt unter den Gehalt an DON bzw. 3-Acetyl-DON in der mitgeführten Kontrolle.

Als Erklärung für diese Testergebnisse spielt das Vorhandensein einer extrazellulären Substanz eine wichtige Rolle. Der Einsatz lebender Zellen von *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.855 vermindert den DON-Gehalt und die Biomasse von *Fusarium culmorum* noch weiter. Hier scheint ein Zusammenwirken von Zellen und extrazellulärer Substanz stattzufinden, welches sich durch die Lyse der Zellen im Ansatz „2.v“ nochmals verstärkt.

Der Einsatz der zellfreien Nährlösung, in der zuvor *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001 inkubiert wurde, verstärkt das Wachstum und die Bildung von DON bei *Fusarium culmorum* während der Mälzung. Bei der Mälzung mit einer Nährlösung, die Zellen von *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001 enthält, ist eine deutliche Hemmung des Wachstums von *Fusarium culmorum* zu erkennen. Der Gehalt an DON bleibt gegenüber der Malzbehandlung ohne Zellen nahezu unverändert. Bei 3-Acetyl-DON dagegen ist ein deutlicher Anstieg im Gehalt festzustellen. Bei der 2. Mälzung mit diesem Weichwasser sinkt der Mykotoxingehalt, und ein verstärktes Wachstum von *Fusarium culmorum* findet statt.

Bei der Behandlung mit *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001 wird durch die Zugabe von zellfreier Nährlösung das Wachstum und die DON-Bildung von *F. culmorum* gefördert, während der Gehalt an 3-Acetyl-DON sinkt. Erst durch Zugabe von lebenden Zellen von *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001 findet eine deutliche Hemmung des Wachstums von *F. culmorum* statt. Dieser Effekt wird nach Lyse der Zellen von *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001 wieder aufgehoben.

Die in Abbildung 36 (Seite 93) dargestellten Versuchsergebnisse lassen folgendes erkennen: vergleicht man die Ergebnisse einer Behandlung mit *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854 mit der mitgeführten Kontrolle, so stellt man eine deutliche Verringerung der Biomasse von *F. culmorum* fest. Die deutlichste Hemmung wird dabei durch die Nährlösung nach Entfernen der Zellen erreicht. Gleichzeitig ist ein leichter Anstieg des DON-Gehaltes zu sehen. Bei Anwesenheit der Zellen in der Nährlösung, welche dem Weichwasser zugesetzt wird, ist ebenfalls eine deutliche Verminderung der Biomasse von *F. culmorum* zu beobachten. Die Hemmung fällt jedoch gegenüber der zellfreien Nährlösung deutlich geringer aus. Auch hier ist wieder ein Anstieg von Deoxynivalenol festzustellen, gemeinsam mit einer leichten Zunahme des 3-Acetyl-DON-Gehaltes. Wird das gleiche Weichwasser für eine zweite Mälzung eingesetzt, verringert sich die Biomasse von *F. culmorum* wiederum, der Gehalt an DON und 3-Acetyl-DON bleibt nahezu gleich. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß es sich auch in diesen Fall bei der hemmenden Substanz um eine extrazelluläre Verbindung handelt. Die Substanz wird von *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854 während der Anzucht gebildet und in das Nährmedium abgegeben. Die Versuche aus den Ansätzen „0“ und „2.v“ stimmen in dieser Aussage überein. In beiden Mälzungen sind keine Lebendkeime von *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854 mehr vorhanden. Die verminderte Hemmung im Ansatz „1.v“ kann durch eine Bindung der extrazellulären Substanz an die Lebendkeime erklärt werden. In allen Versuchsansätzen wird eine verstärkte Mykotoxinproduktion angeregt.

Bei den Versuchen mit *Lactobacillus reuteri* TMW1.975 ist im Ansatz mit zellfreier Nährlösung eine Verminderung der Biomasse um ca. 50 % zu beobachten. Im Gegensatz zu den Versuchen mit *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854 ist hier eine deutliche Verringerung der Konzentration an DON zu sehen.

Durch den Einsatz von Lebendkeimen von *Lactobacillus reuteri* TMW1.975 zur Mälzung ist keine weitere Verminderung der Biomasse von *F. culmorum* zu erreichen. Bei Anwesenheit von Lebendkeimen im Weichwasser kommt es zu einem Anstieg der Mykotoxinproduktion. Dagegen wird im Ansatz „2. v“ das Wachstum von *F. culmorum* leicht gehemmt, und der Mykotoxingehalt sinkt auf das Niveau der Kontrolle.

Diese Beobachtungen können durch das Zusammenwirken einer extrazellulären Substanz und vorhandener Lebendkeime erklärt werden. In Anwesenheit einer extrazellulären Substanz wird das Wachstum von *F. culmorum* stark vermindert. Kommen lebende Zellen von *Lactobacillus reuteri* TMW1.975 hinzu, steigt der Gehalt an DON an. Dieser Effekt könnte auf Zellwand-assoziierte Substanzen zurückzuführen sein. Wird das Weichwasser aus Ansatz „1.v“ zu einer 2. Mälzung verwendet, ist eine weitere Hemmung von *F. culmorum* festzustellen. Die einzige Verände-

nung in diesem Ansatz gegenüber dem Ansatz „1.v“ liegt in der nicht mehr vorhandenen Stoffwechselaktivität von *Lactobacillus reuteri* TMW1.975. Die Zellen befinden sich in der Lyse und setzen die zelleigenen Enzyme frei.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse der Malzbehandlung mit *Weissella paramesenteroides* TMW1.983 (Abbildung 37, Seite 94) ist in allen 3 Ansätzen (mit und ohne Zellen) eine Verminderung des Wachstums von *Fusarium culmorum* festzustellen. Der Gehalt an DON und 3-Acetyl-DON bleibt gegenüber der unbehandelten Kontrolle ohne nennenswerte Änderungen.

Auch diese Versuchsergebnisse deuten auf das Vorhandensein einer extrazellulären Substanz hin, welche von den Zellen im Ansatz „1.v“ weiterhin produziert wird. Das Vorhandensein dieser Substanz im Ansatz „2.v“ weist auf eine stabile Verbindung hin.

Bei der Zugabe der zellfreien Nährlösung von *Lactobacillus salivarius* TMW1.962 zur Mälzung wird das Wachstum von *Fusarium culmorum* ebenfalls deutlich gehemmt. Durch den Einsatz der Nährlösung mit Zellen von *Lactobacillus salivarius* TMW1.962 zur Mälzung kann das Wachstum von *Fusarium culmorum* noch stärker gehemmt werden. Der Einsatz des Weichwassers zu einer weiteren Mälzung übt keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum von *Fusarium culmorum* aus. Das Wachstum des Pilzes erreicht wieder den Wert der mitgeführten Kontrolle. Der Gehalt an DON und 3-Acetyl-DON bleibt in allen 3 Ansätzen etwa auf dem gleichen Level.

Die Ergebnisse der Behandlung von Gerste mit *Lactobacillus salivarius* TMW1.962 lassen ebenfalls auf das Vorhandensein einer extrazellulären Substanz schließen. In der Nährlösung ohne Zellen wird diese Substanz nur während der Inkubation mit den Laktobazillen in das Nährmedium abgegeben. Beim Einsatz der Nährlösung mit Zellen, welche anfangs noch einen aktiven Stoffwechsel besitzen, wird diese Substanz weiterhin gebildet und gelangt in das Weichwasser. Bei einer weiteren Mälzung in diesem Weichwasser sind alle eingebrachten Zellen nicht mehr lebensfähig – die Substanz wird nicht mehr gebildet. Auffällig ist, daß nach dem möglichen Abbau oder Verbrauch der extrazellulären Substanz Wachstum und Mykotoxinbildung das Niveau der unbehandelten Kontrolle erreichen.

Dabei ist deutlich zu sehen, daß ungehemmtes Wachstum sowie unbeeinflusste Mykotoxinbildung innerhalb des Systems einer Mälzung nur geringen Schwankungen unterliegen.

### 4.3 Mögliche Hemmechanismen bei der Mälzung von Getreide unter Einsatz von Mikroorganismen

Da in diesem Testsystem der Mälzung viele unbekannte Einflüsse (z.B. Wildflora des Getreides, Enzymaktivität beim Auskeimen des Getreidekorns) eine Auswirkung auf das Wachstum und die Mykotoxinproduktion von *F. culmorum* haben können, sind die Ergebnisse in erster Linie empirischer Natur. Das Testsystem konnte jedoch nicht vereinfacht werden, da ein wichtiger Punkt dieser Untersuchungen der Einsatz von praxisnah feldinfiziertem Getreide war. In vielen vorhergehenden Untersuchungen wurde *in vitro* künstlich infiziertes Testmaterial verwendet, bei dem lediglich die Kornoberfläche des Getreides mit Fusarien besiedelt war. Diese Art der Besiedelung von Getreide entspricht nicht der Situation, wie sie beim Mälzen natürlich infizierten Getreides vorliegt.

Aufgrund der Komplexität dieses Testsystems können zu den genauen Hemmechanismen keine Aussagen getroffen werden. Das gewählte Testsystem ist in erster Linie geeignet, Aussagen über Veränderungen nach Behandlung mit Testkeimen zu treffen. Durch die zuvor genannten Testvariationen kann auf das Vorhandensein extrazellulärer Substanzen geschlossen werden, die aber nicht direkt an der Hemmung des Pilzes beteiligt sein müssen. Diese Substanzen können Ausgangspunkt für weitere Reaktionen mit anderen im Weichwasser enthaltenen Substanzen sein oder die Bildung von Abwehrstoffen in Organismen der natürlichen Getreideflora induzieren. Das heißt, daß nicht zwischen einer direkten oder indirekten Beeinflussung des Wachstums von Fusarien unterschieden werden kann. Diese Substanzen können auch direkt fungizid oder fungistatisch wirken.

Die Schwankungen der DON- und 3-Acetyl-DON-Gehalte sind in diesen Testreihen nicht abhängig von der Biomasse von *F. culmorum*. Dies kann verschiedene Ursachen besitzen. So wurde z.B. beobachtet, daß probiotische Bakterien Trichothecene an ihre Zelloberfläche binden können (Chrevatidis *et al.*, 2001). Dies führt zu einer Verminderung des Mykotoxingehaltes bei gleichbleibender Biomasse.

Das Vorhandensein fungizider oder fungistatischer Substanzen kann bei Fusarien zu einer Hemmung des Wachstums bei gleichzeitig verstärkter Mykotoxinproduktion führen (D'Mello und Macdonald, 1997).

### 4.3.1 Mögliche Hemmechanismen bei Milchsäurebakterien

Verschiedene Milchsäurebakterien zeigten eine deutliche Hemmung des Wachstums von *Fusarium culmorum* während des Mälzungsprozesses. Aufgrund der komplexen Versuchsbedingungen bei der Mälzung (das Getreide ist nicht steril und enthält zahlreiche nicht kontrollierbare Getreideorganismen, welche sich während der Mälzung ebenfalls vermehren) ist es schwer, die Hemmwirkung auf das Wachstum von *Fusarium culmorum* auf einzelne Faktoren zu begrenzen. Deshalb wurde ein Versuchsmodell entwickelt (siehe Kapitel 4.2.3.3), welches einen indirekten Hinweis auf die Ursachen der Hemmwirkung gab.

