

**Charakterisierung von Biofilmen und
Untersuchung des pilzlichen
Biofilmwachstums am Beispiel von *Fusarium
oxysporum***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Julia Zoller

aus

Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Geisen

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2013

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung von Biofilmen und Untersuchung des pilzlichen Biofilmwachstums am Beispiel von *Fusarium oxysporum*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, sowie mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich gekennzeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Weiterhin habe ich die Satzungen zur guten wissenschaftlichen Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 und der Universität Karlsruhe (TH) vom 15. Januar 2002 beachtet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Neuburg, den 04.03.2013

Julia Zoller

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis Dezember 2012 in der Abteilung Mikrobiologie des Instituts für Angewandte Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Biofilme – die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen.....	2
2.1.1	Biofilme sind in der Umwelt unverzichtbar.....	4
2.1.2	Negativer Einfluss von Biofilmen auf Umwelt, Mensch und Wirtschaft.....	4
2.1.3	Bakterien im Biofilm.....	6
2.1.4	Filamentöse Pilze im Biofilm.....	8
2.2	Der Modellorganismus <i>Fusarium oxysporum</i> im Biofilm.....	10
2.3	Stressgene werden im Biofilm vermehrt exprimiert.....	12
2.4	Der Modellorganismus <i>Aspergillus nidulans</i> im Biofilm.....	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Charakterisierung von Biofilmen.....	15
3.1.1	Charakterisierung von Pilzen in nativen Biofilmen.....	15
3.1.1.1	In Biofilmen aus natürlichen Habitaten gibt es wenig Pilze.....	15
3.1.1.2	Etablierung eines Biofilmassays.....	17
3.1.1.3	Reproduktion eines Biofilms auf Glas in einem natürlichen Habitat.....	19
3.1.1.4	Räumliche Verteilung der Mikroorganismen im Biofilm.....	20
3.1.1.5	Vergleich natürlicher mit auf Glas gezüchteten Biofilmen.....	21
3.1.2	Charakterisierung von Biofilmen aus einem künstlichen Habitat.....	24
3.1.2.1	Große Diversität in Biofilmen der Kläranlage.....	24
3.1.2.2	Biofilmbildung auf Glasoberflächen.....	28
3.1.2.3	Räumliche Verteilung der Mikroorganismen im Biofilm.....	29
3.1.2.4	Populationszusammensetzung der Biofilme aus der Kläranlage.....	30
3.1.3	Charakterisierung von Bakterien in Biofilmen.....	32
3.1.3.1	Die Diversität von Bakterien im Biofilm ist groß.....	32
3.1.3.2	Bakterien können neue Biofilme auf Glas bilden.....	35
3.1.3.3	Vergleich der Bakterienpopulation zwischen den Biofilmen.....	38
3.2	Untersuchung des Biofilmwachstums am Beispiel von <i>A. nidulans</i> und <i>F.oxysporum</i>	40
3.2.1	<i>A. nidulans</i> kann einen Biofilm bilden.....	40
3.2.2	Untersuchung des Biofilms anhand von <i>F. oxysporum</i>	42
3.2.2.1	<i>F. oxysporum</i> kann einen Biofilm auf Glasoberflächen bilden.....	42
3.2.2.2	Der pH-Wert beeinträchtigt die Biofilmbildung.....	48
3.2.3	Stressgene in <i>F. oxysporum</i>	50

3.2.3.1	Die Histidin-Kinase Fhk1	50
3.2.3.2	Der pH-Response Transkriptionsfaktor PacC.....	53
3.2.3.3	Der pH-Response Transkriptionsfaktor PalA	55
3.2.3.4	Der pH-Response Regulator PalC.....	55
3.2.3.5	Der Response Regulator FOXG_6549	55
3.2.3.6	Veränderte Expression von Stressgenen im Biofilm.....	55
3.2.3.7	Expression von Stressgenen bei unterschiedlichen pH-Werten	57
3.2.4	Bakterien beeinflussen die Biofilmbildung von <i>F. oxysporum</i>	59
3.2.5	Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf die Biofilmbildung.....	62
3.2.6	Einfluss verschiedener Gene auf die Biofilmbildung	66
3.2.6.1	Die MAP Kinase Fmk1.....	66
3.2.6.2	Der Transkriptionsfaktor Ste12.....	68
3.2.6.3	Das Membran Mucin Msb2.....	71
3.2.6.4	Fso1 ist essentiell für die Hyphenfusion	72
3.2.6.5	Die Deletion dieser Gene beeinflusst die Biofilmbildung.....	74
4	Diskussion	80
4.1	Charakterisierung von Pilzen in Biofilmen.....	80
4.1.1	Geringe Diversität in natürlichen Habitaten.....	80
4.1.2	Die Diversität von Pilzen in künstlichen Habitaten ist groß	81
4.2	Charakterisierung der Bakterienpopulation in Biofilmen	84
4.3	<i>A. nidulans</i> kann im Biofilm wachsen.....	86
4.4	Untersuchung der Biofilmbildung anhand von <i>F. oxysporum</i>	87
4.5	Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf die Biofilmbildung	95
5	Material und Methoden	98
5.1	Chemikalien	98
5.2	Verwendete Stämme	98
5.3	Kultivierung der Organismen	100
5.4	Molekularbiologische Methoden.....	103
5.4.1	Verwendete Plasmide	103
5.4.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	105
5.4.2.1	Plasmid-Minipräparation.....	105
5.4.2.2	Plasmid-Midipräparation.....	105
5.4.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>F. oxysporum</i>	106
5.4.4	Restriktion von DNA	106

5.4.5	Gelelektrophorese, Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ...	107
5.4.6	Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE)	107
5.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR); Herstellung DIG-markierter Sonden	108
5.4.8	Colony-PCR.....	110
5.4.9	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	110
5.4.10	Herstellung von Deletionskonstrukten.....	110
5.4.11	Transformation von <i>E. coli</i>	111
5.4.12	Protoplastentransformation von <i>F. oxysporum</i>	112
5.4.13	Protoplastentransformation von <i>A. nidulans</i>	113
5.4.14	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot).....	115
5.4.15	Isolierung von RNA aus <i>F. oxysporum</i>	117
5.4.16	Quantitative <i>Real Time</i> PCR	118
5.5	Biofilme und Abwasser	119
5.5.1	Native Biofilme – Nährstoffreich.....	119
5.5.2	Native Biofilme – Nährstoffarm	119
5.5.3	Biofilmzüchtung	120
5.5.4	Quantifizierung eines Biofilms anhand des Fluoreszenzsignals	121
5.5.5	Mikrotiterscreening-Assay mit Resazurin.....	122
5.5.6	Biofilmmedien	123
5.6	Mikroskopische Methoden	124
5.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	124
5.6.2	Calcofluor-Färbung.....	124
5.6.3	Hoechst-Färbung.....	124
5.6.4	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	124
6	Literaturverzeichnis	126
7	Anhang.....	142
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	142
7.2	Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	143
7.3	Lebenslauf	144
7.4	Danksagung.....	145

1 Zusammenfassung

Biofilme sind in der Natur und in der Medizin von großer Bedeutung. Sie entstehen, wenn Mikroorganismen sich an einer Grenzfläche ansiedeln. Man findet sie primär in der Umwelt, jedoch kommen sie auch auf und in Pflanzen, Menschen und Tieren vor. Teilweise stellen Biofilme ein großes Problem dar, vor allem in der Medizin, wo jährlich ca. 5000 Menschen an einer Infektion von Implantaten durch Biofilmbewuchs sterben. Während die bakterielle Zusammensetzung von Biofilmen bereits sehr gut untersucht ist, ist das Wissen über filamentöse Pilze in Biofilmen eher gering, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Pilzpopulation in Biofilmen analysiert wurde.

Ziel dieser Arbeit war es, mehr über die Diversität von Pilzen in Biofilmen zu erfahren und das Biofilmwachstum anhand eines filamentösen Pilzes zu untersuchen. Es wurden Biofilme aus natürlichen und künstlichen Habitaten untersucht. Zum einen wurden sie molekularbiologisch mit Hilfe von Klonbibliotheken und Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) untersucht und zum anderen mikroskopisch mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Es konnte eine Vielzahl unterschiedlicher, teilweise typischer Biofilmpilze, wie *Candida tropicalis* und *Saccharomyces cerevisiae*, in den verschiedenen Biofilmen nachgewiesen werden, wobei viele anhand ihrer ITS-Sequenz keiner Art zuzuordnen waren. Über die Anpassung von filamentösen Pilzen an das Wachstum im Biofilm ist noch nicht viel bekannt, weshalb das Biofilmwachstum am Beispiel von *Aspergillus nidulans* und *Fusarium oxysporum* analysiert werden sollte. Da *A. nidulans* im Biofilm nur relativ langsam wächst, wurde *F. oxysporum* als Beispiel für die Untersuchung des Biofilmwachstums ausgewählt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Pilz schon nach wenigen Stunden Biofilme auf einer Glasoberfläche und Polystyren ausbildet. Die Anwesenheit von *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* beeinflusst die Biofilmbildung von *F. oxysporum*, dessen Wachstum der Sporen verhindert wird. Stressgene werden im Biofilm vermehrt exprimiert, die pH-Transkriptionsfaktoren PalA und PacC sind im Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum um das 15- bzw. 30-fache erhöht. Bei der Wirkung von antimikrobiellen Substanzen auf die *F. oxysporum* Biofilmbildung konnte bei Zugabe des antimikrobiellen Peptids Sub5, kein Biofilm ausgebildet werden.

2 Einleitung

2.1 Biofilme – die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen

In unserer Umwelt sind Biofilme ubiquitär verbreitet und stellen die wahrscheinlich häufigste Form mikrobiellen Lebens dar. Der größte Teil der Mikroorganismen auf der Erde (99%) lebt in Biofilmen (Costerton *et al.* 1987). Unter geeigneten Bedingungen besiedeln sie nahezu alle Oberflächen, da die Voraussetzungen für die Ausbildung eines Biofilms eher gering sind. Sobald Grenzflächen, Mikroorganismen, reichlich Nährstoffe und hinreichend Feuchtigkeit vorhanden sind, wird diese von einem Biofilm besiedelt (Flemming, 1991). In Abbildung 1 sind verschiedene Habitats gezeigt, in denen Biofilme vorkommen können. Biofilme können nicht nur an Grenzflächen zwischen Wasser und festen Untergründen entstehen, sondern auch zwischen Wasser und Luft sowie zwischen einem festen Untergrund und der Atmosphäre, also auf Gestein oder Gebäuden (Flemming & Wingender, 2001). Folglich können auch eher lebensfeindliche und extreme Lebensräume, wie zum Beispiel heiße Quellen, besiedelt werden (Kulp *et al.* 2008).



Abbildung 1: Biofilme sind eine erfolgreiche Lebensform von Mikroorganismen. Sie haben einen großen Einfluss auf die menschliche Gesundheit, die Umwelt und technische Systeme.