Für die Hemmung des Wachstums von *Fusarium culmorum* kommen verschiedene Ursachen in Frage:

Verschiedentlich wurde beobachtet, daß Pflanzen in Anwesenheit bestimmter Substanzen, welche in der Lage sind, Stoffwechselwege der Pflanzen zu beeinflussen, Verbindungen mit fungizider oder fungistatischer Wirkung synthetisieren können (Hammerschmidt und Kuc, 1995). In vielen Pflanzen werden immer häufiger Verbindungen gefunden, die bei einer bestimmten Keimdichte von phytopathogenen Pilzen aktiv als Schutz vor diesen Mikroorganismen gebildet werden. Ein Beispiel für eine solche Verbindung stellt das Osmotin in Tabakpflanzen dar (Abad *et al.*, 1996). Der bei einigen der oben besprochenen Versuche beobachtete Anstieg von DON und 3-Acetyl-DON wurde auch bei Experimenten mit Fungiziden wiederholt festgestellt. Der Zusatz von Fungiziden in subletaler Dosis führte bei Fusarien zu einer deutlich verstärkten Mykotoxinproduktion, die oftmals um ein Fünffaches höher lag als in den unbehandelten Kontrollen (D'Mello und Macdonald, 1997; D'Mello *et al.*, 1998). Dieser Zusammenhang erklärt möglicherweise die Ergebnisse der Versuche mit *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.855, bei denen es zu einer stark erhöhten Produktion von DON und 3-Acetyl-DON kam. Der gleiche Effekt trat beim Einsatz von *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001 auf. Auch hier wurde die Synthese von DON und 3-Acetyl-DON sehr stark erhöht. In beiden Fällen muß demnach eine Substanz vorliegen, deren Konzentration ausreicht, um Einfluß auf den Stoffwechselweg von *Fusarium culmorum* zu nehmen. In Experimenten von D'Mello wurde bei einem starken Anstieg von 3-Acetyl-DON eine verstärkte Produktion von Esterasen durch Fusarien festgestellt (D'Mello *et al.*, 1998). Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle im Biosyntheseweg der Trichothecene.

### 4.3.1.1 Bildung von Benzoesäure und niedermolekularen Verbindungen durch Milchsäurebakterien

Schon seit längerem ist die Bildung von niedermolekularen Verbindungen – bei denen es sich nicht um Proteine handelt – durch Milchsäurebakterien bekannt (Lonvaud-Funel und Joyeux, 1993; Gourama und Bullerman, 1995). Bei eingehenden Untersuchungen an der VTT (Technical Research Centre of Finland) konnten einige niedermolekulare Verbindungen als Benzoesäure, Methylhydantoin, Mevalonolactone und Milchsäure identifiziert werden (Niku-Paavole *et al.*, 1999).

Bei *Lactobacillus plantarum* wurde die Bildung von Benzaldehyd aus Phenylalanin mittels Aminotransferase beschrieben (Groot und Bont, 1998). Dabei erfolgt der Syntheseweg über Zimtsäure.

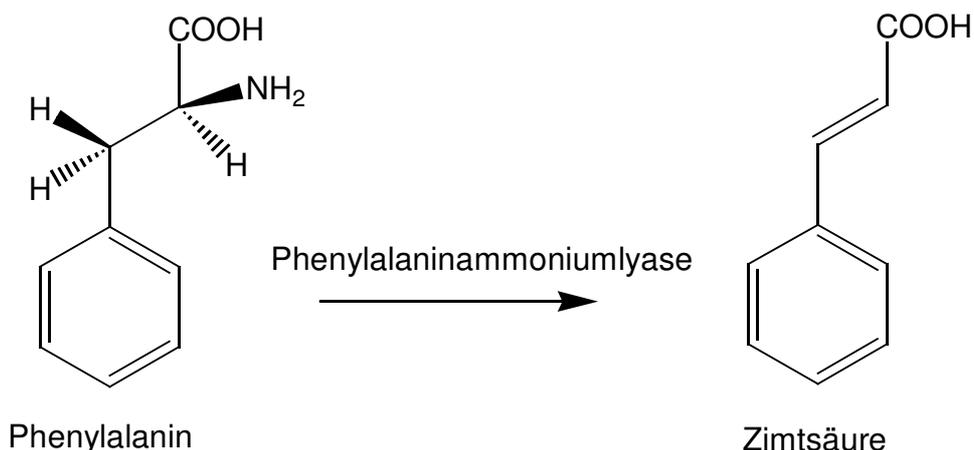


Abbildung 38 Enzymatisch katalysierte Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure durch das Enzym Phenylalaninammoniumlyase

Dihydrozimtsäure ist der wichtigste Precursor von Benzoesäure und deren Derivaten in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen. Von Dihydrozimtsäure ausgehend können mittels Enzymen Benzylalkohol-Derivate, Benzaldehyd-Derivate und Benzoesäure-Derivate gebildet werden (Luckner, 1990).

Die Wirkung von Benzoesäure richtet sich hauptsächlich gegen Hefen und Schimmelpilze einschließlich Aflatoxinbildnern (Uraih und Chipley, 1976; Uraih *et al.*, 1977). Bakterien werden nur teilweise gehemmt. Wenig wirksam ist Benzoesäure gegen Milchsäurebakterien und Clostridien. Dabei beruht die spezielle antimikrobielle Wirksamkeit der Benzoesäure neben der Absenkung des intrazellulären pH-Wertes auf diversen Eingriffen in das Enzymgefüge der Mikroorganismen-Zelle. So werden z.B. bei manchen Bakterien und Hefen Enzyme gehemmt, die den Essigsäure-

stoffwechsel und die oxidative Phosphorylierung regeln (Bosund, 1960 und 1962).

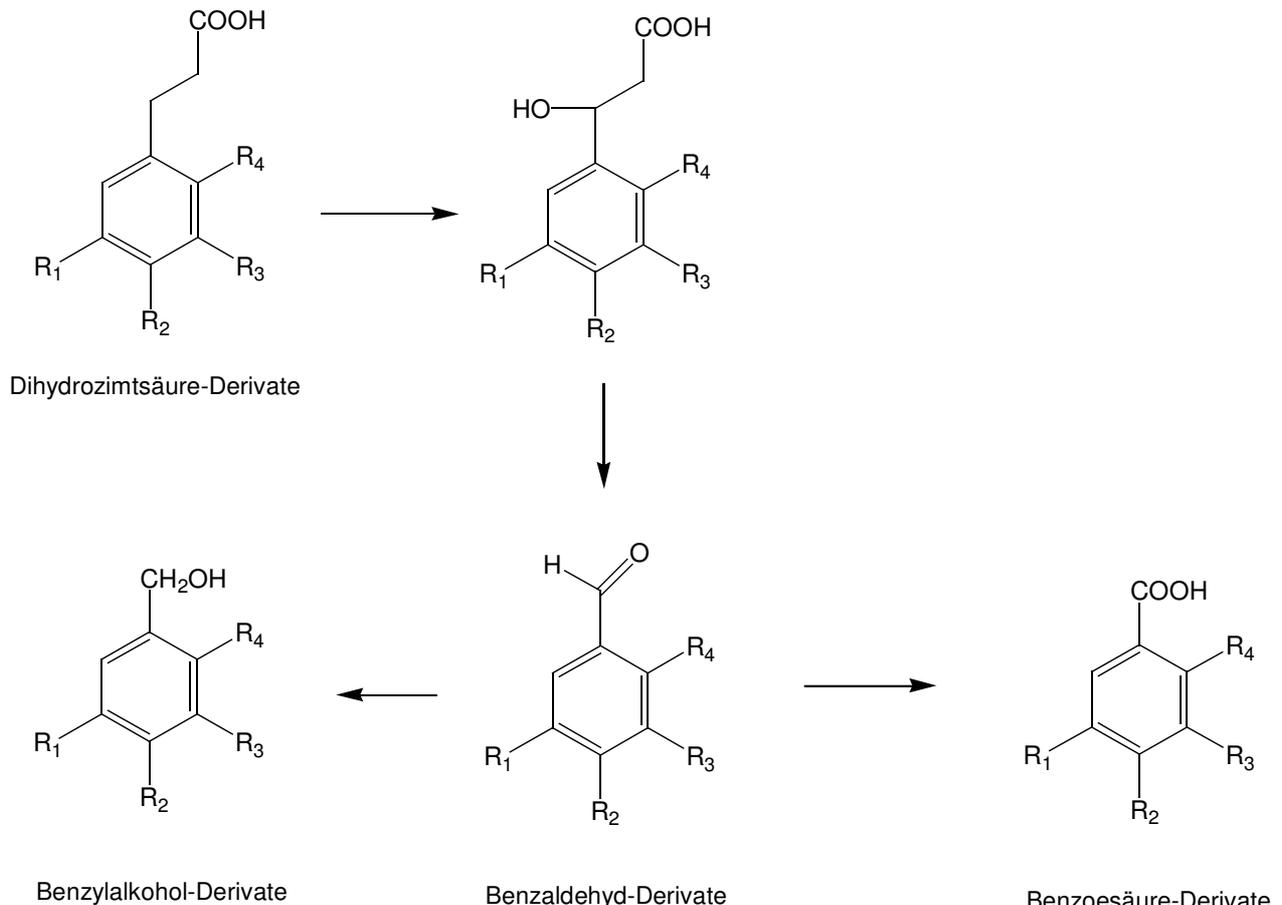


Abbildung 39 Biosynthese von Benzylalkohol-, Benzaldehyd- und Benzoessäure-Derivaten ausgehend von Dihydrozimtsäure-Derivaten

Gruppe	Beispiel	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Benzophenon-Derivate	Pungenin	- H	- OH	- OH	- H
	Acetosyringenon	- OCH <sub>3</sub>	- OH	- OCH <sub>3</sub>	- H
Benzylalkohole	Vanillylalkohol	- H	- OH	- OCH <sub>3</sub>	- H
	Salicin	- H	- H	- H	- O-β-D-Glc-p
Benzaldehyde	Vanillin	- H	- OH	- OCH <sub>3</sub>	- H
	Helicin	- H	- H	- H	- O-β-D-Glc-p

#### 4.3.1.2 Bildung von fungiziden Proteinen durch Milchsäurebakterien

Verschiedene Milchsäurebakterien sind in der Lage, Proteine mit fungizider Wirkung zu synthetisieren. Magnusson und Schnürer konnten bei *Lactobacillus coryniformis* Si3 die Bildung eines solchen Proteins nachweisen. Diese Substanz besitzt ein breites Wirkungsspektrum gegen Schimmelpilze und Hefen; vor allem Fusarien werden durch diese Verbindung in ihrem Wachstum ge-

hemmt (Magnusson und Schnürer, 2001). Bei *Lactobacillus pentosus* konnte die Synthese von Pentocin TV35b, einem Peptid, welches fungistatische Wirkung gegen *Candida albicans* besitzt, nachgewiesen werden (Okkers *et al.*, 1999).

Die Bildung einer solchen Substanz mit Proteincharakter wäre als Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durchaus denkbar, obgleich die Ergebnisse lediglich auf die Existenz einer oder mehrerer hemmender Substanzen hinweisen. Über den Charakter dieser Substanz(en) lassen sich anhand der hier vorliegenden Ergebnisse keine Aussagen treffen.

Die Ergebnisse der Mälzungsversuche können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die Biomasse korreliert unter den bei der Mälzung vorliegenden Bedingungen **nicht** mit der Menge an gebildetem DON und 3-Acetyl-DON.
2. Es liegt bei fast allen zuletzt getesteten antagonistisch wirksamen Mikroorganismen mindestens eine extrazelluläre Substanz vor, die das Fusarien-Wachstum und die Mykotoxinproduktion beeinflusst.
3. Diese Substanzen unterscheiden sich in ihrem Wirkungsgrad.
4. Der Einsatz von Lebendkeimen zum Weichwasser verstärkt die beobachteten Effekte auf das Wachstum und die Produktion von DON und 3-Acetyl-DON bei *Fusarium culmorum*.

#### 4.3.2 Mögliche *in vitro* Hemmechanismen bei *Stenotrophomonas maltophilia*

*Stenotrophomonas maltophilia* zeigte in Plattentests eine deutliche Hemmwirkung auf das Wachstum von *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium trincinctum* und *Fusarium sporotrichioides* (siehe Abbildung 4). Die fungizide Wirkung von *Stenotrophomonas maltophilia* wurde 1987 erstmals beschrieben (Elad *et al.*, 1987). Man stellte bei diesen Untersuchungen einen hemmenden Effekt von *Stenotrophomonas maltophilia* gegenüber pathogenen Bodenpilzen fest. Im Jahre 1996 wurde in medizinischen Studien die hemmende Wirkung mehrerer Isolate von *Stenotrophomonas maltophilia* auf klinikrelevante Pilzarten wie *Aspergillus fumigatus* und verschiedene *Candida* spp. beschrieben (Kerr, 1996). *Stenotrophomonas maltophilia* besitzt eine Vielzahl von Exoenzymen (Chitinasen, Proteasen usw.) und ist in der Lage, eine fungizide Substanz namens „Maltophilin“ (siehe Abbildung 40), ein makrozyklisches Lactam-Antibiotikum, zu bilden (Jakobi und Winkelmann, 1996). In Hemmtests mit Maltophilin wurde eine große Anzahl von Bodenpilzen gehemmt (z.B. *Mucor miehei*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani*, *Penicillium notatum*).