Biofilme sind strukturierte Gemeinschaften von Mikroorganismen, die aneinander und/oder an einer Oberfläche oder Grenzfläche anhaften. Sie sind in eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingelagert (Costerton *et al.* 1995). Bestandteile der EPS, sind Polysaccharide, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und teilweise auch Huminstoffe (Wingender *et*

*al.*1999). Ein Vorteil von Biofilmwachstum gegenüber freilebendem Wachstum, ist der erhöhte Schutz gegenüber antimikrobiellen Reagenzien. Bakterien und Pilze sind im Biofilm bis zu 1000-fach weniger anfällig gegen Antimikrobiotika, als frei lebende Organismen (Ramage *et al.* 2001; Di Bonaventura *et al.* 2006). Verantwortlich dafür sind die Komplexität des Biofilms, die erhöhte Zelldichte, die physiologische Zellbeschaffenheit und die differentielle Genexpression in Biofilmen, im Vergleich zu planktonischen Zellen (Baillie & Douglas, 1998; 2000; Ramage *et al.* 2002; Perumal *et al.* 2007). Die Architektur des Biofilms und die Präsenz von extrazellulären Substanzen reduziert wahrscheinlich das Eindringen der Fungizide und Antibiotika (Baillie & Douglas, 2000).

Mikroorganismen durchleben große Veränderungen während des Wechsels von planktonischem, also frei lebendem Wachstum, zum Biofilmwachstum, in dem die Zellen in einer an eine Oberfläche angehefteten Gemeinschaft leben (O'Toole *et al.* 2000). Kurz nach der Anheftung eines Bakteriums an eine Oberfläche, kommt es zur Veränderung der Genaktivität und somit zur Veränderung der Zellstruktur und der Stoffwechselaktivität (Flemming & Wingender, 2001). Der Übergang zur sessilen Lebensweise wird als ein komplexer und hoch regulierter Komplex angesehen, in dem die Bakterien einen biofilmspezifischen Phänotyp annehmen und schon nach kurzer Zeit der Anhaftung deutlich veränderte Eigenschaften ausweisen (O'Toole *et al.* 2000).

Die erste schriftliche Belegung über das Vorkommen von Biofilmen ist laut O'TOOLE eine Publikation aus dem Jahre 1933 von HENRICI, in der es heißt „Es ist ganz offensichtlich, dass in den meisten Fällen Bakterien im Wasser nicht freischwebend vorkommen, sondern auf im Wasser befindlichen Oberflächen wachsen“ (Henrici zitiert in O'Toole *et al.* 2000). Darüber hinaus wurde der Anwuchs von Mikroorganismen an der Oberfläche von Schiffen in der marinen Umwelt schon einige Jahre früher wahrgenommen und beschrieben (Angst, 1923). Laut SCHOPF stammen die ersten bekannten Funde von versteinerten Biofilmen in Stromatolithen von vor 3,5 Milliarden Jahren, die in Südafrika und Australien gefunden wurden (Schopf *et al.* 1983). Vor etwa 2,9 Milliarden Jahren haben sich photosynthetische Cyanobakterien gebildet, welche sich als mikrobieller Bewuchs von Oberflächen, sogenannten „microbial mats“ entwickelten. Ihre photosynthetische Aktivität wird für die Sauerstoffentwicklung in der bis dahin anaeroben Erdatmosphäre verantwortlich gemacht (Ward *et al.* 1989).

Obwohl die Biofilmbildung schon vor 100 Jahren beobachtet und wissenschaftlich untersucht wurde, fangen wir erst jetzt damit an, diesen Prozess auf der molekularen Ebene zu verstehen (O'Toole *et al.* 2000).

Es wurde gezeigt, dass die meisten Mikroorganismen in ihrem natürlichen Ökosystem als Biofilm und nicht als planktonische Zellen vorkommen und diese für über 65% der mikrobiellen Infektionen im Mensch verantwortlich sind (Donlan, 2002).

2.1.1 Biofilme sind in der Umwelt unverzichtbar

Biofilme können nicht nur Schäden anrichten, sondern auch nützlich sein. Vor allem in der Natur, in Böden, Sedimenten und Gewässern sind Biofilme an Selbstreinigungsprozessen entscheidend beteiligt und werden als „Mikrokonsortien“ bezeichnet. Durch die Anheftung an eine Oberfläche und die daraus folgende Entstehung verschiedener Lebensräume auf kleinstem Raum werden mikrobielle Umsetzungen von organischen und anorganischen Verbindungen erleichtert, die in Suspension nicht oder viel langsamer stattfinden (Flemming & Wingender, 2002). Diese Eigenschaft wird beispielsweise in Batch-Biofilm-Reaktoren zur Abwasserreinigung genutzt (Rodgers *et al.* 2006). Biofilme werden auch in der Industrie zur Produktion von verschiedenen Substanzen angewendet. Die EPS, die von den Mikroorganismen im Biofilm gebildet wird, wird heutzutage in großem Umfang biotechnologisch gewonnen und eingesetzt und zum Beispiel als Biotenside, Zusatzstoffe in Nahrungsmitteln und mittlerweile auch als Klebstoff verwendet (Flemming & Wingender, 2002).

2.1.2 Negativer Einfluss von Biofilmen auf Umwelt, Mensch und Wirtschaft

Die unerwünschte Bildung von Biofilmen nennt man *Biofouling* (Bixler & Bhushan, 2012). *Biofouling* ist in der Medizin, in der Industrie und in aquatischen Ökosystemen sehr weit verbreitet, was zu erheblichen Problemen im Zusammenhang mit gesundheitlichen Risiken, Auswirkungen auf die Umwelt und zu finanziellen Verlusten führt (Walker *et al.* 2000; Railkin, 2004; Hellio & Yebra, 2009).

In der Medizin stellt die Biofilmbildung ein sehr großes Problem dar (siehe Abbildung 2). Katheters sind die am häufigsten verwendeten medizinischen Vorrichtungen und die zweithäufigste Ursache von Infektionen im Menschen (Chan & Wong, 2010). Schätzungen zeigen, dass ca. 10% aller Patienten im Krankenhaus eine Infektion von einem klinischen Implantat, wie ein Harnröhren-Katheter, Trachealtubus

oder Gefäßkatheter davontragen und Infolge dieser Infektion jährlich mehr als 5000 Patienten sterben (Shirliff & Leid, 2009). Mehr als 45% der Krankenhausinfektionen sind auf Biofilm-verunreinigte medizinische Geräte zurückzuführen (Bixler & Bhushan, 2012). Ein weiteres Problem in der Medizin ist die Resistenz von Biofilmen gegenüber Antibiotika, was zu Schwierigkeiten bei der Behandlung von Biofilm-induzierten Erkrankungen wie beispielsweise Mukoviszidose führt (Monroe, 2007). Auch im Mund werden Biofilme gebildet, wie beispielsweise der Plaque auf den Zähnen, was zur Entstehung von Karies und Parodontitis führt (Zijngel *et al.* 2010).

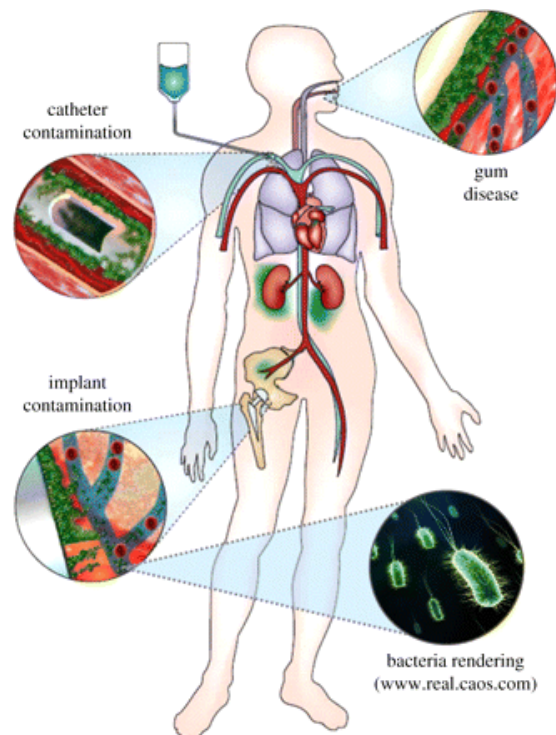


Abbildung 2 : Schematische Hervorhebung von Bereichen des Körpers, die besonders anfällig für infektiöse Biofilmbildung sind. Biofilme können Katheter und Implantate befallen, ebenso kann das Zahnfleisch befallen werden. (Bixler & Bhushan, 2012)

In aquatischen Ökosystemen spielt die Biofilmbildung ebenfalls eine große Rolle. Mikroorganismen, Algen und Seepocken besiedeln Schiffe, Bojen, Ölplattformen und Anlegestellen (Fingerman *et al.* 1999). Die am häufigsten auftretenden Biofilmbildner sind die Alge *Ulva australis* und die Braunalge *Ectocarpus* (Callow, 1986). *Biofouling* reduziert die Geschwindigkeit der Schiffe aufgrund des zusätzlichen Widerstands, was den Kraftstoffverbrauch und die Motorbeanspruchung erhöht. Im Jahr 1981 verbrauchte die US-Marine 18 Millionen Barrel Treibstoff, hiervon waren 3,3 Millionen Barrel auf den erhöhten Widerstand

durch das Biofilmwachstum zurückzuführen (Railkin, 2004; Jones, 2009). Ein Biofilm, der 1 mm dick auf einem Schiffsrumpf angelagert ist, erhöht den Widerstand um 80%, was wiederum zu einem Geschwindigkeitsverlust von 15% führt (Gordon & Mawatari, 1992).

In der Industrie reicht das Spektrum der unerwünschten Biofilmbildung von großen Industrieanlagen, wie Atomkraftwerke bis hin zur Lebensmittelherstellung (Walker, 2000). Auch hier erhöht der Befall mit Biofilmen die Reibung und somit den Energiebedarf. Des Weiteren entstehen Druckverluste in den Versorgungsleitungen was zu einer Abnahme der wärmeübertragenden Effizienz führt (Camper & McFeters, 2000).

In Biofilmen können auch gefährliche, pathogene Mikroorganismen vorkommen, die ins Trinkwasser gelangen können (Lebret *et al.* 2009). Die Leitungen der Trinkwasserversorgung, sogar Edelstahlrohre mit Reinstwasser, sind anfällig für den Biofilmbefall. Studien von Trinkwassernetzwerken haben gezeigt, dass der größte Teil der Biomasse an den Rohroberflächen in einem Biofilm vorkommt. Dieser beeinflusst die Wasserqualität und die Wartungskosten des Versorgungsnetzes werden erhöht (van der Wende & Characklis, 1990). Mikroorganismen, eingeleitet durch Biofilme, können darin wachsen und somit zur Beeinträchtigung der Wasserqualität, bis hin zur Erkrankung von Mensch und Tier führen (Camper & McFeters, 2000).

Biofilme spielen eine wichtige Rolle in unserer Umwelt. Zum einen sind sie ein wesentlicher Bestandteil der natürlichen Umwelt und zum Beispiel für die Trinkwasser- oder Abwasseraufbereitung notwendig. Und zum anderen führen Biofilme zu einem erhöhten Gesundheitsrisiko und können zu Problemen und finanziellen Einbußen in der Medizin, in der Schifffahrt und der Industrie führen. Deshalb ist es nötig, mehr über die Entstehung und die Struktur von Biofilmen zu erfahren.

2.1.3 Bakterien im Biofilm

Bakterien bevorzugen die sessile Lebensweise im Vergleich zum planktonischen Wachstum. Bisher konnte noch keine Bakterienart beobachtet werden, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nur in planktonischer Form vorkommt (Christensen, 1989; Carpentier & Cerf, 1993).

Die Entstehung eines Biofilms lässt sich nach Sauer, 2003 in fünf Phasen einteilen (siehe Abbildung 3). In der ersten Phase, die auch als **Adsorptionsphase** bezeichnet wird, wird die Oberfläche eines Substrats in einer feuchten Umgebung, sowie auf und in Lebewesen, mit einem Basisfilm bedeckt. An diesen Basisfilm sind organische Stoffe, zum Beispiel bakterielle Stoffwechselprodukte, adsorptiv gebunden, jedoch sind die Bakterien nur von wenig exopolymeren Material umgeben und können die Oberfläche wieder verlassen und zurück zum planktonischen Wachstum kehren (Stoodley *et al.* 2002). Anschließend folgt die **Adhäsionsphase** bei der sich vermehrt EPS-produzierende Bakterien reversibel auf dem Substrat ansiedeln und ihre Flagellen verlieren. In Phase drei, der **Reifung I**, wachsen und vermehren sich die Bakterien, wobei das Wachstum zuerst flächig beginnt und schließlich eine dreidimensionale Struktur annimmt. In Phase vier, **der Reifung II**, siedeln sich auch andere Organismen wie Pilze, Algen und Protozoen an, die die organischen Stoffe als Nahrung nutzen (Flemming & Wingender, 2001). Der Biofilm ist nun vollständig entwickelt und komplex. Die Mikroorganismen kommunizieren untereinander über das sogenannte „Quorum sensing“. Bakterien, die über dieses System verfügen, produzieren chemische Signale, über die sie die Umgebung „wahrnehmen“ können (Waters *et al.* 2005). Auch einige Pilze wie zum Beispiel *Candida albicans*, sind mit diesem System ausgestattet (Hogan *et al.* 2006). Aufgrund der möglichen Kommunikation, können diese Mikroorganismen Prozesse besser koordinieren bei denen es ineffizient wäre, wenn sie nur von einem Bakterium betrieben würden, wie die hier beschriebene Biofilmbildung. Steigt die Konzentration an diesen chemischen Signalen, so befinden sich in der Umgebung eine große Anzahl an Bakterien und der Organismus kann dementsprechend seine Genexpression regulieren (Costerton *et al.* 1999). Zuletzt folgt die **Verbreitungsphase**, bei der sich Zuwachs und Abbau im Gleichgewicht befinden.

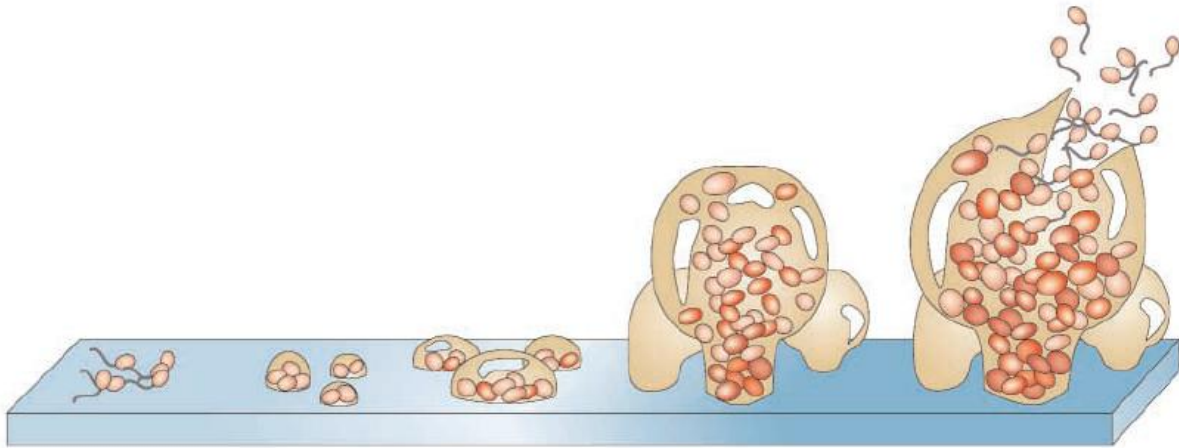


Abbildung 3: Fünf Phasen der Biofilmentwicklung von Bakterien. Die Biofilmmaturation ist ein komplexer Entwicklungsprozess, der verschiedene Stufen umfasst. **(I) Adsorption**, Anlagerung von einzelnen Zellen an eine Oberfläche. **(II) Adhäsion**, Exopolysaccharide werden von den Bakterien gebildet. **(III) Reifung I**, die Zellen vermehren sich, es werden vermehrt Exopolysaccharide gebildet. **(IV) Reifung II**, die Kolonien haben ihre maximale Dicke erreicht, es bilden sich Wasserkanäle. **(V) Verbreitung**, planktonische Zellen lösen sich vom Biofilm. (Davies, 2003; Harding *et al.* 2009)

2.1.4 Filamentöse Pilze im Biofilm

Pilzliche Biofilme werden immer mehr zu einem bedeutenden klinischen Problem, welches mit hohen Sterberaten, vor allem bei immungeschwächten Menschen, verbunden ist. Da Pilze zu den Eukaryoten zählen und somit komplexer als Bakterien sind, sind durch sie verursachte Infektionen oft nur schwer zu diagnostizieren und zu behandeln (Ramage *et al.* 2009).

Pilze sind durch ihre adsorptive Ernährungsweise, ihre Sekretion von extrazellulären Enzymen, welche komplexe Moleküle verdauen können, und durch ihr Spitzenwachstum besonders für das Wachstum auf Oberflächen geeignet. Durch den Besitz dieser Eigenschaften, sind Pilze gute Kandidaten für das Wachstum in Biofilmen, worüber jedoch noch nicht viel bekannt ist (Harding *et al.* 2009). Dies liegt mitunter daran, dass viele der im Biofilm wachsenden Pilze für genetische Anwendungen nicht geeignet sind (O'Toole *et al.* 2000). Allerdings weiß man einiges über Hefepilze, wie beispielsweise den humanpathogenen Pilz *Candida albicans*, welcher Biofilme auf Implantaten, wie Herzschrittmachern und Kathetern bilden kann (Donlan, 2001). Auch über die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae* und deren Biofilmwachstum ist bereits einiges erforscht (Reynolds & Fink, 2001).

Anhand schon vorhandener Daten über die Biofilmbildung verschiedener Pilze wie beispielsweise *Aspergillus niger* (Villena & Gutierrez-Correa, 2003) und *Fusarium oxysporum* (Imamura *et al.* 2008), welche mittels konfokaler Laserrastermikroskopie untersucht wurden und aus bereits vorhandenen Bakterien- und Hefe- Modellen wurde folgendes Modell nach Harding *et al.* 2009 für die Biofilmbildung von filamentösen Pilzen erstellt. Die Entwicklung eines Biofilms wird in sechs verschiedenen Stufen eingeteilt (siehe Abbildung4). In der ersten Stufe, der **Sporensorption**, heften sich Sporen, Hyphenfragmente und Sporangien an eine Oberfläche an. Es entsteht ein physikalischer Kontakt von einem Organismus mit einer Oberfläche und ist vergleichbar mit der reversiblen Anheftung im Bakterien-Modell. Stufe zwei ist die **Adhäsion**. Diese Stufe ist vergleichbar mit der fixierten Anheftung von Bakterien. Bei filamentösen Pilzen werden in dieser Stufe oft anhaftende Substanzen von keimenden Sporen und aktiven Hyphen sekretiert. Anschließend folgt die **Mikrokolonie Bildung I**, als dritte Stufe. Dies ist das Anfangsstadium des Wachstums und der Oberflächenbesiedlung der Pilze. Die Hyphen wachsen, verzweigen sich und erforschen das Substrat. Die verzweigten Hyphen bilden einen *Monolayer* und werden invasiv. In dieser Phase wird die polymere extrazelluläre Matrix gebildet, welche es der wachsenden Kolonie ermöglicht, sich am Substrat anzuhafte. Phase vier ist die **Mikrokolonie Bildung II**. In dieser Phase werden ein kompaktes Hyphennetzwerk und Hyphen-Hyphen-Interaktionen gebildet. Es formen sich Wasserkanäle über hydrophobe Repulsion zwischen Hyphen oder Hyphenbündeln. Die Hyphenbündel sind miteinander durch die exopolymere Matrix „verklebt“. In der fünften Phase, der **Reifung**, werden Fruchtkörper, sporenhaltige Zellen, Sklerotien und andere Überlebensstrukturen gebildet. Die Pilze wachsen nun auch in die Luft. Die sechste und letzte Phase in der Biofilmbildung von filamentösen Pilzen, ist die **Verteilung oder planktonische Phase**. Hier werden Sporen oder Biofilmfragmente abgegeben und verbreitet. Die abgelösten Zellen können so den Kreislauf von vorne starten und einen neuen Biofilm bilden (Harding *et al.* 2009). Dies geschieht insbesondere, wenn nicht mehr genügend Nährstoffe vorhanden sind (O'Toole *et al.* 2000).