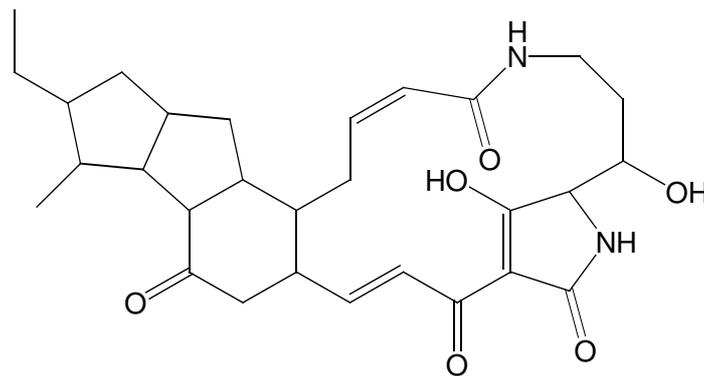


Abbildung 40 Struktur von Maltophilin

Die Bildung von Maltophilin ist eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduzierung des Wachstums von *Fusarium* spp. auf Nährböden. Es gelang jedoch nicht, einen Kulturüberstand zu gewinnen, welcher eine reduzierende Wirkung auf Bodenpilze ausübte. Da in mehreren Veröffentlichungen von der wachstumsfördernden Eigenschaft von *S. maltophilia* berichtet wurde, wurde dieses Bakterium in den Topfversuchen (siehe Kapitel 3.3) eingesetzt (Berg *et al.*, 1996). Bei diesen Versuchen konnten jedoch keine auswertbaren Ergebnisse gewonnen werden. Die unbehandelten mitgeführten Kontrollen zeigten ein wesentlich besseres Wachstum als die Versuchspflanzen, welche mit *S. maltophilia* und anderen Bakterien behandelt worden waren. Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen liegen in zu hohen eingesetzten Keimzahlen von *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* sowie in der Wahl des falschen Nährbodens und Standortes für diese Versuchsreihe. Auf weitere Untersuchungen *in planta* mit *S. maltophilia* TMW2.418 wurde verzichtet, da der weitere Verlauf der Arbeit auf den Einsatz von natürlichen antagonistischen Mikroorganismen zur Mälzung zielte. Gemäß dem Bundesgesundheitsblatt 40, 12 (1997) wird *S. maltophilia* in die Risikogruppe 2 eingestuft. Der Einsatz eines solchen pathogenen Keimes in hoher Keimzahl bei Feldversuchen oder bei der Mälzung war aufgrund der Gefährdung ausgeschlossen. Darüber hinaus konnte beim Zusatz von *S. maltophilia* zu Getreide-Mälzungen keine Reduzierung des Wachstums von *Fusarium culmorum* festgestellt werden.

#### 4.3.3 Mögliche Hemmechanismen bei *Paenibacillus polymyxa*

*Paenibacillus polymyxa* ist in der Lage, das Antibiotikum Polymyxin zu bilden. Es handelt sich hierbei um ein natürliches Polypeptid (siehe Abbildung 41), dessen Wirkungsweise auf einer Schädigung der Plasma-Membran anderer Organismen beruht. Es bindet an die Außenseite der Plasma-Membran, wobei es die Struktur der Membran stört, so daß die Metaboliten aus dem Zel-

linneren austreten können. Es wird vor allem als Therapeutikum gegen gramnegative Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt (Lim, 1998).

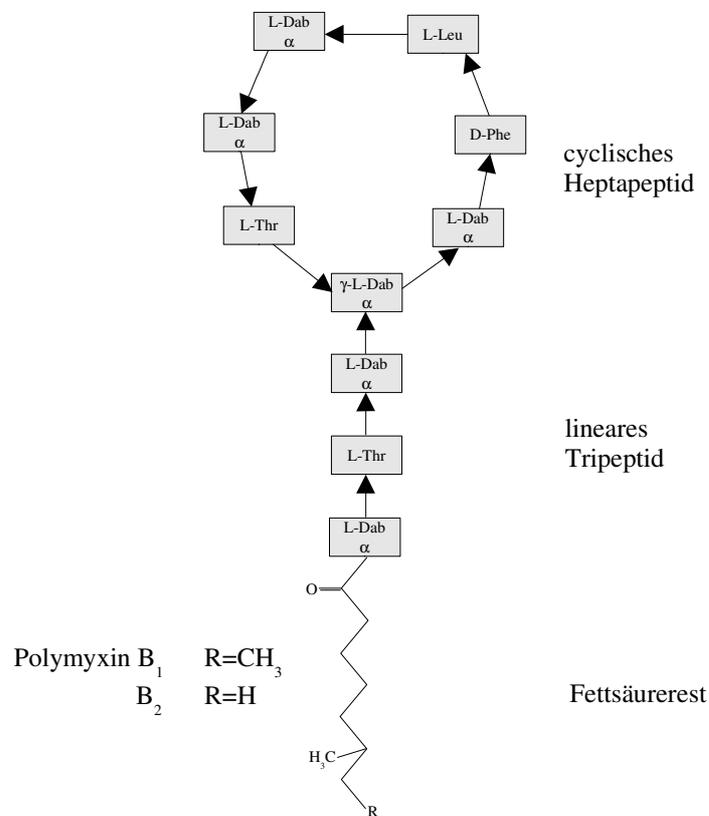


Abbildung 41 Struktur von Polymyxin

Bei den *in vitro* Hemmtests gegen Fusarien (siehe Kapitel 3.2) wurde festgestellt, daß bei der Anwesenheit von *Paenibacillus polymyxa* das Wachstum verschiedener Fusarien empfindlich gehemmt wird. Bei anschließenden Tests, bei denen reines Polymyxin den Nährböden zugesetzt wurde, war erneut eine deutliche Hemmung des Fusarien-Wachstums zu bemerken. Bei den Hemmtests mit *Paenibacillus polymyxa* Li2 war nach wenigen Tagen ein erneutes Wachstum von Fusarien festzustellen (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Zu diesem Zeitpunkt konnte man unter dem Mikroskop nur noch Sporen von *Paenibacillus polymyxa* Li2 finden. Durch die damit verbundene Einstellung des Stoffwechsels kam es zu keiner weiteren Bildung einer hemmenden Substanz. Der vorhandene Hemmstoff wurde aufgebraucht oder war wie Polymyxin lichtunbeständig. Dies legte den Schluß nahe, daß es sich bei der hemmenden Substanz um Polymyxin handeln muß. In beiden Testreihen mit *Paenibacillus polymyxa* Li2 und Polymyxin wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Da bei weiteren Versuchen mit diesem Mikroorganismus, vor allem beim Einsatz zur Mälzung, keine hemmenden Effekte festgestellt werden konnten und Polymyxin als toxische Substanz eingeordnet wird, wurden die Arbeiten mit diesem Keim nicht weitergeführt.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß antagonistisch wirksamer Mikroorganismen auf das Wachstum von *Fusarium culmorum* während der Mälzung von Gerste und Weizen untersucht. Bei den ersten Mälzungen von Weizen wurden alle Mikroorganismen eingesetzt, die entweder in der Literatur oder bei lehrstuhleigenen Versuchen auffällige Stoffwechseleigenschaften zeigten. Dabei konnte gezeigt werden, daß Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchen nicht auf technologische Prozesse wie die Mälzung von Getreide übertragbar sind. Die Ursache für diese Beobachtung liegt in den wesentlich komplexeren Bedingungen, die in einem *in vivo*-Testsystem wie der Mälzung von Getreide vorzufinden sind. In den *in vitro*-Versuchen haben die eingesetzten Testorganismen meist ideale Umgebungsbedingungen aufgrund vereinfachter Versuchsansätze. Im technologischen Prozeß der Mälzung von Getreide, der für diese Arbeit als Testsystem gewählt wurde, üben die Wildflora des Getreides und der Keimling selbst zusätzlich direkten Einfluß auf die Meßergebnisse aus.

Zur Bestimmung der Biomasse von *Fusarium culmorum* wurde eine am Lehrstuhl existierende PCR-Methode aufgegriffen und modifiziert. Diese Methode basierte auf einem Nachweis des *tri5*-Gens. Da auch *F. culmorum* dieses Gen besitzt, konnte dieses Verfahren zum Nachweis von *F. culmorum* eingesetzt werden. Diese PCR-Methode ermöglichte nach Abschluß des Mälzungsprozesses eine retrospektive Sicht über den Befall von *Fusarium culmorum* während der Mälzung. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Ergebnisse der Tox5-PCR mit gravimetrisch ermittelten Angaben zur Biomasse von Fusarien korrelierten.

Bei den Mälzungen mit Laktobazillen war in vielen Fällen eine Verminderung des Wachstums von *Fusarium culmorum* festzustellen. Als besonders potent erwiesen sich: *Weissella paramesenteroides* TMW1.983, *Lactobacillus salivarius* TMW1.962, *Lactobacillus reuteri* TMW1.975, *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.854, *Lactobacillus sanfranciscencis* TMW1.855 und *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001. Diese Laktobazillen reduzierten die gemessene Menge an *Fusarium culmorum*-DNA gegenüber den unbehandelten Kontrollen im Mälzungsprozeß und beeinflussten die Bildung von Deoxynivalenol durch *F. culmorum*.

Die Ergebnisse der Mälzungsversuche können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die Biomasse korrelierte unter den bei der Mälzung vorliegenden Bedingungen **nicht** mit der Menge an gebildetem Deoxynivalenol und 3-Acetyl-Deoxynivalenol.
2. Es lag bei allen getesteten antagonistisch wirksamen Milchsäurebakterien mindestens eine extrazelluläre Substanz vor, die das Fusarien-Wachstum und die Mykotoxinproduktion beeinflusste.

3. Diese Substanzen unterschieden sich je nach Mikroorganismus in ihrem Wirkungsgrad.
4. Der Einsatz von Lebendkeimen zum Weichwasser verstärkte die beobachteten Effekte auf das Wachstum und die Produktion von DON und 3-Acetyl-DON bei *Fusarium culmorum*.

Des Weiteren konnten bei der Auswertung der Ergebnisse aus den Mälzungsprozessen 3 Kategorien von Einflüssen auf das Wachstum von *Fusarium culmorum* festgestellt werden:

1. Die Höhe des PCR-Signals und des DON-Gehaltes schwankte zwischen den einzelnen Ansätzen mit verschiedenen eingesetzten Testorganismen. Dabei blieb das Verhältnis zwischen PCR-Signal und DON-Gehalt nahezu gleich.
2. Das Verhältnis zwischen PCR-Signal und DON-Gehalt kehrte sich um. Es kam zu einem Anstieg der Pilzbiomasse bei gleichzeitiger verminderter DON-Produktion. Ein erfolgter Abbau von DON in diesen Mälzungen wäre demnach nicht auszuschließen.
3. Es kam zu einer starken Verminderung des PCR-Signals bei gleichzeitigem Anstieg des DON-Gehaltes. Hier scheint starker Streß auf *Fusarium culmorum* ausgeübt worden zu sein, hervorgerufen durch die Behandlung mit antagonistisch wirksamen Mikroorganismen.

Zusammenfassend ist erkennbar, daß die Behandlung von Gerste und Weizen mit Milchsäurebakterien eine gute Möglichkeit darstellt, um das Wachstum von Fusarien während der Mälzung zu beeinflussen.