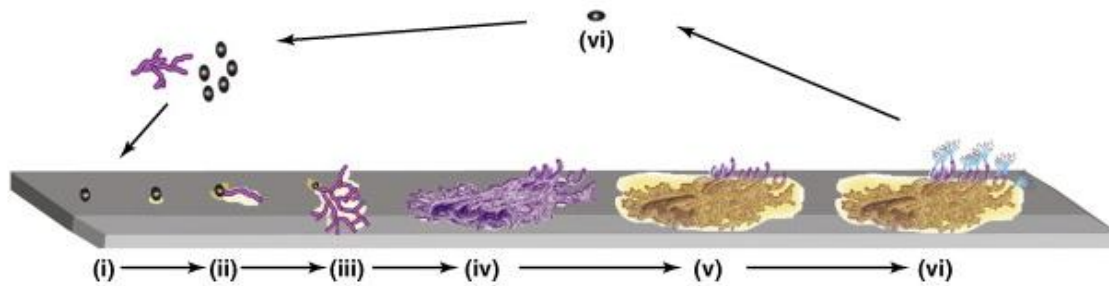


Abbildung4: Modell der Biofilmentwicklung von Pilzen. (I) Sporenadsorption, erste Anlagerung von Sporen an eine Oberfläche. **(II) Adhäsion**, aktives Anheften an eine Oberfläche. **(III) Mikrokolonie Bildung I**, die Zellen bilden einen *Monolayer*. **(IV) Mikrokolonie Bildung II**, ein kompaktes Hyphennetzwerk entwickelt sich. **(V) Reifung**, Überlebensstrukturen werden gebildet. **(VI) Verteilung oder planktonische Phase**, Sporen werden in die Umwelt abgegeben. (Harding *et al.* 2009)

2.2 Der Modellorganismus *Fusarium oxysporum* im Biofilm

Fusarium oxysporum ist ein ubiquitär verbreiteter, bodenbürtiger Ascomycet, welcher die Fusariumwelke bei mehr als 100 verschiedenen Pflanzenarten, wie beispielsweise der Tomate, auslöst (Gordon & Martyn, 1997). Für immungeschwächte Menschen kann er gefährlich und pathogen sein (Nucci & Anaissie, 2007). Sein außergewöhnlich breites Wirtsspektrum und die vorhandenen molekularen Methoden machen *F. oxysporum* zu einem Modellorganismus für die Untersuchung der verschiedenen Aspekte der Pilzinfektion (Di Pietro *et al.* 2003; Michielse & Rep, 2009). Einsexueller Zyklus ist nicht bekannt, es werden allerdings drei verschiedene Arten von asexuellen Sporen, die Mikrokonidien, Makrokonidien und die Chlamydosporen gebildet. Mikrokonidien werden unter allen Bedingungen produziert, sind bananenförmig und ein- oder zweizellig. Makrokonidien sind drei- bis fünfzellig und werden auf der infizierten Pflanze gebildet. Chlamydosporen sind hingegen rund, dickwandig und werden in altes Myzel oder in Makrokonidien eingefügt (Agrios, 1988). Im Jahr 2007 wurde das Genom von *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, der Tomatenpflanzen befällt, vom Broad Institute sequenziert.

Es gibt nur einige wenige Publikationen, die das Wachstum von *Fusarium oxysporum* im Biofilm beschreiben. Es ist bekannt, dass der Pilz Biofilme auf Kontaktlinsen (Imamura *et al.* 2008, Ramani & Chaturvedi, 2011) und auf Venenkathetern (Raad & Hachem, 1995) ausbilden kann. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *F. oxysporum* zusammen mit *Stenotrophomonas maltophilia* Biofilme bilden kann (Elvers *et al.* 2000).

Pilzliche Keratitis ist eine verheerende Entzündung der Hornhaut des Auges und eine der wesentlichen Ursachen von Erblindung (Thomas, 2003; Margolis & Whitcher, 2006). Diese Krankheit wird gewöhnlich durch *Fusarium* Arten ausgelöst, wie eine Studie von 1999 bis 2006 der Universität Florida zeigt. Die Gruppe um IYER fand heraus, dass 41% der isolierten Pilze einer Keratitis *Fusarium*Spezies sind, 14% *Candida*, und jeweils 12% *Curcularia* und *Aspergillus*-Arten (Iyer *et al.* 2006). Das Ausbrechen der Krankheit ist laut IMAMURA auf die Verwendung von Kontaktlinsen mit bestimmten Kontaktlinsenlösungen zurückzuführen. Er vermutet daher den Zusammenhang mit der Biofilmbildung auf Kontaktlinsen und beschreibt in seiner Publikation das Wachstum von *F. oxysporum* zusammen mit *Candida albicans* auf weichen Kontaktlinsen, in Abhängigkeit der Kontaktlinsenart und der Pflegelösung. Es konnte gezeigt werden, dass beide Pilze zusammen auf verschiedenen Kontaktlinsenarten wachsen können und dass die getesteten Kontaktlinsenmittel zwar gegen planktonisch wachsende Pilze wirken, jedoch gegen im Biofilm lebende nur wenig wirksam sind (Imamura *et al.* 2008).

ELVERS untersuchte die binäre Biofilmbildung von *F. oxysporum* und *S. maltophilia* in einer Batch-Kultur. Es wurden verschiedene Materialien wie PVC und Glas getestet und jede Art jeweils als Erst- beziehungsweise Zweit-Besiedler eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass die Oberflächenart keinen Einfluss auf die Biofilmpopulation hat, wenn die Oberfläche schon mit *S. maltophilia* bewachsen ist, beziehungsweise wenn *F.oxysporum* zuerst auf der Oberfläche ansiedelt (Elvers *et al.* 2000).

Abbildung 5 zeigt einen fünf Tage alten *F. oxysporum* Biofilm aus einer Durchflusszellapparatur. Man kann erkennen, dass ein einheitlicher und kompakter Biofilm mit vielen Hyphen und einer homogenen Struktur entstanden ist (Ramani & Chaturvedi, 2011).

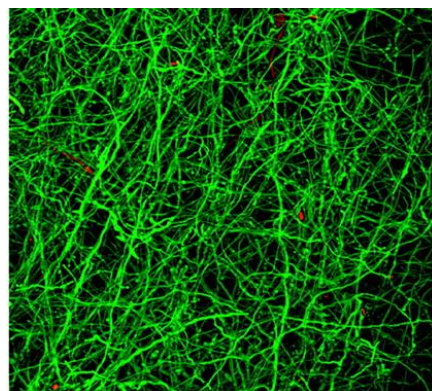


Abbildung5: Konfokale Laserrastermikroskopie eines *F. oxysporum* Biofilms. Der Biofilm wurde

mit 5-Chloromethylfluorescein Diacetat (bindet an lebende Zellen, grün) und Sytox Red (bindet an tote Fragmente, rot) gefärbt (Ramani & Chaturvedi, 2011).

2.3 Stressgene werden im Biofilm vermehrt exprimiert

Es ist offensichtlich, dass Mikroorganismen erhebliche Veränderungen während des Übergangs von planktonischem zum Biofilmwachstum durchleben. Diese Veränderungen resultieren in phänotypischen Anpassungen, welche die Bildung von hoch-organisierten und strukturierten sessilen Gemeinschaften erlaubt (Schembri *et al.* 2003). Die Entwicklung zu einem fertig ausgebildeten Biofilm setzt Veränderungen in der Genexpression der Organismen voraus. Mit Hilfe von DNA-Microarrays, kann man die Genexpression direkt während der Biofilmentwicklung beobachten und einen Eindruck über die im Biofilm wichtigen Gene erhalten (Kuchma & O'Toole, 2000).

SCHEMBRI untersuchte die ersten Schritte der *E. coli* Biofilmbildung anhand von DNA-Microarrays und fand heraus, dass in den Biofilmzellen zwischen 5% und 10% der Gene unterschiedlich exprimiert werden im Vergleich zu einer planktonischen Kultur, je nachdem welche planktonische Phase als Referenz genutzt wurde (Schembri *et al.* 2003).

Untersuchungen von REN lassen vermuten, dass die Genexpression in Biofilmen stark von den Umweltbedingungen abhängt und Stressgene in die Biofilmbildung von *E. coli* JM109 involviert sind. Mit Hilfe von DNA-Microarrays konnte bei einer Untersuchung von *E. coli* JM109 und K12 Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Zellen, eine vermehrte Expression der Stressgene *hsIS*, *hsIT*, *hha*, und *soxS*, gezeigt werden (Ren *et al.* 2003). *HsIT* und *hsIS* kodieren kleine Proteine für Hitzeschock und Superoxid Stress (Kitagawa *et al.* 2000). REN fand heraus, dass im untersuchten *E. coli* Biofilm 22 Gene hochreguliert und 201 Gene reprimiert sind (Ren *et al.* 2003).

YEATER untersuchte die Genexpression während der Biofilmentwicklung in *Candida albicans* zu drei verschiedenen Zeitpunkten, früh (6 h), intermediär (12 h) und reif (48 h). Im reifen Biofilm (48 h) werden im Vergleich zum frühen und intermediären Biofilm nur wenige Gene unterschiedlich exprimiert, was auf eine relativ geringe Anregung neuer Stoffwechselaktivitäten im reifen Biofilm hindeutet. Gene, die auf veränderte Umweltbedingungen reagieren, werden während der Biofilmentwicklung zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich exprimiert. Hierzu gehören Gene, wie

CAT1, *GCS1*, *TSA1* und *NCE103*, die in die Antwort auf oxidativen Stress involviert sind oder auf osmotischen (*RHR2*) und thermischen (*HSP90* und *HSP104*) Stress reagieren (Yeater *et al.* 2007). In Abbildung 6 ist eine Übersicht der unterschiedlich exprimierten Gene während der Biofilmentwicklung von *C. albicans* zu sehen. Hieraus ist ersichtlich, dass Gene für die Stressantwort bereits in den ersten Phasen der Biofilmentstehung hoch reguliert sind.

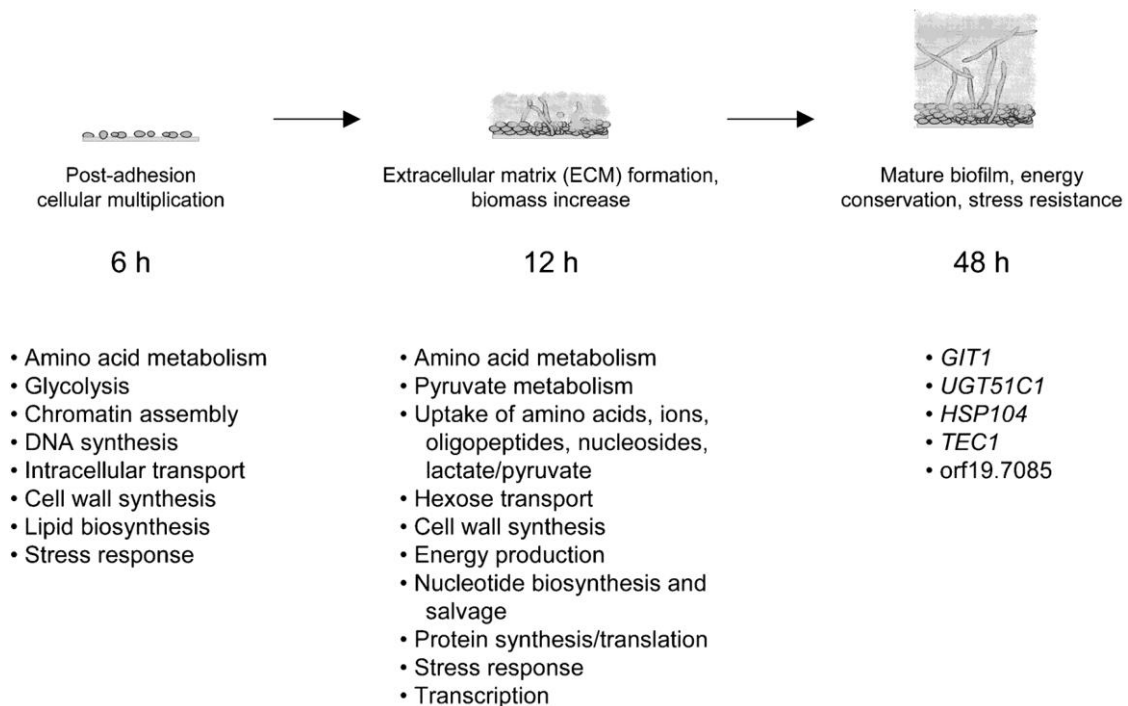


Abbildung 6: Überblick der zellulären Prozesse, die einhergehen mit der Hochregulation von Genen während der *C. albicans* Biofilmentwicklung. Der zeitliche Verlauf der Biofilmbildung zeigt die Zeitpunkte (6, 12 und 48 Stunden) die analysiert wurden. (Yeater *et al.* 2007)

2.4 Der Modellorganismus *Aspergillus nidulans* Biofilm

Der Schimmelpilz *A. nidulans* ist ein filamentös wachsender, homothallischer Ascomycet, welcher ubiquitär im Boden vorkommt (Clutterbuck, 1969). Das Genom von *A. nidulans* ist haploid, weshalb er sich besonders gut für genetische Manipulationen eignet, da eventuelle Phänotypen von Mutationen direkt sichtbar werden (Morris *et al.* 1989). Ein weiterer Vorteil ist, dass das Genom von *A. nidulans* vollständig sequenziert ist (Galagan *et al.* 2005). Des Weiteren ist sein Genom leicht zugänglich, er ist leicht zu kultivieren und schnell wächst (Sievers *et al.* 1997).

Über die Biofilmbildung von *A. nidulans* ist soweit noch nichts bekannt. Aber andere *Aspergillus*-Arten, wie *A. fumigatus* und *A. niger* können im Biofilm

wachsen. SEIDLER zeigte, dass *A. fumigatus* Biofilme auf Styropor und auf menschlichen Bronchialepithel bilden kann (Seidler *et al.* 2008). Die Biofilmbildung von *A. fumigatus* ist in Abbildung 7 dargestellt.

VILLENA zeigt das Biofilmwachstum von *A. niger* auf Polyester (Villena *et al.* 2010). Die Biofilmbildung von *A. niger* wird für die Produktion von Enzymen wie beispielsweise Glucoseoxidase, Inulinase, Amylase und Cellulase genutzt (Fiedurek & Ilczuk, 1991; Murado *et al.* 1994; Skowronek & Fiedurek, 2006; Gamarra *et al.* 2010). In der Industrie sind *Aspergillus* Biofilme von großer Wichtigkeit, da sie produktiver als frei lebendes Myzel sind und somit die gewünschten Substanzen schneller produziert werden können (Ramage *et al.* 2001).

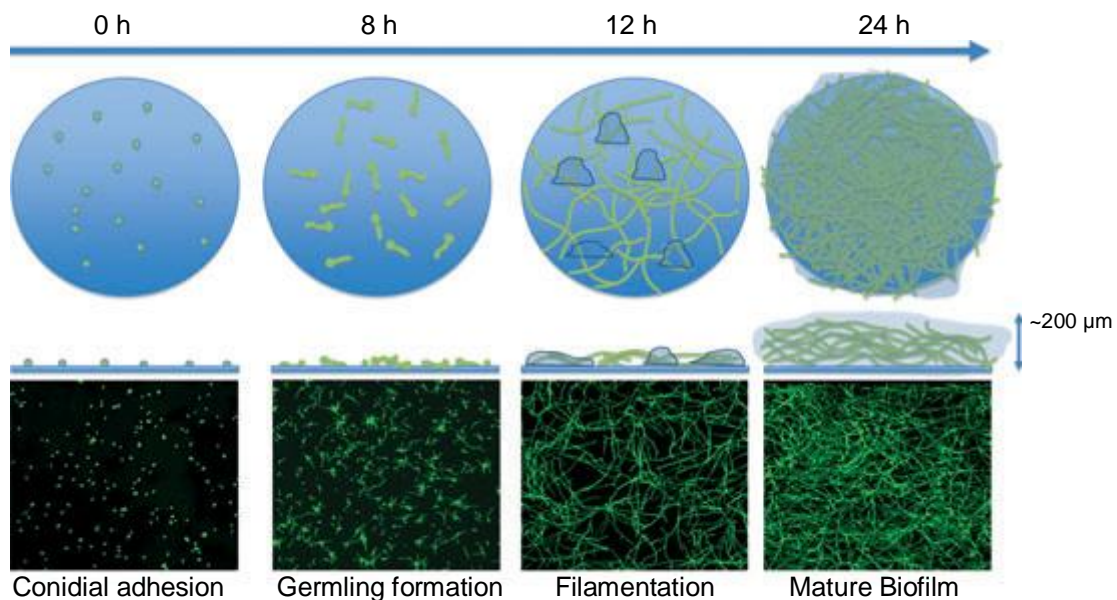


Abbildung 7: Biofilmbildung von *Aspergillus fumigatus*. Die verschiedenen Phasen der Biofilmentwicklung sind schematisch dargestellt. Der erste Schritt, die Anlagerung der Konidien und die Bildung der Keimlinge (8 h), die Ausbildung einer Monoschicht mit ineinander verzweigten Hyphen (12 h) und schließlich der reife, dreidimensionale Biofilm (48 h), der ca. 200 µm dick und von EPS umgeben ist. Ebenfalls zu sehen sind Aufnahmen der konfokalen Laserrastermikroskopie der jeweiligen Entwicklungsstadien. (Ramage *et al.* 2001)

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Biofilmen

Im ersten Teil dieser Arbeit soll auf die Charakterisierung von schon bestehenden und auf Glasoberflächen angezogenen gemischten Biofilmen eingegangen werden. Somit kann ein Eindruck von den in Biofilmen vorkommenden Mikroorganismen gewonnen werden. In dieser Arbeit wurden Biofilme aus natürlichen und künstlichen Habitaten und auf Glasoberflächen untersucht. Zum einen wurden sie molekularbiologisch mit Hilfe von Klonbibliotheken und Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) untersucht und zum anderen mikroskopisch mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

3.1.1 Charakterisierung von Pilzen in nativen Biofilmen

Als nativ bezeichnet man einen Biofilm, der in einem natürlichen System vorkommt und nicht nur eine Art von Mikroorganismen enthält. In einem nativen Biofilm kommen Protozoen, Algen, Bakterien und Pilze vor, jedoch soll hier nur auf die verschiedenen Pilzspezies eingegangen werden. Laut SCHMEISSER sind mehr als 99% der in natürlichen Habitaten vorkommenden Mikroorganismen nicht kultivierbar, weshalb zur direkten Analyse der Pilzpopulation eine Klonbibliothek erstellt wurde (Schmeisser *et al.* 2003). Weitere Untersuchungen der Biofilme erfolgten mit Hilfe der DGGE und der FISH. Für die Untersuchungen wurden Biofilmproben aus einem See in Eggenstein-Leopoldshafen, nahe Karlsruhe, aus der Alb, die schließlich in den Rhein fließt und dem Rhein selbst, entnommen. Mit Hilfe der FISH wurde zusätzlich ein Biofilm aus der Pfinz, einem Nebenfluss des Rheins, mikroskopisch untersucht.

3.1.1.1 In Biofilmen aus natürlichen Habitaten gibt es wenig Pilze

Eine Klonbibliothek ist eine Genbank, die DNA-Sequenzen (Klone) und Informationen dazu enthält. Durch das Erstellen einer Klonbibliothek können auch Pilze erfasst werden, die nicht kultivierbar sind. Außerdem können Aussagen über die relative Häufigkeit einzelner Pilze im Biofilm getroffen werden.

Um die Biofilme von natürlichen Habitaten zu untersuchen, wurde im Winter Biofilmmaterial von verschiedenen Stellen entnommen. Es wurden Biofilme von zwei verschiedenen Stellen der Alb, einem langsam fließendem Gewässer, untersucht. Die erste Stelle befindet sich ein Stück flussabwärts hinter dem Ablauf der Kläranlage und die Zweite befindet sich direkt hinter dem Ablauf der Kläranlage. Des Weiteren wurden Proben von einem Baggersee in Leopoldshafen bei Karlsruhe und dem Rhein bei Karlsruhe entnommen. Die Biofilme wurden mit sterilen Zellschabern geerntet, in 50 ml Reagenzgefäße überführt und anschließend direkt die genomische DNA mit Hilfe des Innu SPEED Soil DNA Kits (Analytik Jena, Jena) isoliert. Es lag somit ein Gemisch an genomischer DNA von dem im Biofilm vorkommenden Organismen vor. Anschließend wurde eine PCR mit den ITS1/ITS4 Primern durchgeführt, welche für die ITS-Region von Pilzen und Einzellern spezifisch sind. Die ITS-Region ist am besten für die Identifizierung von Pilzen geeignet, da sie einen höheren Grad an Variabilität als andere genetische Regionen der rDNA besitzt. Es entstanden je nach Biofilm zwei bis drei verschieden große Fragmente, da die ITS-Regionen der unterschiedlichen Reiche der Eukaryoten variieren. Die amplifizierten Fragmente von Hefen sind ca. 500-600 bp, die von filamentösen Pilzen ca. 700 bp und die Fragmente von Einzellern ca. 800 bp groß. Von jedem Fragment wurde eine Klonbibliothek erstellt. Die PCR-Produkte der ITS-Region von verschiedenen Organismen wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und anschließend in *Escherichia coli* transformiert. Es wurden 25 Kolonien von der Agarplatte gepickt und mit Hilfe einer Colony PCR mit den Primern M13/T7 überprüft. Dieses Primerpaar bindet außerhalb des Inserts im Vektor und dient somit der Überprüfung der erfolgreichen Klonierung. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) analysiert. Dazu wurde die DNA der ITS-Region mit dem Restriktionsenzym *MspI*, welches relativ häufig in der ITS-Region von Pilzen schneidet, geschnitten. Die Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert und mit Hilfe des Onlinetools BLAST ausgewertet und die Art bestimmt.