## 6 Summary

In this study the influence of antagonistic microorganisms on the growth of *Fusarium culmorum* during the malting process of barley and wheat was examined. In preliminary tests we used lactic acid bacteria with special metabolic properties. These properties were either described in literature and/or observed during experiments conducted at our institute. It could be shown that the results of the *in vitro* experiments could not be found under industrial conditions like the malting process due to the complexity of this *in vivo* testsystem. In contrast to the *in vitro* experiments where optimum conditions for the test organisms were chosen, the results of the malting-experiments were influenced by the original flora of the cereal and the sprout itself.

A PCR-assay developed at our institute was modified and applied to quantify the biomass of *Fusarium culmorum* in malt. This PCR based on the detection of the *tri5*-gene in trichothecene-forming fungi including *Fusarium culmorum*. Even at the end of the malting process, this PCR-method enabled us to determine the extent of the infestation with *Fusarium culmorum* during the malting. Furthermore, it could be shown that the results of the Tox5-PCR correlated with the biomass of *Fusarium culmorum* measured by gravimetric methods.

In many cases malting with lactic acid bacteria led to a decreased growth of *Fusarium culmorum*. The most potent microorganisms were: *Weissella paramesenteroides* TMW1.983, *Lactobacillus salivarius* TMW1.962, *Lactobacillus reuteri* TMW1.975, *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.854, *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.855 and *Streptococcus alactolyticus* TMW1.1001. These lactic acid bacteria reduced the concentration of *Fusarium culmorum*-DNA compared to the untreated controls and influenced the formation of deoxynivalenol by *Fusarium culmorum*.

The results of the malting experiments conducted with lactic acid bacteria can be summarized as follows:

1. Under the conditions during the malting process the biomass of *Fusarium culmorum* did not correlate with the content of deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol.
2. In every test system there was at least one extracellular substance which influenced the growth of fusaria and their mycotoxin-production.
3. These substances showed different efficacy depending on the applied microorganisms.
4. Adding cells of lactic acid bacteria to the steeping water increased the observed effects on the growth and the mycotoxin-production of *Fusarium culmorum*.

The influences on the growth of *Fusarium culmorum* could be divided in three categories:

1. While the intensity of the PCR-signal and the DON-contents varied, the PCR-signal-DON-content- ratio almost remained constant.
2. The proportion of PCR-signal to DON-content was inverted. The biomass of fungi increased, and simultaneously the DON-content decreased. Degradation of DON by microorganisms cannot be excluded.
3. While the biomass of *Fusarium culmorum* could hardly be detected we observed a strongly increased DON-content. In these cases treatment with antagonistic microorganisms seemed to have put *Fusarium culmorum* under enormous stress.

In conclusion, treatment of barley and wheat with lactic acid bacteria is an effective method to influence the growth of fusaria during the malting process.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abad, L. R., D'Urzo, Matilde P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., (1996)  
Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membran permeabilization.  
Plant Science, 118, 11-23
- Achilladelis, B., Adams, P.M., Hanson, J.R., (1972)  
Studies in terpenoid biosynthesis. Part VIII. The formation of the trichothecane nucleus.  
J. Chem. Soc. Perkin I, 1425-1427
- Achouak, Wafa , Normand, P., Heulin, T., (1999)  
Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in *Bacillaceae*.  
International Journal of Systematic Bacteriology, 49 (3), 961-967
- Adams, P.M., Hanson, J.R., (1971)  
A hydrogen shift in trichodecane biosynthesis.  
J. Chem. Soc., D. Chem. Commun., 1414-1415
- Alexander, N. J., Hohn, Thomas M., McCormick, Susan P., (1998)  
The *TR111* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for the C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis.  
Applied and Environmental Microbiology, 64, 221-225
- Aymerich, M. T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I. F., Hugas, M., (2000)  
Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins.  
Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K.D., Wouters, R., de Voever, P., Nollet, L., Verstraete, W. (Hrsg.), Food Microbiology, 17, 33-45
- Bechtel, D.B., Kaleikau, L.A., Gaines, R.L., Seitz, L.M., (1985)  
The Effect of *Fusarium graminearum* Infection on Wheat Kernels.  
Cereal Chemistry, 62 (3), 191-197

Beijerinck, M. W., (1902)

Zeitschrift für Spiritusindustrie, 531

Berg, G., Marten, P., Ballin, G., (1996)

*Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi.

Microbiological Research, 151, 19-27

Binder, J., Horvath, E.M., Schatzmayr, G., Ellend, N., Danner, H., Krska, R., Braun, R., (1997)

A bioassay for comparison of the toxicity of trichothecenes and their microbial metabolites.

Cereal Research Comm., 25, 343-346

Björnberg, A., Schnürer, Johan, (1993)

Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman.

Canadian Journal of Microbiology, 39, 623-628

Bochow, H., Hentschel, K.D., Jacob, M., (1988)

Möglichkeiten und Wege zur biologischen Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze durch Nutzung mikrobieller Antagonisten.

Wissenschaftliche Zeitschrift der Humboldt Universität zu Berlin. Reihe Agrarwissenschaften, 37(2), 169-176

Böhm-Schraml, M., (1999)

Bestimmung von Fusarientoxinen und deren maskierten Verbindungen zur gushing-Vorhersage sowie Nachweis von Ochratoxin A während des Mälzungs- und Brauprozesses. Schlußbericht im AiF Vorhaben 11029

Böhm-Schraml, M., Niessen, L., Donhauser, S., Engelhard, G., Wallnöfer, P., (1993)

Medium zur selektiven Abgrenzungen von *Fusarium graminearum*.

Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 89 (5), 152-154

Booth, C. (1971)

The Genus *Fusarium*

Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham, Royal, Bucks, 237 ff.

Bosund, I., (1960)

The bacteriostatic action of benzoic and salicylic acids. II. The effect on acetate metabolism.

Acta Chemica Scandinavica, 14, 111-125

Bosund, I., (1962)

The action of benzoic and salicylic acids on the metabolism of microorganisms,

Adv. Food. Res., 11, 331-353

Böswald, Ch., Engelhardt, G., Vogel, H., Wallnöfer, P., (1995)

Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance.

Natural Toxins, 3, 138-144

Bragulat, M.R., Abarca, M. L., Castellá, G., Cabañes, F.J., (1995)

Dyes as fungal inhibitors.

Journal of Applied Bacteriology, 79, 578-582

Burgess, L.W.: (Hrsg., 1981):

General ecology of the Fusaria.

The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 225-235

Cane, D.E., Swanson, S., Murphy, P.P.N., (1981)

Trichodiene biosynthesis and the enzymic cyclization of farnesyl pyrophosphate.

J. Am. Chem. Soc., 103, 2136-2138

Chrevatidis, Angeliki, El-Nezami, H., Auriola, Seppo, Mykkänen, Hannu, (2001)

Binding of trichothecene toxins by probiotic bacteria.

International Symposium "Bioactive Fungal Metabolites - Impact and Exploitation, University of Wales Swansea, 22 - 27. April 2001

- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., Wallbanks, S., (1991)  
Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA.  
FEMS Microbiology Letters, 77, 5-12
- Coppock, R. W., Swanson, S. P., Gelberg, H. B., Koritz, G. D., Hoffmann, W. E., Buck, W. B., Vesonder, R. F., (1985)  
Preliminary study of the pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine.  
J. Am. Vet. Med. Ass., 46, 169 – 174
- Cordell, G.A., (1976)  
Biosynthesis of sesquiterpenes.  
Chemical Review, 76, 425-459
- Corsetti, Aldo, Gobetti, M., Rossi, J., Damiani, P., (1998)  
Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1.  
Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 353-256
- Cote, L. M., Reynolds, J. D., Vesonder, R. F., Buck, W. B., Swanson, S. P., Coffey, R. T., Brown, D. C., (1984)  
Survey of vomitoxin contaminated feed grains in Midwestern United States.  
J. Am. Vet. Med. Ass., 184, 189-192
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., (1997)  
Mycotoxins  
Animal Feed Science and Technology, 69, 155-166
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Dijksama, W.T.P., (1998)  
3-Acetyl deoxynivalenol and esterase production in a fungicide-insensitive strain of *Fusarium culmorum*.  
Mycotoxin Research, 14, 9-18

- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, David, Dijksama, W.T.P., Dujardin, Aude, Placinta, C.M., (1998)  
Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens.  
European Journal of Plant Pathology, 104, 741-751
- Daeschel, Marc A., (1989)  
Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives.  
Food Technology, 43, 164-167
- Desjardins, Anne E., Hohn, Thomas M., McCormick, Susan P., (1993)  
Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance.  
Microbiological Reviews, 47, 595-604
- Diehl, Th., (1989)  
Getreidefusariosen: Im Vormarsch?  
Agrar Praxis, 2, 50-51
- Donhauser, S., Weideneder, A., Winnewisser, W., Geiger, E., (1990)  
Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier.  
Brauwelt, 32, 1317-1320
- Drochner, Winfried, (1989)  
Vorkommen von Fusarientoxinen in Futtermitteln.  
Dtsch. tierärztl. Wschr., 96, 350-352
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J., (1998)  
Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria  
To Remove Aflatoxin from Contaminated Media.  
J. Food Prot., 61(4), 466-468
- Elad, Y., Chet, I., Baker, R.C., (1987)  
Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi.  
Plant and Soil, 98, 325-339

Evans, R., Hanson, J.R., (1976)

Studies in terpenoid biosynthesis. Part XIV. Formation of the sesquiterpene trichodiene.  
J. Chem. Soc. Perkin I, 326-329

Fahmy, F., Flossdorf, J., Claus, D., (1985)

The DNA base composition of the type strains of the genus *Bacillus*.  
Systematic and Applied Microbiology, 6, 60-65

Fekete, C., Giczey, G, Papp, I, Toborhegyi, E, Szabo, L, Hornok, L., (1995)

High-Frequency Occurrence of Virus-like Particles with double-stranded RNA Genome in  
*Fusarium poae*.  
FEMS Microbiology Letters, 131 (3), 295-299

Forsyth, D. M., DeUirarte, L. A., Tuite, J., (1976)

Improvement for swine of *Gibberella zeae* - damaged corn by washing.  
J. Anim. Sci., 42, 1202 – 1206

Friend, D. W., Thompson, Brian K., Trennholm, H. L., Prelusky, D. B., (1986)

Effects of feeding deoxynivalenol (DON) - contaminated wheat diets to pregnant and lactating gilts and on their progeny.  
Can. J. Anim. Sci., 66, 229-236

Friend, D. W., Thompson, H. L., Thompson, Brian K., Fisher, P. S., Hartin, K. E., (1986)

Effect of feeding diets containing deoxynivalenol (Vomitoxin) - contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs.  
Can. J. Anim. Sci., 66, 765-775

Fuchs, E., Binder, E. M., Heidler, D., Krska, R., (2000)

Characterisation of metabolites after the microbial degradation of A- and B-trichothecenes by BBSH 797.  
Mycotoxin Research, 16 A (1), 66-69

Futtermittelverordnung,

Futtermittelverordnung

In der Fassung der Bekanntmachung vom 23. November 2000 (BGBl. I S. 1605)

Gänzle, Michael G, Höltzel, Alexandra, Walter, Jens, Jung, Günther, Hammes, Walter P., (2000)

Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584.

Applied and Environmental Microbiology, 66 (10), 4325-4333

Gourama, Hassan, (1997)

Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* by *Lactobacillus* Species.

Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 30, 279-283

Gourama, Hassan, Bullerman, L.B., (1995)

Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species.

International Association of milk, food and Environmental Sanitarians (Hrsg.),

Journal of Food Protection, 58, 1249-1256

Groot, Masja N. Nierop, de Bont, Jan A. M., (1998)

Conversion of Phenylalanine to Benzaldehyde Initiated by an Aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*.

Applied and Environmental Microbiology, 64 (8), 3009-3013

Grove, J.F., (1969)

Toxic 12,13-epoxy-trichothec-9-enes from *Fusarium* sp.

Chem. Commun., 1266

Hamilton, R. M. G., Trennholm, H. L., Thompson, Brian K., Greenhalgh, R., (1985)

The tolerance of white leghorn and broiler chicks, and turkey poults to diets that contain deoxynivalenol (vomitoxin) - contaminated wheat.