Bei der Biofilmprobe aus dem See in Leopoldshafen waren laut RFLP nur 15 der 25 getesteten Kolonien unterschiedliche Arten, das heißt dass nur 15 unterschiedliche Bandenmuster zu erkennen waren. Die restlichen zehn Kolonien hatten ITS-Sequenzen von gleichen Arten aufgenommen, was anhand des gleichen Bandenmusters nach dem Restriktionsverdau zu erkennen war. Von den gefundenen

Sequenzen sind nur vier Arten anhand ihrer Sequenz vorher beschrieben worden (siehe Tabelle 1). Darunter befinden sich *Anguillospora longissima*, ein Schlauchpilz, *Cladosporium cladosporioides*, ein sogenannter Schwärzepilz, *Heliscus lugdunensis*, ein aquatischer Schlauchpilz und *Phoma herbarum*, ein parasitischer Pilz. Bei vier Sequenzen kam nach der Auswertung mit Hilfe des Onlinetools BLAST als Ergebnis heraus, dass diese Sequenz zuvor noch nicht beschrieben wurde und diese somit keiner Art zugeordnet werden kann. Bei neun isolierten Sequenzen handelt es sich nicht um Pilze, sondern um nicht genau bestimmbare Einzeller, deren ITS-Region auch mit den verwendeten Primern amplifiziert wird.

In der genomischen DNA aus dem Biofilm, der von der ersten Stelle in der Alb, also ein Stück flussaufwärts nach dem Ablauf der Kläranlage isoliert wurde, befanden sich laut RFLP nur fünf verschiedene Arten, wovon sich keine Anhand ihrer Sequenz identifizieren ließ. Bei zwei der fünf Arten handelt es sich um noch nicht beschriebene Pilze und bei drei um unbekannte Einzeller.

In den Biofilmproben der Alb direkt nach dem Ablauf der Kläranlage waren acht verschiedene Sequenzen vorhanden, wovon es sich bei fünf um noch nicht beschriebene Pilzarten handelt und drei keine Pilze sind.

In der genomischen DNA des Biofilms aus dem Rhein bei Karlsruhe wurden sechs verschiedene ITS-Sequenzen gefunden. Wobei zwei davon unbekannte Pilzarten und vier isolierte Sequenzen unbekannte Einzeller zuzuordnen sind.

Tabelle 1: Identifizierte Pilze aus direkten Biofilmen. Zur Identifizierung der Pilze wurde eine Klonbibliothek mit den ITS-PCR Produkten in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels Sequenzierung mit den Primern M13/T7 und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST.

Spezies	Ordnung	Jahreszeit	Quelle
<i>Anguillospora longissima</i>	Dothideomycetes	Winter	See
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Capnodiales	Winter	See
<i>Heliscus lugdunensis</i>	Hypocreales	Winter	See
<i>Phoma herbarum</i>	Pleosporales	Winter	See

3.1.1.2 Etablierung eines Biofilmassays

Da in unserem Labor nicht die Möglichkeit besteht, Biofilme in Reaktoren anzuziehen, wurden verschiedene Möglichkeiten entwickelt und optimiert, um

Biofilme im kleinen Maßstab anzuziehen. Zur Mikroskopie und für die Isolation von RNA wurde der Biofilm entweder in Glasboxen oder in speziell produzierten Kunststoffröhren auf Glasobjektträgern angezogen. Die Mikroorganismen, die sich im Biofilm ansiedelten, stammen aus natürlichen Systemen, wie einem Fluss oder See und aus künstlichen Systemen, der Kläranlage. Um Biofilme auf Glasoberflächen direkt im jeweiligen Habitat anzuziehen, wurde für den Zulauf der Kläranlage eine entsprechende Halterung für die Objektträger konstruiert. Die drei verschiedenen Apparaturen für die Biofilmzüchtung sind in Abbildung 8 gezeigt. Die extra für dieses Projekt produzierten Biofilmröhren sind in Abbildung 8A gezeigt. Sie bestehen aus autoklavierbarem Kunststoff mit einer Halterung für drei Objektträger pro Röhre. Das Medium wird durch die Schläuche mit Hilfe einer Schlauchpumpe und einer Geschwindigkeit von 10 ml/min durch die Röhren gepumpt. Um die Biofilmbildung im Zulauf der Kläranlage zu untersuchen, wurde eine Plastikflasche mit Schraubverschluss präpariert (siehe Abbildung 8B). Dazu wurden mit einem Skalpell Öffnungen für die Glasobjektträger und zusätzliche Löcher für ein besseres Durchfließen des Abwassers in die Flasche geschnitten. Die Flaschen wurden mit Hilfe eines Seils im Zulauf der Kläranlage angebracht. Für die RNA-Isolierung und zum Teil die Mikroskopie wurden die Glasboxen mit den Objektträgern verwendet (siehe Abbildung 8C). Diese wurden mit Medium und Sporen beziehungsweise konzentriertem Ablauf als Inokulum angeimpft und stehend bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Wie in der Abbildung zu sehen, wächst hier der Pilz auf den Objektträgern und teilweise auf der Oberfläche des Mediums.

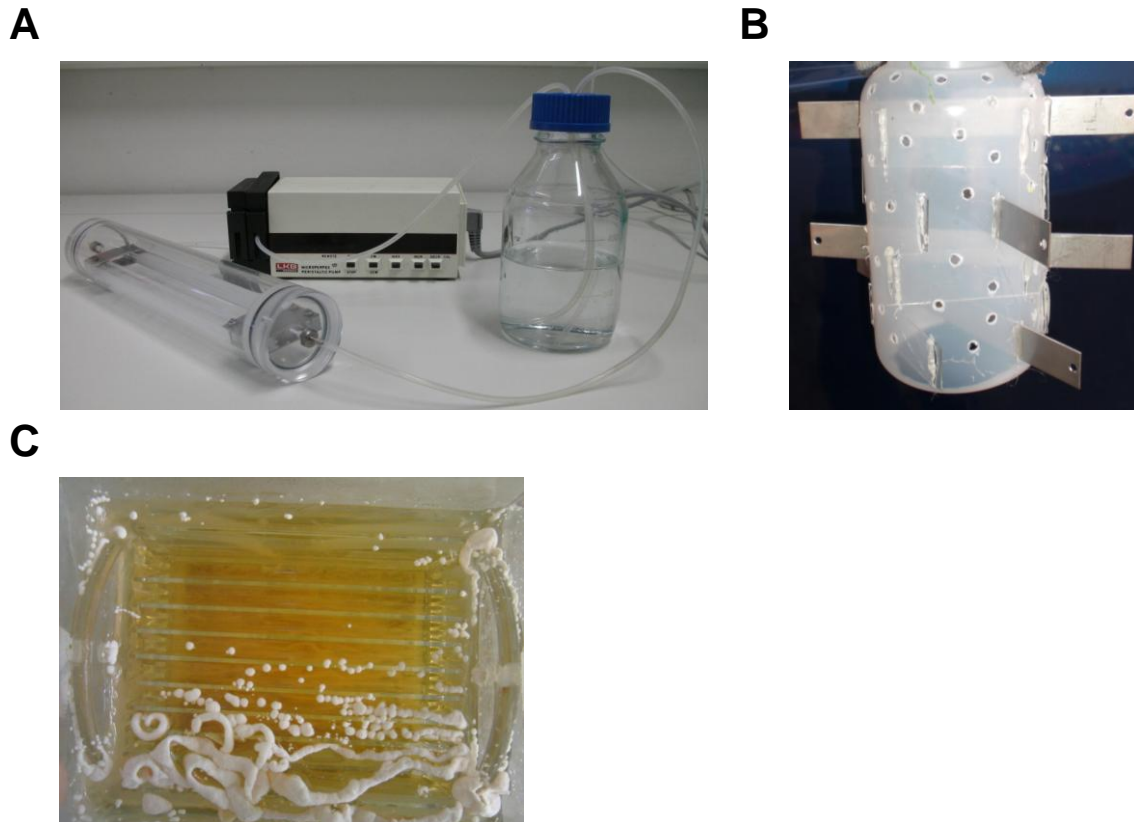


Abbildung 8: Methoden zur Biofilmanreicherung. (A) Kunststoffröhren mit Halterung für Objektträger. Das Medium wird mit Hilfe der Schlauchpumpe mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 ml/min durch die Röhren gepumpt. (B) In eine Flasche mit Schraubdeckel wurden Öffnungen für die Glasobjektträger geschnitten und diese im Zulauf der Kläranlage ausgebracht. (C) Glasbox mit Halterung für Objektträger für die Biofilmbildung auf Glas. Hier wächst der Pilz auch teilweise auf der Oberfläche des Mediums.

3.1.1.3 Reproduktion eines Biofilms auf Glas in einem natürlichen Habitat

Um den Unterschied in der Diversität von einem schon vorhandenen Biofilm im Vergleich zu einem auf einer Glasoberfläche gezüchteten Biofilm zu untersuchen, wurde eine Klonbibliothek von einem Biofilm, der auf einer Glasoberfläche in der Alb gewachsen ist, erstellt. Dafür wurde eine Glasbox mit Glasobjektträgern in der Alb für vier Wochen ausgebracht. Anschließend wurde die Oberfläche mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült und schließlich mit einem sterilen Zellschaber das Biofilmmaterial abgekratzt. Die komplette DNA aus dem Biofilm wurde mit Hilfe des Innu SPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) isoliert. Schließlich folgte eine PCR auf die ITS-Region mit den Primern ITS1 und ITS4. Das Amplifikat wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert.²⁵ Kolonien wurden von der Agarplatte gepickt und mit Hilfe einer Colony PCR mit den Primern

M13/T7 überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des RFLPs analysiert. Dazu wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *MspI* verdaut. Die Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert und mit dem Onlinetool BLAST ausgewertet. Es konnte sich nur ein Pilz, *Candida tropicalis*, im Biofilm auf der Glasoberfläche anlagern und drei unbekannte Einzeller die anhand ihrer ITS-Sequenz in der gDNA des Biofilms gefunden wurden.

3.1.1.4 Räumliche Verteilung der Mikroorganismen im Biofilm

Um die räumliche Verteilung der Mikroorganismen innerhalb eines Biofilms zu untersuchen, wurde die FISH angewendet. Mit Hilfe dieser Methode, können verschiedene Organismengruppen *in situ* im Biofilm direkt auf dem Objektträger sichtbar gemacht werden. Für die FISH der nativen Biofilme, wurden Glasobjektträger mit einer entsprechenden Halterung für einen Monat im jeweiligen Gewässer ausgebracht. Nach der Entnahme der Objektträger wurde die Oberfläche mit einer 0,85%igen Natriumchlorid-Lösung gewaschen um nicht im Biofilm anhaftende Organismen zu entfernen. Es wurden zwei verschiedene Sonden verwendet. EuUni, eine Carboxyfluorescein (FAM) markierte Sonde, die an die 18S rRNA von Eukaryoten bindet und EuB338, markiert mit Cy3, die an die 16S rRNA von Prokaryoten bindet. Bei der Durchführung wurde nach BASCHIEN, wie in Punkt 5.6.4 beschrieben, verfahren (Baschien *et al.* 2008). Dazu wurde der Biofilm auf dem Objektträger zuerst mit Hilfe von Paraformaldehyd dehydriert und schließlich über Nacht fixiert. Für die Permeabilisierung der Zellwand wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) und Glucanex verwendet. Anschließend erfolgte der Hybridisierungsschritt mit Formamid und der entsprechenden Sonde und schließlich ein Waschschriff um die überflüssige Sonde abzuwaschen. In Abbildung 9 ist das Ergebnis der FISH von Biofilmen aus der Alb und der Pfinz zu sehen. In der Abbildung des Biofilms aus der Alb kann man grün fluoreszierende Hyphen erkennen, sowie einige Bakterien. Im Biofilm der aus der Pfinz entnommen wurde, sind deutlich mehr Bakterien zu erkennen.

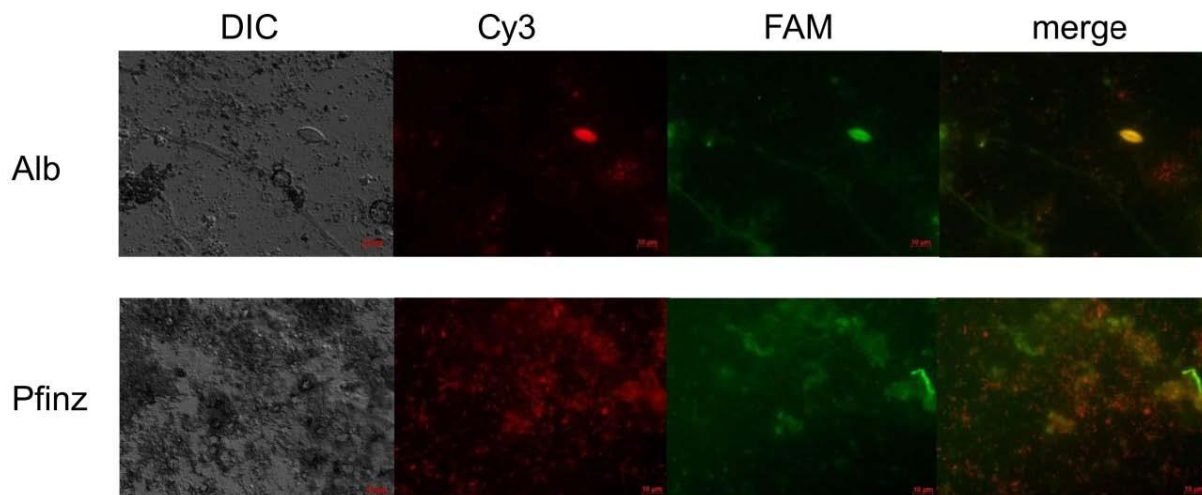


Abbildung 9: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von Biofilmen. Die Objektträger wurden vier Wochen lang in den verschiedenen Habitaten inkubiert und anschließend die FISH mit der für Bakterien spezifischen Sonde EuB338 (in rot dargestellt, Sonde ist an Cy3 gekoppelt) und der für Eukaryoten spezifischen Sonde EuUni (in grün dargestellt, Sonde an FAM gekoppelt) durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass nur die an der Oberfläche anhaftenden Mikroorganismen analysiert werden, wurden diese zuvor mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

3.1.1.5 Vergleich natürlicher mit auf Glas gezüchteten Biofilmen

Zur weiteren Analyse der Biofilme wurde die Biofilmpopulation qualitativ mit Hilfe einer molekularbiologischen Fingerabdruck-Methode, der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE), untersucht (Muyzer *et al.* 1993; Emtiazi *et al.* 2003). Mit Hilfe dieser Methode konnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft in direkten, also schon vorhandenen Biofilmen, und auf Glasoberflächen angezogenen Biofilmen, detektiert werden. Bei der DGGE wird die DNA aufgrund eines Harnstoffgradienten und der Schmelztemperatur aufgetrennt. Als Proben dienten Biofilme aus künstlich angelegten Substraten von der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Zum einen wurde Biofilmmaterial im Zulauf und Ablauf an der Betonwand entnommen und zum anderen wurden dort Glasboxen mit Glasobjektträger für vier Wochen ausgebracht, sodass diese mit einem Biofilm bewachsen. Zusätzlich wurde noch ein Biofilm aus der Alb, nahe Eggenstein entnommen und dort ebenfalls eine Glasbox mit Glasobjektträger ausgebracht. Die Glasoberflächen wurden zum Entfernen von nicht anhaftenden Mikroorganismen mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

Die isolierte genomische DNA aus dem Biofilm wurde als Template in eine erste PCR mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 eingesetzt. Das daraus resultierende Amplifikat wurde

in eine zweite PCR mit den Primern ITS5, der einen GC-Schwanz besitzt, und ITS4 eingesetzt. Durch die 5'-terminale Verlängerung des Vorwärts-Primers ITS5 mit einem GC-Schwanz, wird die spätere Trennung der DNA-Fragmente in der DGGE aufgrund ihrer unterschiedlichen Basenzusammensetzung ermöglicht. Dieses PCR-Produkt wurde schließlich mit Hilfe der DGGE aufgetrennt (siehe Abbildung 10).

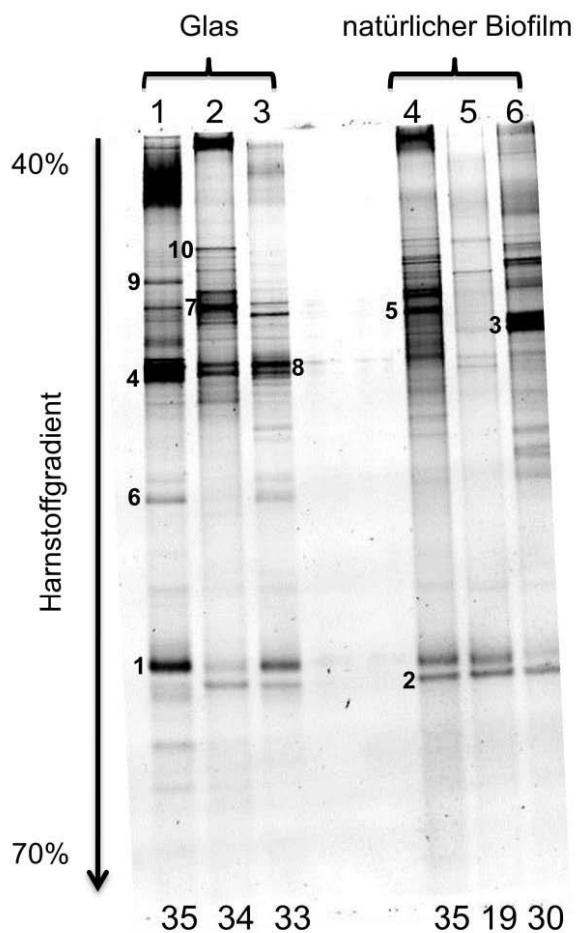


Abbildung 10: PCR-DGGE Analyse der Biofilme auf einer Glasoberfläche und direkt aus dem entsprechenden Habitat im Vergleich. Spur 1-3 zeigt die aufgetrennten PCR-Produkte der Biofilme auf der Glasoberfläche und Spur 4-6 von natürlichen Biofilmen, die direkt aus dem entsprechenden Gewässer entnommen wurden. Auf Spur 1 aufgetragen ist das PCR-Produkt des Biofilms aus dem Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, auf Spur 2 von der Alb und Spur 3 ist das aufgetrennte PCR-Produkt des Biofilms aus dem Zulauf der Kläranlage zu sehen. Spur 4 wurde mit dem PCR-Produkt des direkten Biofilms aus dem Ablauf der Kläranlage beladen, Spur 5 ist von der Alb und Spur 6 vom Zulauf der Kläranlage. Die Richtung der Elektrophorese ist die gleiche wie die des Harnstoffes, wo der Gradient zwischen 40% und 70% liegt. Das Gel lief bei 56°C und 70 V für 16 Stunden. Die Banden, die mit den Ziffern 1-10 beschriftet sind, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur Identifikation der Art sequenziert. Die Anzahl der vorhandenen DNA Banden ist am Ende jeder Spur aufgeführt.

Die DNA Banden der einzelnen Proben wurden analysiert und ausgewertet. Die jeweilige Anzahl der Banden ist am Ende der Bandenspur aufgeführt. Insgesamt ist die Diversität in den untersuchten Biofilmen sehr hoch, da jede Bande für eine Art steht. Die Diversität der Biofilme auf der Glasoberfläche ist jedoch größer als die in den direkten entnommenen Biofilmen aus den Gewässern (33 bis 35 Banden im Vergleich zu 19 bis 30 Banden). Nicht alle Banden, die in den Biofilmen auf der Glasoberfläche vorkommen, sind auch im direkten Biofilm des jeweiligen Habitats zu

sehen, das heißt nicht alle Pilze, die im Habitat vorkommen, können sich auch auf einer Glasoberfläche ansiedeln und einen neuen Biofilm bilden.

Die markierten Banden wurden ausgeschnitten und als Template in eine PCR mit den Primern IT5 und ITS4 eingesetzt, um wieder doppelsträngige DNA zu erhalten. Nach der Sequenzierung wurden die Sequenzen mit Hilfe von BLAST ausgewertet, wobei nur Bande 7 und 8 der Art *Stylohychia sp.* zugeordnet werden konnte, die restlichen Sequenzen waren zuvor anhand ihrer Sequenz noch nicht beschriebene Pilze.

Die Gemeinsamkeiten der unterschiedlichen Biofilme wurden mit Hilfe des Dice Koeffizienten bestimmt. Der Dice Koeffizient dient dem paarweisen Vergleich der pilzlichen Gemeinschaft und gibt die prozentuale Ähnlichkeit an (siehe Tabelle 2) (Murray *et al.* 1996). Die Ähnlichkeit der einzelnen Biofilme liegt zwischen 9% und 48%. Die prozentuale Ähnlichkeit ist bei den Biofilmen auf den Glasoberflächen und den direkten Biofilmen untereinander sehr ähnlich.

Tabelle 2: Vergleich der PCR-DGGE Fingerabdrücke der verschiedenen pilzlichen Populationen mit dem Dice Koeffizienten. Angegeben ist der C_s -Wert. $C_s = 2j/(x+y)$. Mit j = Anzahl der gemeinsamen Banden von x und y ; x = Anzahl der Banden in x ; y = Anzahl der Banden von y . Spur 1-3 Biofilm von Glasoberfläche und 4-6 direkter Biofilm. Spur 1: Biofilm Ablauf Kläranlage Karlsruhe-Neureut, Spur 2: Alb, Spur 3: Zulaufbiofilm der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Spur 4: Ablauf Kläranlage Karlsruhe-Neureut, Spur 5: Alb, Spur 6: Zulaufbiofilm der Kläranlage Karlsruhe-Neureut

Spur	1	2	3	4	5	6
1	1,00					
2	0,40	1,00				
3	0,48	0,39	1,00			
4	0,26	0,41	0,15	1,00		
5	0,15	0,15	0,15	0,19	1,00	
6	0,09	0,19	0,16	0,25	0,32	1,00

Die Analyse ergab C_s -Werte zwischen 0 und 1, wobei 0 für keinerlei Übereinstimmung und 1,00 für eine 100%ige Übereinstimmung steht (Murray *et al.* 1996).