Poult. Sci., 64, 273 – 286

Hammerschmidt, Raymond, Kuc, Joseph: (Hrsg., 1995):

Induced Resistance to Disease on Plants

Hammes, W. P., N. Weiss and W. Holzapfel., (1992)

The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M. Harder, W. and Schleifer, K.H. (eds.). The Prokaryotes 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York, 1535 - 1594

Hammes, Walter P., Tichaczek, Petra S., (1994)

The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food.  
Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung, 198, 193-201

Hammes, Walter P., Vogel, Rudi F., (1995)

The Genus *Lactobacillus* «In : Wood, B.J.B., and Holzapfel, W.H. (eds) The lactic acid bacteria. Vol 2. The genera of lactic acid bacteria., 19-54

Hanson, J.R., Achilladelis, B., (1967)

The role of farnesyl pyrophosphate in the biosynthesis of trichothecin.  
Chem. Ind., 1643-1644

Herr, L.J., (1959)

A method of assaying soils for numbers of actinomycetes antagonistic to fungal pathogens.  
Phytopathology, 49, 270-273

Höflich, G., Kühn, G., (1996)

Förderung des Wachstums und der Nährstoffaufnahme bei kruziferen Öl- und Zwischenfrüchten durch inokulierte Rhizosphärenmikroorganismen.  
Zeitschrift für Pflanzenernähr. Bodenk., 159 (6), 575-581

Hohn, Thomas M. , Beremand, M.N., (1989)

Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*.

Booth, Paul M., Buchman, Georg W., Rashtchian, Ayoub (Hrsg.), Gene, 79, 131-138

Hohn, Thomas M. , Desjardins, Anne E., (1992)

Isolation and gene disruptions of the Tox5 gene encoding trichdiene synthase in *Gibberella pulicaris*.

Mol Plant Microbe Interact., 5, 149-256

Hohn, Thomas M., Van Middlesworth, F., (1986)

Purification and characterisation of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides*.

Archives of Biochemistry and Biophysics, 251, 756-761

Huber, J., Bochow, H., Junge, H., (1987)

Selektion und biotechnische Herstellung von Kulturlösungen mikrobieller Antagonisten zur Unterdrückung phytopathogener Bodenpilze.

Journal of Basic Microbiology, 27, 494-503

Hugh, R, Fekete, C., (1981)

*Pseudomonas maltophilia* sp. nov. nom. rev..

International Journal of Systematic Bacteriology, 31, 195

Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., (1996)

Maltophilin: A new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3090.

The Journal of Antibiotics, 49 (11), 1101-1104

Kandler, Otto, Weiss, Norbert (1986)

Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods Section 14. In: Bergey's Manual Volume 2, 1208 – 1234

Kerr, J. R., (1996)

Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by *Stenotrophomonas maltophilia*.

J. Med. Microbiol., 45, 380-382

- Kimura, Makoto, Kaneko, Isao, Komiyama, Masami, Takatsuki, Akira, Koshino, Hiroyuki, Lim, Daniel, Yoneyama, Katsuyoshi, Yamaguchi, Isamu, (1998)  
Trichothecene 3-O-Acetyltransferase Protects Both the Producing Organism and Transformed Yeast from Related Mykotoxins.  
Journal of Biological Chemistry, 273 (3), 1654-1661
- Kimura, Makoto, Shingu, Yoshinori, Yoneyama, Katsuyoshi, Yamaguchi, Isamu, (1998)  
Features of Tri101, the Trichothecene 3-O-Acetyltransferase Gene, Related to the Self-defense Mechanism in *Fusarium graminearum*.  
Bioscience Biotechnology Biochemistry, 62 (5), 1033-1036
- Knoll, Sandra, Niessen, Ludwig, Vogel, Rudi F., (2000)  
Application of a PCR Protocol for the Diagnosis of Trichothexene Producing *Fusarium* Species in Deoxynivalenol Contaminated Wheat.  
Mycotoxin Research, 16 A (2), 240-243
- Krska, R., Josephs, R. D., (2000)  
Determination of aflatoxins with state-of-the-art chromatographic methods: Problems to overcome.  
Mycotoxin Research, 16 A (2), 221-223
- Krska, R., Josephs, R. D., (2000)  
Interlaboratory Comparison Studies for the Improvement of the Analysis of Zearalenone in Europe.  
Mycotoxin Research, 16 A (2), 217-220
- Kurzak, P., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., (1998)  
Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Ducks.  
Systematic and Applied Microbiology, 21, 588-592
- Kurzak, P., (2000)  
Development of pathogen suppressive poultry feed supplements containing lactic acid bacteria from ducks.  
Diss. Universität München

- Lafarge-Frayssinet, C., Lespinats, G., Lafont, P., Loisollier, F., Mousset, S., Rosenstein, Y., Frayssinet, C., (1979)  
Immunsuppressive effects of *Fusarium* extracts and trichothecenes: blastogenic response of murine splenic and thymic cells to mitogens (40439).  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 160, 303 -311
- Laitila, A., Tapani, K.-M., Haikara, A., (1997)  
Lactic acid starter cultures for prevention of the formation of *Fusarium* mycotoxins during malting.  
EBC Congress, 137-144
- Langseth, W., Stabbetorp, H., (1996)  
The effect of lodging and time of harvest on Deoxynivalenol contamination in barley and oats.  
Phytopathology, 144, 241-245
- Lim, Daniel (1998)  
Microbiology, WCB/McGraw-Hill, Boston, Massachusetts
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., (1990)  
Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.  
FEMS Microbiol. Rev., 87, 149-164
- Liske, Rüdiger B., Niessen, Ludwig, Vogel, Rudi F., (2000)  
Potential of Lactic Acid Bacteria to Reduce the Growth of *Fusarium culmorum* in the Malting Process.  
Mycotoxin Research, 16 A (1), 62-65
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., (1993)  
Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*.  
Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K.D., Wouters, R., de Voever, P., Nollet, L., Verstraete, W. (Hrsg.), Food Microbiology, 10, 411-419

Luckner, Martin, (1990)

Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals.

Gustav Fischer Verlag, Jena, 3. Auflage

Magnusson, Jesper, Schnürer, Johan, (2001)

*Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound.

Applied and Environmental Microbiology, 67, 1, 1-5

Maidan, V. M., Dunnion, D., Irwin, W. J., Akhtar, S., (1997)

Effect of ultrasound on the stability of oligodeoxynucleotides in vitro.

Int. J. Pharm., 152, 121-125

Marscheck, W.J., (1971)

Current trends in the microbial transformation of steroids.

Prog. Ind. Microbiol., 10, 49-103

Matthies, A., Flatter, A., Semar, M., Bleiholder, H., Oppitz, K., (2000)

*Fusarium* in wheat: importance and toxin production in the field - possibilities and limits of fungicide treatments.

Mycotoxin Research, 16 A (1), 6-10

Megharaj, M, Garthwaite, I, Thiele, J-H, (1997)

Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture.

Letters in Applied Microbiology, 24 (5), 329-333

Meier, A., Birzele, Barbara, Oerke, E.C., Dehne, H.W., (2000)

Impact of growth conditions on the occurrence of *Fusarium* spp. and the mycotoxin content of wheat.

Mycotoxin Research, 16 A (1), 12-15

Mersch-Sundermann, Volker, Brenner, Volker, M. (1989)

Medizinische Mikrobiologie für MTA, Georg Thieme, Stuttgart

Molto, G., Samar, M. M., Resnik, S., Martinez, E. J., Pacin, A., (2000)

Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment.

Food Additives and Contaminants, 17 (9), 809-813

Mulfinger, Sven, Niessen, Ludwig, Vogel, Rudi F., (2000)

PCR based quality control of toxigenic *Fusarium* spp. in brewing malt using ultrasonication for rapid sample preparation.

Advances in Food Sciences, 22 1/2, 38-46

Müller, C., (1995)

Möglichkeiten zur Bewertung des Gesundheitszustandes von Braugerste und Malz.

Brauwelt, 135, 1036-1054

Müller, Gunther, Weber, Herbert (1996)

Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen, Behrs Verlag

Müller, Hans-Martin, Reimann, J, Schumacher, U, Schwadorf, K, (1997)

Natural occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany.

Mycopathologia, 137 (3), 185-192

Narziss, L. (1976)

Die Bierbrauerei Band 1, Die Technologie der Malzbereitung. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Auflage

Niessen M.L., Vogel R.F., (1998)

Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples.

Systematic and Applied Microbiology, 21, 618-631

Niessen, L., (1993)

Entwicklung und Anwendung Immunchemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger Fusarium-Toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) von Bieren.

Diss. Universität München

Niessen, L., Donhauser, S., Weideneder, A., Geiger, E., Vogel, H., (1992)

Mykologische Untersuchungen an Cerealien und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) des Bieres.

Brauwelt, 16, 702-714

Niessen, L., Klusmann, J., Vogel, Rudi F., (1998)

Quantitative estimation of *Fusarium graminearum* DNA using a solid phase PCR assay (DIAPOPS).

J Food Mycol, 1(2), 73-84

Niku-Paavola, M.K., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., (1999)

New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*.

J. of Applied Microbiology, 86, 29-35

Nozoe, S., Machida, Y., (1972)

The structures of trichodiol and trichidiene.

Tetrahedron, 28, 5105-5111

Obieglo, U., Krebs, B., Junge, H., (1990)

Einsatz mikrobieller Antagonisten gegen die Fusarium-Welke der Edelnelke (*Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*) in hydroponischen Kulturverfahren.

Nachrichtenblatt Pflanzenschutz, 44(8), 169-171

Obst, A., (1988)

Wie man Ährenfusariosen vermeidet.

Pflzl. Prod. DLG-Mitt., 9, 470-471

- Okkers, D.J., Dicks, L. M. T., Silvester, M., Joubert, J.J., Odendaal, H.J., (1999)  
Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isoalte from *Lactobacillus pentosus* with fungistatic effect on *Candida albicans*.  
Journal of Applied Microbiology, 87, 726-734
- Ooka, J. J., Kommedahl, T., (1977)  
Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields.  
Phytopathology, 67 (8), 1023-1026
- Palleroni, N.J., Bradbury, J.F., (1993)  
*Stenotrophomonas*, a New Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980).  
Int. J. of Systematic Bacteriology, 43(3), 606-609
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M., (1999)  
Toxic effects of mycotoxins in humans.  
Bulletin of the World Health Organization, 77, 754-766
- Petersson, S., Schnürer, Johan, (1995)  
Biocontrol of Mold Growth in High-Moisture Wheat Stored under Airtight Conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*.  
Applied and Environmental Microbiology, 61 (3), 1027-1032
- Petzinger, E., (1998)  
Ochratoxin A aus toxikologischer Sicht.  
Getreide Mehl und Brot, 52, 358-362
- Pitt, J. I., Basilico, J. C., Abarca, M. L., López, C., (2000)  
Mycotoxins and toxigenic fungi.  
Medical Mycology, 38 (1), 41-46
- Prelusky, D. B., Hamilton, R. M. G., Trenholm, H. L., Miller, J. D., (1986)  
Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of C - Labeled deoxynivalenol to white leghorn hens.  
Fund. Appl. Toxicol., 7, 635 – 645

Prelusky, D. B., Vera, D. M., Trennholm, H. L., Martin, K. E., (1986)

Excretion profiles of the mycotoxin deoxynivalenol, following oral and intra venous administration to sheep.

Fund. Appl. Toxicol., 6, 356 - 363

Proctor , Robert H. , Hohn, Thomas M. , McCormick, Susan P., (1995)

Reduced virulence of *Gibberella zea* caused by disruption of a Trichothecene Toxin biosynthetic gene.

Mol Plant Microbe Interact., 8 (4), 593-601

Remiger, Alexandra, (1998)

Biochemische und genetische Charakterisierung der Bakteriozine Plantaricin 1.25alpha und 1.25beta von *Lactobacillus plantarum* TMW1.25.

Diss. Universität München

Rotter, B.A., Prelusky, D. B., (1996)

Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin).

Journal of Toxicology and Environmental Health, 48, 1-34

Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erli, H.A., (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science, 239, 487-494

Schilling, A.G., Möller, E.M., Geiger, H.H., (1996)

Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*.

Phytopathology, 86 (5), 515-522

Schleifer, Karl Heinz, Ludwig, Wolfgang, (1995)

Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera.

Systematic and Applied Microbiology, 18, 461-467

Schuh, M., Baumgartner, W., (1988)

Mikrobiologisch und Mykotoxikologisch kontaminierte Futtermittel als Krankheitsursache bei Rindern.

Wien. tierärztl. Monatsschr., 75, 329-332

Schwarz, P.B., (1996)

Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt.

Journal of the Institute of Brewing, 102, 93-96

Schwarz, P.B., Casper, Howard H., Barr, J.M., (1995)

Survey of the occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in barley grown in Minnesota, North Dakota and South Dakota during 1993.

Technical Quarterly, Master Brewers Association of the Americas. 32 (4)

Scott, P.M., (1977)

*Penicillium* mycotoxins.

Wyllie TD, Morehouse LG, eds. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses, an Encyclopedic Handbook. Vol. 1. Mycotoxigenic Fungi. New York: Marcel Dekker., 283-356

Scott, P.M., Kanhere, S.R., Weber, D., (1993)

Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography - mass spectrometry.

Food Additives and Contaminants, 10, 381-389

Shim, W.B., Kim, J.C., Seo, J.A., Lee, Y.W., (1997)

Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers.

Food Additives and Contaminants, 14(1), 1-5

Skerman, V. B. C., McGowan, V., Sneath, P.H.A., (1980)

Approved list of bacterial names.

International Journal of Systematic Bacteriology, 30, 225-420

Snijders, C.H.A., Perkowski, (1990)

Effects of Head Blight Caused by *Fusarium culmorum* on Toxin Content and Weight of Wheat Kernels.

Phytopathology, 80, 566-570

Stanier, R. Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M., (1966)

The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study.

Journal of General Microbiology, 43, 159-275

Stettner, Georg, (2001)

Nachweis und Verhalten von Deoxynivalenol und Ochratoxin-A während der Bierbereitung.

Diss. Universität München

Straus, N., Scott, J. R., Wong, B., (1999)

The trichodiene synthase gene from *Stachybotrys chartarum*: a potential diagnostic indicator for indoor contamination.

In: Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control. E. Johanning (ed.), Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany, New York, USA, 343-350

Tamm, Ch., Breitenstein, W.: (Hrsg., 1980)

The biosynthesis of trichothecene mycotoxins. In: The Biosynthesis of Mycotoxins. A study in secondary metabolism, Academic Press, New York, England, 69 – 101

Teuber, Michael, (1993)

Lactic acid bacteria.

Rahm, H.B., and Reed, G. (eds) Biotechnology, 2nd edition, 326-366

Thalmann, A., (1983)

Fusarien und ihre Toxine in Futtermitteln.

Kraftfutter, 9, 360-361

- Tichaczek, Petra S., Nissen-Meyer, Jon, Nes, I. F., Vogel, Rudi F., Hammes, Walter P., (1992)  
Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH673.  
Systematic and Applied Microbiology, 15, 460-468
- Trapp, S C, Jarvis, Bruce B., Hohn, Thomas M., (1995)  
Isolation and nucleotide sequence of the trichodiene synthase gene from the macrocyclic trichthecene-producing fungus *Myrothecium roridum*.  
J. Cell. Biochem. Supp., 19B, 154-160
- Trenholm, H.L., Cochrane, W. P., Cohen, H., Elliot, J. I., Farnworth, E. R., Friend, D. W., Hamilton, R. M. G., Standish, J. F., Thompson, Brian K., (1983)  
Survey of vomitoxin contamination of 1980 ontario white winter wheat crop: results of survey and feeding trials.  
J. Ass. Off. Anal. Chem., 66, 92-97
- Trenholm, H. L., Hamilton, R. M. G., Friend, D. W., Thompson, Brian K., Hartin, K. E., (1984)  
Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol) - contaminated wheat: Effects on swine, poultry, and dairy cattle.,  
J. Am. Vet. Med. Ass., 185, 527-531
- Trissler, Regine (1993)  
Untersuchungen zu Parametern der Fusarienresistenz von Winterweizensorten.  
Diss. Universität Stuttgart-Hohenheim
- Tryphonas, H., Iverson, F., So, Y., Ners, E. A., McGuire, P. F., O'Grady, L., Clayson, D. B., Scott, P.M., (1986)  
Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral and cellular Immunity of mice.  
Toxicology Letters, 30, 137-150
- Tryphonas, H., O'Grady, L., Arnold, D. L., McGuire, P. F., Karpinski, K., Vesonder, R. F., (1984)  
Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral immunity of mice.  
Toxicology Letters, 23, 17-24

Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., (1973)

Biological and chemical detect. of trichoth. mycotoxins of Fus. species.

Applied Microbiology, 25, 699 - 704

Uraih, N., Cassity, T.R., Chipley, J.R., (1977)

Partial characterization of the mode of action of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis.

Canadian Journal of Microbiology, 23, 1580-1584

Uraih, N., Chipley, J.R., (1976)

Effects of various acids and salts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* NRRL 3145.

Microbiologica, 17 (67), 51-59

Verordnung über diätetische Lebensmittel

Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) I. d. F. der Bekanntmachung vom 25.8.1988 (BGBl. I S.1713), zuletzt geändert durch Art. 3 VO zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe v. 29.1.1998 (BGBl. I S.230, 292)

Verordnung über Höchstmengen

Verordnung über Höchstmengen an Mykotoxinen in Lebensmitteln (Mykotoxin-Höchst-mengenverordnung – MHmV), Vom 2. Juni 1999 (BGBl. I S. 1248)

Vesonder, R. F., Ciegler, A., Burmeister, H.R., Jensen, A.H., (1979)

Acceptance by swine and rats of corn amended with trichothecenes.

Applied and Environmental Microbiology, 38, 344-346

Weber, R., (1983)

Mycotoxine in Lebensmitteln.

Chemie in unserer Zeit, 17 (5), 146-151

Wiskott, U. (1978)

Untersuchungen über die immunsuppressive Wirksamkeit von Fusarientoxinen.

Diss. Ludwig - Maximilian - Universität, München

Xu, J.R., Yan, K., Dickman, M.B., Leslie, J.F., (1995)

Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (fusarium section Liseola).

Mol Plant Microbe Interact., 8, 74-84

Yoshizawa, T.: (Hrsg., 1983): Red-mold diseases and natural occurrence in Japan. Trichothecenes, -chemical. biological and toxicological aspects

Zamir, L.O., Devor, K.A., (1987)

Kinetik pulse-labeling study of *Fusarium culmorum*.

Journal of Biological Chemistry, 262, 15348-15353

## 8 Anhang

### 8.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Formeln

Abk.	Abkürzung
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
15-Acetyl-DON	15-Acetoxy-3α,7α-dihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on
3-Acetyl-DON	3α-Acetoxy-7α,15-dihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
DON	Deoxynivalenol
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	Wasser für die Molekularbiologie (pyrogenfrei)
k. A.	keine Angaben
KG	Körpergewicht
L	Liter
LAF	Laminar Air Flow
m	Minute
mAU	milli absorption unit
n. n.	nicht nachweisbar
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
ppb	parts per billion (z.B. 1 μg/kg)
ppm	parts per million (z.B. 1 mg/kg)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Reak.	Reaktion
tgl.	täglich
ÜN	Übernacht Kultur

Mittelwert

$$\frac{1}{n} * \sum x_i$$

n = Anzahl der Meßwerte

$x_i$  = Einzelwert

Standardabweichung

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

## 8.2 Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen der Isolate TMW 2.418, DSM50170 und DSM8573

	1	11	21	31	41	50		
1	TGGCTCAGAG	TGAACGCTGG	CGGTAGGCCT	AACACATGCA	AGTCGAACGG	50	DSM50170	
1	TGGCTCAGAG	TGAACGCTGG	CGGTAGGCCT	AACACATGCA	AGTCGAACGG	50	DSM8573	
1	TGGCTCAGAG	TGAACGCTGG	CGGTAGGCCT	AACACATGCA	AGTCGAACGG	50	TMW2.418	
	51	61	71	81	91	100		
51	CAGCAC-AGG	AGAGCTTGCT	CTCTG-GGTG	GCGAGTGGCG	GACGGGTGAG	98	DSM50170	
51	CAGCACAGTA	AGAGCTTGCT	CTTATGGGTG	GCGAGTGGCG	GACGGGTGAG	100	DSM8573	
51	CAGCAC-AGA	GGAGCTTGCT	CCTTG-GGTG	GCGAGTGGCG	GACGGGTGAG	98	TMW2.418	
	101	111	121	131	141	150		
99	GAATACATCG	GAATCTACTT	TTTCGTGGGG	GATAACGTAG	GGAAACTTAC	148	DSM50170	
101	GAATACATCG	GAATCTACCT	TTTCGTGGGG	GATAACGTAG	GGAAACTTAC	150	DSM8573	
99	GAATACATCG	GAATCTACTT	TTTCGTGGGG	GATAACGTAG	GGAAACTTAC	148	TMW2.418	
	151	161	171	181	191	200		
149	GCTAATACCG	CATACGACCT	ACGGGTGAAA	GCAGGGGATC	TTCGGACCTT	198	DSM50170	
151	GCTAATACCG	CATACGACCT	TCGGGTGAAA	GCAGGGGACC	TTCGGGCCTT	200	DSM8573	
149	GCTAATACCG	CATACGACCT	ACGGGTGAAA	GCAGGGGAyC	TTCGGACCTT	198	TMW2.418	
	201	211	221	231	241	250		
199	GCGCGATTGA	ATGAGCCGAT	GTCGGATTAG	CTAGTTGGCG	GGGTAAAGGC	248	DSM50170	
201	GCGCGGATAG	ATGAGCCGAT	GTCGGATTAG	CTAGTTGGCG	GGGTAAAGGC	250	DSM8573	
199	GCGCGATTGA	ATGAGCCGAT	GTCGGATTAG	CTAGTTGGCG	GGGTAAAGGC	248	TMW2.418	

	251	261	271	281	291	300		
249	CCACCAAGGC	GACGATCCGT	AGCTGGTCTG	AGAGGATGAT	CAGCCACACT	298	DSM50170	
251	CCACCAAGGC	GACGATCCGT	AGCTGGTCTG	AGAGGATGAT	CAGCCACACT	300	DSM8573	
249	CCACCAAGGC	GACGATCCGT	AGCTGGTCTG	AGAGGATGAT	CAGCCACACT	298	TMW2.418	
	301	311	321	331	341	350		
299	GGAACTGAGA	CACGGTCCAG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TGGGGAATAT	348	DSM50170	
301	GGAACTGAGA	CACGGTCCAG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TGGGGAATAT	350	DSM8573	
299	GGAACTGAGA	CACGGTCCAG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TGGGGAATAT	348	TMW2.418	
	351	361	371	381	391	400		
349	TGGACAATGG	GCGCAAGCCT	GATCCAGCCA	TACCGCGTGG	GTGAAGAAGG	398	DSM50170	
351	TGGACAATGG	GCGCAAGCCT	GATCCAGCCA	TACCGCGTGG	GTGAAGAAGG	400	DSM8573	
349	TGGACAATGG	GCGCAAGCCT	GATCCAGCCA	TACCGCGTGG	GTGAAGAAGG	398	TMW2.418	
	401	411	421	431	441	450		
399	CCTTCGGGTT	GTAAAGCCCT	TTTGTTGGGA	A-AGAAATCC	AGCTGGTTAA	447	DSM50170	
401	CCTTCGGGTT	GTAAAGCCCT	TTTGTTGGGA	AAGAA-AAGC	AGTCGATTAA	449	DSM8573	
399	CCTTCGGGTT	GTAAAGCCCT	TTTGTTGGGA	A-AGAAATCC	AGCCGGCTAA	447	TMW2.418	
	451	461	471	481	491	500		
448	TACCCGTTG	GGATGACGGT	ACCCAAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTTCGT	497	DSM50170	
450	TACTCGTTG	TTCTGACGGT	ACCCAAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTTCGT	499	DSM8573	
448	TA <sub>y</sub> CTGGTTG	GGATGACGGT	ACCCAAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTTCGT	497	TMW2.418	
	501	511	521	531	541	550		
498	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GAAGGGTGCA	AGCGTTACTC	GGAATTACTG	547	DSM50170	
500	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GAAGGGTGCA	AGCGTTACTC	GGAATTACTG	549	DSM8573	
498	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GAAGGGTGCA	AGCGTTACTC	GGAATTACTG	547	TMW2.418	

	551	561	571	581	591	600		
548	GGCGTAAAGC	GTGCGTAGGT	GGTCGTTTAA	GTCCGTTGTG	AAAGCCCTGG	597	DSM50170	
550	GGCGTAAAGC	GTGCGTAGGT	GGTTGTTTAA	GTCTGTTGTG	AAAGCCCTGG	599	DSM8573	
548	GGCGTAAAGC	GTGCGTAGGT	GGTTGTTTAA	GTCTGTTGTG	AAAGCCCTGG	597	TMW2.418	
	601	611	621	631	641	650		
598	GCTCAACCTG	GGAACTGCAG	TGGATACTGG	GCGACTAGAG	TGTGGTAGAG	647	DSM50170	
600	GCTCAACCTG	GGAATTGCAG	TGGATACTGG	GCGACTAGAG	TGTGGTAGAG	649	DSM8573	
598	GCTCAACCTG	GGAACTGCAG	TGGAAACTGG	ACAACTAGAG	TGTGGTAGAG	647	TMW2.418	
	651	661	671	681	691	700		
648	GGTAGCGGAA	TTCCTGGTGT	AGCAGTGAAA	TGCGTAGAGA	TCAGGAGGAA	697	DSM50170	
650	GGTAGTGGAA	TTCCCGGTGT	AGCAGTGAAA	TGCGTAGAGA	TCGGGAGGAA	699	DSM8573	
648	GGTAGCGGAA	TTCCCGGTGT	AGCAGTGAAA	TGCGTAGAGA	TCGGGAGGAA	697	TMW2.418	
	701	711	721	731	741	750		
698	CATCCATGGC	GAAGGCAGCT	ACCTGGACCA	ACACTGACAC	TGAGGCACGA	747	DSM50170	
700	CATCCATGGC	GAAGGCAGCT	ACCTGGACCA	ACACTGACAC	TGAGGCACGA	749	DSM8573	
698	CATCCATGGC	GAAGGCAGCT	ACCTGGACCA	ACACTGACAC	TGAGGCACGA	747	TMW2.418	
	751	761	771	781	791	800		
748	AAGCGTGGGG	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCCTAAA	797	DSM50170	
750	AAGCGTGGGG	AGCAAACARG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCCTAAA	799	DSM8573	
748	AAGCGTGGGG	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCCTAAA	797	TMW2.418	
	801	811	821	831	841	850		
798	CGATGCGAAC	TGGATGTTGG	GTGCAATTTG	GCACGCAGTA	TCGAAGCTAA	847	DSM50170	
800	CGATGCGAAC	TGGATGTTGG	GTGCAATTTG	GCACGCAGTA	TCGAAGCTAA	849	DSM8573	
798	CGATGCGAAC	TGGATGTTGG	GTGCAATTTG	GCACGCAGTA	TCGAAGCTAA	847	TMW2.418	

	851	861	871	881	891	900		
848	CGCGTTAAGT	TCGCCGCCTG	GGGAGTACGG	TCGCAAGACT	GAAACTCAAA	897	DSM50170	
850	CGCGTTAAGT	TCGCCGCCTG	GGGAGTACGG	TCGCAAGACT	GAAACTCAAA	899	DSM8573	
848	CGCGTTAAGT	TCGCCGCCTG	GGGAGTACGG	TCGCAAGACT	GAAACTCAAA	897	TMW2.418	
	901	911	921	931	941	950		
898	GGAATTGACG	GGGGCCCCGA	CAAGCGGTGG	AGTATGTGGT	TTAATTCGAT	947	DSM50170	
900	GGAATTGACG	GGGGCCCCGA	CAAGCGGTGG	AGTATGTGGT	TTAATTCGAT	949	DSM8573	
898	GGAATTGACG	GGGGCCCCGA	CAAGCGGTGG	AGTATGTGGT	TTAATTCGAT	947	TMW2.418	
	951	961	971	981	991	1000		
948	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	TGGCCTTGAC	ATGTCGAGAA	CTTTCCAGAG	997	DSM50170	
950	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	TGGTCTTGAC	ATGTCGAGAA	CTTTCCAGAG	999	DSM8573	
948	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	TGGCCTTGAC	ATGTCGAGAA	CTTTCCAGAG	997	TMW2.418	
	1001	1011	1021	1031	1041	1050		
998	ATGGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACTCGAACAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	1047	DSM50170	
1000	ATGGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACTCGAACAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	1049	DSM8573	
998	ATGGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACTCGAACAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	1047	TMW2.418	
	1051	1061	1071	1081	1091	1100		
1048	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCGCAACGA	GCGCAACCCT	1097	DSM50170	
1050	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCGCAACGA	GCGCAACCCT	1099	DSM8573	
1048	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCGCAACGA	GCGCAACCCT	1097	TMW2.418	
	1101	1111	1121	1131	1141	1150		
1098	TGTCCTTAGT	TGCCAGCACG	TAATGGTGGG	AACTCTAAGG	AGACCGCCGG	1147	DSM50170	
1100	TGTCCTTAGT	TGCCAGCACG	TAATGGTGGG	AACTCTAAGG	AGACCGCCGG	1149	DSM8573	
1098	TGTCCTTAGT	TGCCAGCACG	TAATGGTGGG	AACTCTAAGG	AGACCGCCGG	1147	TMW2.418	

	1151	1161	1171	1181	1191	1200		
1148	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	1197	DSM50170	
1150	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	1199	DSM8573	
1148	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	1197	TMW2.418	
	1201	1211	1221	1231	1241	1250		
1198	GGCCAGGGCT	ACACACGTAC	TACAATGGTA	GGGACAGAGG	GCTGCAAGCC	1247	DSM50170	
1200	GACCAGGGCT	ACACACGTAC	TACAATGGTA	GGGACAGAGG	GCTGCAAACC	1249	DSM8573	
1198	GGCCAGGGCT	ACACACGTAC	TACAATGGTA	GGGACAGAGG	GCTGCAAGCC	1247	TMW2.418	
	1251	1261	1271	1281	1291	1300		
1248	GGCGACGGTA	AGCCAATCCC	AGAAACCCTA	TCTCAGTCCG	GATTGGAGTC	1297	DSM50170	
1250	CGCGAGGGCA	AGCCAATCCC	AGAAACCCTA	TCTCAGTCCG	GATTGGAGTC	1299	DSM8573	
1248	GGCGACGGTA	AGCCAATCCC	AGAAACCCTA	TCTCAGTCCG	GATTGGAGTC	1297	TMW2.418	
	1301	1311	1321	1331	1341	1350		
1298	TGCAACTCGA	CTCCATGAAG	TCGGAATCGC	TAGTAATCGC	AGATCAGCAT	1347	DSM50170	
1300	TGCAACTCGA	CTCCATGAAG	TCGGAATCGC	TAGTAATCGC	AGATCAGCAT	1349	DSM8573	
1298	TGCAACTCGA	CTCCATGAAG	TCGGAATCGC	TAGTAATCGC	AGATCAGCAT	1347	TMW2.418	
	1351	1361	1371	1381	1391	1400		
1348	TGCTGCGGTG	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	1397	DSM50170	
1350	TGCTGCGGTG	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	1399	DSM8573	
1348	TGCTGCGGTG	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	1397	TMW2.418	
	1401	1411	1421	1431	1441	1450		
1398	TGGGAGTTTG	TTGCACCAGA	AGCAGGTAGC	TTAACCTTCG	GGAGGGCGCT	1447	DSM50170	
1400	TGGGAGTTTG	TTGCACCAGA	AGCAGGTAGC	TTAACCTTCG	GGAGGGCGCT	1449	DSM8573	
1398	TGGGAGTTTG	TTGCACCAGA	AGCAGGTAGC	TTAACCTTCG	GGAGGGCGCT	1447	TMW2.418	

	1451	1461	1471	1481	1491	1500		
1448	TGCCACGGTG	TGGCCGATGA	CTGGGGTGAA	GTCGTAACAA	GGTAGCCGTA	1497	DSM50170	
1450	TGCCACGGTG	TGGCCGATGA	CTGGGGTGAA	GTCGTAACAA	GGTAGCCGTA	1499	DSM8573	
1448	TGCCACGGTG	TGGCCGATGA	CTGGGGTGAA	GTCGTAACAA	GGTAGCCGTA	1497	TMW2.418	
	1501	1511	1521	1531				
1498	TCGGAAGGTG	CGGCTGGATC	ACCTCTTT.. ..			1525	DSM50170	
1500	TCGGAAGGTG	CGGCTGGATC	ACCTCTTTTC TG			1531	DSM8573	
1498	TCGGAAGGTG	CGGCTGGATC	ACCTCTTT.. ..			1525	TMW2.418	

### 8.3 Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen der Isolate JordA, JordC und JordD mit vergleichbaren Sequenzen aus der ARB-Datenbank

	1	11	21	31	41	50		
1	UAAAUGGAGA	GUUUGAUCCU	GGCUCAGGAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA	50	Bb.lateros	
1	.....	.....	.....GAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA	23	Bb.latero3	
1	.....GAGA	GUUUGAUCCU	GGCUCAGGAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA	44	Bb.latero4	
1	.....GAGA	GUUUGAUCCU	GGCUCAGGAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA	44	Bb.latero2	
1	U-----	----GAUVMU	BGCUCABGAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA	37	JordA	
1	.....	.....T	GGCTCAGGAC	GAACGCTGGC	GGCGTGCCTA	31	JordC	
1	...ATGGC--	-----	---TCAGGAC	GAACGCTGGC	GGCGTGCCTA	32	JordD	
	51	61	71	81	91	100		
51	AUACAUGCAA	GUCGAGCGAG	GGUCUUCGGA	CC..AGCGGC	GGACGGGUGA	98	Bb.lateros	
24	AUACAUGCAA	GUCGAGCGAG	GGUCUUCGGA	CCCUAGCGGC	GGACGGGUGA	73	Bb.latero3	
45	AUACAUGCAA	GUCGAGCGAG	GGUCUUCGGA	CCCUAGCGGC	GGACGGGUGA	94	Bb.latero4	
45	AUACAUGCAA	GUCGAGCGAG	GGUGUUCGGA	CCCUAGCGGC	GGACGGGUGA	94	Bb.latero2	
38	AUACAUGCAA	GUCGAGCGAG	GGUUUUCGGA	CCCUAGCGGC	GGACGGGUGA	87	JordA	
32	ATACATGCAA	GTCGAGCGAG	GGTTTTCGGA	CCCTAGCGGC	GGACGGGTGA	81	JordC	
33	ATACATGCAA	GTCGAGCGAG	GGTTTTCGGA	CCCTAGCGGC	GGACGGGTGA	82	JordD	

	101	111	121	131	141	150		
99	GUAACACGUA	GGCACCUGCC	UGUAAGACUG	GGUAUAACAUA	GGGAAACUUA	148	Bb.lateros	
74	GUAACACGUA	GGCACCUGCC	UGUAAGACUG	GGUAUAACAUA	GGGAAACUUA	123	Bb.latero3	
95	GUAACACGUA	GGCACCUGCC	UCUCAGACNG	GNAUAACAUA	GGGAAACUUA	144	Bb.latero4	
95	GUAACACGUA	GGCACCUGCC	UGUAAGACUG	GGUAUAACAUA	GGGAAACUUA	144	Bb.latero2	
88	GUAACACGUA	GGCACCUGCC	UGUAAGACUG	GGUAUAACAUA	GGGAAACUUA	137	JordA	
82	GTAACACGTA	GGCACCTGCC	TGTAAGACTG	GGATAACATA	GGGAAACTTA	131	JordC	
83	GTAACACGTA	GGCACCTGCC	TGTAAGACTG	GGATAACATA	GGGAAACTTA	132	JordD	
	151	161	171	181	191	200		
149	UGCUNAAUACC	GGAUAGGUUC	GCCUGAAGAA	AGAUGGCGCA	AGCUAUCACU	198	Bb.lateros	
124	UGCUNAAUACC	GGAUAGGUUC	GCCUGAAGAA	AGAUGGCGCA	AGCUAUCACU	173	Bb.latero3	
145	UGCUNAAUACC	GGAUAGGUUC	GCCUGANGAA	AGAUGGCGCA	NGCUAUCACU	194	Bb.latero4	
145	UGCUNAAUACC	GGAUAGGUUC	GCCUGAAGAA	AGAUGGCGCA	AGCUNUCACU	194	Bb.latero2	
138	UGCUNAAUACC	GGAUAGRUUY	GCAUGAAGAA	AGAUGGCGCA	AGCUAUCACU	187	JordA	
132	TGCTAATACC	GGATAGRITC	GCATGAAGAA	AGATGGCGCA	AGCTATCACT	181	JordC	
133	TGCTAATACC	GGATAGRITC	GCATGAAGAA	AGATGGCGCA	AGCTATCACT	182	JordD	
	201	211	221	231	241	250		
199	UACAGACUGG	GUU-CGGCGC	AUUAGCUAGU	UGGUGAGGUA	AUGGCUCACC	247	Bb.lateros	
174	UACAGAUGGG	CCUGCGGCGC	AUUAGCUAGU	UGGUGAGGUA	ANGGCUCACC	223	Bb.latero3	
195	UACAGAUGGG	CCUGCGGCGC	AUCAGCUAGU	UGGUGAGGUA	ACGGCUCACC	244	Bb.latero4	
195	UANANAUNGG	CCUNCGGCGC	AUUAGCUNGU	UNGUGAGGUA	ACNGCUCACC	244	Bb.latero2	
188	UGCAGAUGGG	CCUGCGGCGC	AUUAGCUAGU	UGGUGAGGUA	AAGGCUCACC	237	JordA	
182	TGCAGATGGG	CCTGCGGCGC	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	AAGGCTCACC	231	JordC	
183	TGCAGATGGG	CCTGCGGCGC	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	AAGGCTCACC	232	JordD	
	251	261	271	281	291	300		
248	AAGGCGACGA	UGCGUAGCCG	ACCUGAGAGG	GUGACCGGCC	ACACUGGGAC	297	Bb.lateros	
224	AAGGCGACGA	UGCGUAGCCG	ACCUGAGAGG	GUGACCGGCC	ACACUGGGAC	273	Bb.latero3	
245	AAGGCGACGA	UGCGUAGCCG	ACCUGAGAGG	GUGACCGGCC	ACACUGGGAC	294	Bb.latero4	
245	AAGGCGACGA	UGCGUAGCCG	ACCUGAGAGG	GUNACCGGCC	ACACUGGGAC	294	Bb.latero2	
238	AAGGCGACGA	UGCGUAGCCG	ACCUGAGAGG	GUGACCGGCC	ACACUGGGAC	287	JordA	
232	AAGGCGACGA	TGCGTAGCCG	ACCTGAGAGG	GTGACCGGCC	ACACTGGGAC	281	JordC	

233	AAGGCGACGA	TGCGTAGCCG	ACCTGAGAGG	GTGACCGGCC	ACACTGGGAC	282	JordD
	301	311	321	331	341	350	
298	UGAGACACGG	CCCAGACUCC	UACGGGAGGC	AGCAGUAGGG	AAUUUCCAC	347	Bb.lateros
274	UGAGACACGG	CCCAGACUCC	UACGGGAGGC	AGCAGUAGGG	AAUUUCCAC	323	Bb.latero3
295	UGAGACACGG	UCCAGACUCC	UACGGGAGGC	AGNAGUAGGG	AAUUUCCAC	344	Bb.latero4
295	UGAGACACGG	CCNAGACUCC	UACGGGAGGC	AGCAGUAGGG	AAUNUCCAC	344	Bb.latero2
288	UGAGACACGG	CCCAGACUCC	UACGGGAGGC	AGCAGUAGGG	AAUUUCCAC	337	JordA
282	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATTTTCCAC	331	JordC
283	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATTTTCCAC	332	JordD
	351	361	371	381	391	400	
348	AAUGGACGAA	AGUCUGAUGG	AGCAACGCCG	CGUGAACGAU	GAAGGCUUUC	397	Bb.lateros
324	AAUGGACGAA	AGUCUGAUGG	AGCAACGCCG	CGUGAACGAU	GAAGGCUUUC	373	Bb.latero3
345	AAUGGACGAA	AGUCUGAUGG	AGCAACGCCG	CGUGAACGAU	GAAGGCUUUC	394	Bb.latero4
345	AAUGGACGAA	AGUCUGAUGG	AGCAACGCCG	CGUGAACGAU	GAAGGCUUUC	394	Bb.latero2
338	AAUGGACGAA	AGUCUGAUGG	AGCAACGCCG	CGUGAACGAU	GAAGGCUUUC	387	JordA
332	AATGGACGAA	AGTCTGATGG	AGCAACGCCG	CGTGAACGAT	GAAGGCTTTC	381	JordC
333	AATGGACGAA	AGTCTGATGG	AGCAACGCCG	CGTGAACGAT	GAAGGCTTTC	382	JordD
	401	411	421	431	441	450	
398	GGGUCGUAAA	GUUCUGUUGU	UAGGGAAGAA	CAGUGCUAUU	AAAUAGGUAG	447	Bb.lateros
374	GGGUCGUAAA	GUUCUGUUGU	UAGGGAAGAA	CAGUGCUAUU	AAAUAGGUAG	423	Bb.latero3
395	GGGUCGUAAA	GUUCUGUUGU	UAGNGAAGAA	CAGUGCUAUU	AAAUAGGUAG	444	Bb.latero4
395	GGGUCGUAAA	GUUCUGUUGU	UAGGGAAGAA	CAGUGCUNUN	AAAUAGGUAG	444	Bb.latero2
388	GGGUCGUAAA	GUUCUGUUGU	UAGGGAAGAA	CAGUGCCAUU	RAAUAGAUGG	437	JordA
382	GGGTCGTAAA	GTTCTGTTGT	TAGGGAAGAA	CAGTGCCATT	RAATAGATGG	431	JordC
383	GGGTCGTAAA	GTTCTGTTGT	TAGGGAAGAA	CAGTGCCATT	RAATAGATGG	432	JordD
	451	461	471	481	491	500	
448	CACCUUGACG	GUACCUAACG	AGAAAGCCAC	GGCUAACUAC	GUGCCAGCAG	497	Bb.lateros
424	CACCUUGACG	GUACCUAACG	AGAAAGCCAC	GGCUAACUAC	GUGCCAGCAG	473	Bb.latero3
445	CACCUUGACG	GUACCUAACG	AGAAAGNCAC	GGCUAACUAC	GUGCCAGCAG	494	Bb.latero4
445	CACCUNNACG	GUACCUNACG	AGAAAGCCAC	GGCUNACUAC	GUGCCAGCAG	494	Bb.latero2

438	CGCCUUGACG	GUACCUAACG	AGAAAGCCAC	GGCUAACUAC	.....	477	JordA
432	CGCCTTGACG	GTACCTAACG	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	.....	471	JordC
433	CGCCTTGACG	GTACCTAACG	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	.....	472	JordD

#### 8.4 Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen des Isolates , JordB mit vergleichbaren Sequenzen aus der ARB-Datenbank

	1	11	21	31	41	50	
1	AGAGUUUGAU	CCUGGCUCAG	GACGAACGCU	GGCGGCGUGC	CUAAUACAUG	50	B.licheni2
1	.....	..TGGCTCAG	GACGAACGCT	GGCGGCGTGC	CTAATACATG	38	JordB
	51	61	71	81	91	100	
51	CAAGUCGAGC	GGACGGGAGC	UUGCUCCCGU	CAGCGGCGGA	CGGGUGAGUA	100	B.licheni2
39	CAAGTCGAGC	GGACGGGAGC	TTGCTCCCGT	CAGCGGCGGA	CGGGTGAGTA	88	JordB
	101	111	121	131	141	150	
101	ACACGUGGGU	ACCUGCCUGU	AAGACUGGGA	UAACUCCGGG	AAACCGGGGC	150	B.licheni2
89	ACACGTGGGT	ACCTGCCTGT	AAGACTGGGA	TAACTCCGGG	AAACCGGGGC	138	JordB
	151	161	171	181	191	200	
151	UAAUACCGGA	UGCUACCGCA	UGGUAAAAGG	UGGCUUUUAG	CUACCACUUA	200	B.licheni2
139	TAATACCGGA	TGCTACCGCA	TGGTAAAAGG	CGGCT-TCGG	CTGCCRCTTA	187	JordB
	201	211	221	231	241	250	
201	CAGAUGGACC	CGCGGCGCAU	UAGCUAGUUG	GUGAGGUAAC	GGCUCACCAA	250	B.licheni2
188	CAGATGGACC	CGCGGCGCAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA	237	JordB
	251	261	271	281	291	300	
251	GGCGACGAUG	CGUAGCCGAC	CUGAGAGGGU	GAUCGGCCAC	ACUGGGACUG	300	B.licheni2
238	GGCGACGATG	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	GATCGGCCAC	ACTGGGACTG	287	JordB

	301	311	321	331	341	350	
301	AGACACGGCC	CAGACUCCUA	CGGGAGGCAG	CAGUAGGGAA	UCUUCCGCAA	350	B.licheni2
288	AGACACGGCC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCGCAA	337	JordB
	351	361	371	381	391	400	
351	UGGACGAAAG	UCUGACGGAG	CAACGCCGCG	UGAGUGAUGA	AGGUUUUCGG	400	B.licheni2
338	TGGACGAAAG	TCTGACGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGTTTTTCGG	387	JordB
	401	411	421	431	441	450	
401	AUCGUAAAAC	UCUGUUGUUA	GGGAAGAAAA	GUACCGUUGA	AUAGGCGGUA	450	B.licheni2
388	ATCGTAAAAC	TCTGTTGTTA	GGGAAGAAAC	GTACCGTTGA	AYAGGCGGTA	437	JordB
	451	461	471	481	491	500	
451	CCUUGACGGU	ACCUAACCAG	AAAGCCACGG	CUAACUACGU	GCCAGCAGCC	500	B.licheni2
438	CCTTGACGGT	ACCTAACCAG	AAAGCCACGG	CTAACTAC..	.....	475	JordB

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1997 bis Dezember 2000 am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München in Weihenstephan durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel, für die Übertragung des Themas und der Arbeitsmöglichkeit an seinem Lehrstuhl, für die freundliche Unterstützung, und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Dr. rer. nat. Martin L. Niessen und alle Kollegen der Arbeitsgruppe „Pilze“ für deren freundschaftliche Zusammenarbeit, deren ständige Diskussionsbereitschaft und die oft notwendige konstruktive Kritik.

Dr. rer. nat. Walther von der Bundesanstalt für Saatzucht/Resistenzgenetik, Grünbach für die Bereitstellung des natürlich infizierten Probenmaterials (Gerste und Weizen).

Bettina Schiffer für die nie endende Unterstützung während der Zeit der aktiven Labortätigkeit und vor allem für Ihren unermüdlichen Eifer diese Arbeit zu korrigieren.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für die praktische Unterstützung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die Geduld, mich in der thematischen oder örtlichen Nähe, mit meinen fachlichen und menschlichen Freuden und Problemen anzunehmen.

IHR SEID,

mein Anfang, meine Kraft, meine Ausdauer, mein Ehrgeiz, mein Atem, meine Ideen, meine Stützräder, mein Weg...

Mom, Dad, Kerstin, Bettina, Ruth, David, Marcus, Cräcker, Ute, Rainer, Heidrun, Immel, Helge, Martin, Georg, Sandra, Ellen, Pia, Bodo, Caro, Pascal, Karl, Gisela, Frank, Matthias, Katja, Juliana, Melanie, Jutta, Hannes, Klotzi, Steffi, Silke