3.1.2 Charakterisierung von Biofilmen aus einem künstlichen Habitat

Als künstlich geschaffenes Habitat wurde die Kläranlage Karlsruhe-Neureut gewählt. In einer Kläranlage ist das Vorhandensein von Mikroorganismen von sehr großer Bedeutung, da diese wesentlich an der Reinigung des Abwassers beteiligt sind. Die Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze und Einzeller, bauen mitunter die organischen Stoffe des Abwassers ab (Rodgers *et al.* 2006).

3.1.2.1 Große Diversität in Biofilmen der Kläranlage

Für die Entnahme der Proben wurden zwei verschiedene Stellen in der Kläranlage gewählt. Zum einen wurde Biofilmmaterial an der Betonwand im Zulauf, direkt hinter dem Grobrechen (vgl. Abbildung 51), entnommen und zum anderen hinter der biologischen Reinigung, ebenfalls von der Betonwand. Die Biofilme wurden jeweils im Frühling, Sommer, Herbst und Winter geerntet. Von Probenahmestelle 2 konnte im Herbst und Winter kein Biofilm entnommen werden, da sich dort zu diesem Zeitpunkt eine Baustelle befand.

Die Biofilme wurden mit sterilen Zellschabern entfernt, in 50 ml Reagenzgefäße überführt und anschließend direkt die DNA mittels Innu SPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) isoliert. Es lag somit ein Gemisch an DNA von den im Biofilm vorkommenden Organismen vor. Anschließend wurde eine PCR mit den ITS1/ITS4 Primer durchgeführt. Von den Biofilmproben aus dem Frühling wurde von jeder der drei bei der ITS-PCR entstandenen Banden eine eigene Klonbibliothek erstellt. Bei den anderen Biofilmproben wurden die drei bei der ITS-PCR entstandenen Banden zusammen aufgereinigt und in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert. Es wurden jeweils 100 Kolonien von der Agarplatte gepickt und mit Hilfe einer M13/T7 Colony PCR überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des RFLPs analysiert. Dazu wurde die DNA, also die ITS-Sequenz, mit dem Restriktionsenzym *MspI*, welches relativ häufig in Pilzen schneidet, verdaut. Die Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert und die ITS-Sequenz mit Hilfe des Online Tools BLAST ausgewertet. Die Arten, die anhand ihrer Sequenz ausgewertet werden konnten, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle3: Identifizierte Pilze aus direkten Biofilmen der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Zur Identifizierung der Pilze wurde eine Klonbibliothek mit den ITS-PCR Produkten in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels Sequenzierung mit den Primern M13/T7 und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST. Stelle 1 ist die Probenahmestelle direkt hinter dem Grobrechen und Stelle 2 hinter der biologischen Reinigung.

Spezies	Ordnung	Jahreszeit	Quelle
<i>Achlya sp.</i>	Saprolegniales	Winter	Stelle 1
Blastocladiomycota		Frühling	Stelle 2
<i>Candida boidinii</i>	Saccharomycetales	Winter	Stelle 1
<i>Candida pelliculosa</i>	Saccharomycetales	Winter	Stelle 1
<i>Candida tropicalis</i>	Saccharomycetales	Winter, Frühling	Stelle 1
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Saccharomycetales	Frühling	Stelle 1
<i>Geotrichum sp.</i>	Saccharomycetales	Frühling, Herbst	Stelle 1
<i>Fusarium merismoides</i>	Hypocreales	Herbst	Stelle 1
<i>Mortierella sp.</i>	Mortierellales	Winter	Stelle 1
<i>Mucor racemosus</i>	Mucorales	Winter	Stelle 1
<i>Penicillium commune</i>	Eurotiales	Winter	Stelle 1
<i>Pichia anomala</i>	Saccharomycetales	Winter	Stelle 1
<i>Phythium sp.</i>	Pythiales	Winter	Stelle 1
<i>Protoventuria alpina</i>	Helotiales	Sommer	Stelle 1
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	Chaetothyriales	Frühling	Stelle 1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Sporidiobolales	Frühling	Stelle 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	Frühling	Stelle 1
<i>Sporobolomyces lactosus</i>	Erythrobasidiales	Herbst	Stelle 1
<i>Sporobolomyces symmetricus</i>	Erythrobasidiales	Frühling	Stelle 1
Tremellomycetes		Winter	Stelle 1
<i>Trichosporon sp.</i>	Tremellales	Winter, Frühling	Stelle 1
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Tremellales	Winter	Stelle 1

<i>Trichosporon domesticum</i>	Tremellales	Sommer	Stelle 1
<i>Trichosporon montevideense</i>	Tremellales	Winter	Stelle 1

Abbildung 11 zeigt das Vorkommen der einzelnen Arten in den Biofilmen der ersten Probenahmestelle der Kläranlage anhand eines Diagramms, die Anzahl der gefundenen Arten wurde berücksichtigt. Anhand der Verteilung im Diagramm kann man erkennen, dass *Trichosporon sp.* mit sechs gefundenen Isolaten am häufigsten vorkommt, gefolgt von *Galactomyces geotrichum* mit vier gefundenen Isolaten.

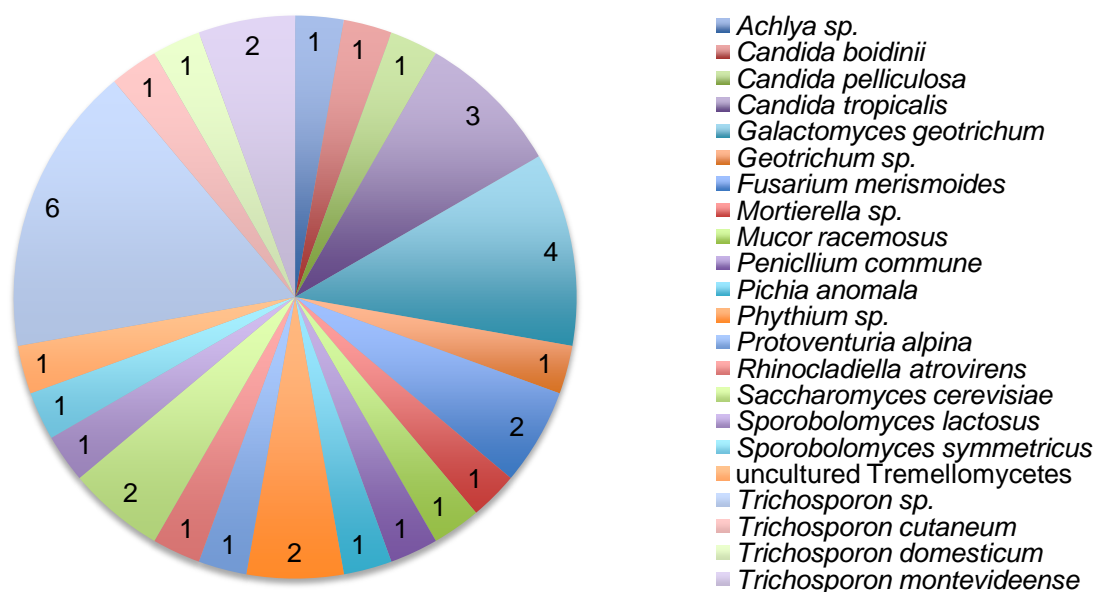


Abbildung 11: Verteilung der Arten anhand der Anzahl der gefundenen Sequenzen im Biofilm.
Die Anzahl der gefundenen Arten ist im Diagramm dargestellt.

Anhand der gefundenen Arten in Tabelle 3 und Abbildung 11 kann man sehen, dass einige Spezies der Ordnung Saccharomycetales, wie *Candida tropicalis* oder *Galactomyces geotrichum* vermehrt vorkommen. In Abbildung 12 ist ein Diagramm mit den im Biofilm gefundenen Ordnungen zu sehen. Die Ordnung der Tremellales ist mit mehreren Arten vertreten. Insgesamt wurden die meisten bekannten Arten im Winter gefunden.

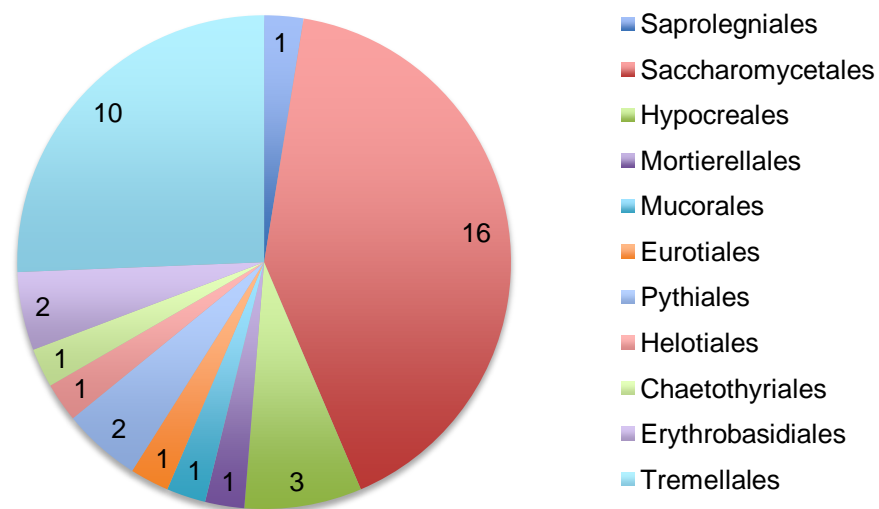


Abbildung 12: Verteilung der vorkommenden Ordnungen in den Klonbibliotheken der Biofilme aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Die Anzahl der gefundenen Arten einer Ordnung ist im Diagramm dargestellt.

Zusätzlich zu den in Tabelle 4 aufgeführten Arten, wurden noch weitere ITS-Sequenzen in der isolierten DNA aus den Biofilmen gefunden, die zuvor noch nicht beschrieben wurden. Ebenso einige Sequenzen, die auf andere Eukaryoten, wie Einzeller, hindeuten. Die Anzahl der Sequenzen, die keiner Art zugeordnet werden konnten, sind in Tabelle 4 aufgeführt. Insgesamt kann man sagen, dass im Frühling mehr unbekannte Arten wie im Winter und Sommer vorkommen, jedoch ist die Diversität in den Biofilmen sehr hoch. Phylogenetische Analysen zeigten, dass die meisten der unbekannt Arten mit Arten aus der Gattung *Candida* und *Trichoderma* verwandt sind.

Tabelle 4: Übersicht über die nicht bekannten Sequenzen der Klonbibliothek aus direkten Biofilmen der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Zur Identifizierung der Pilze wurde eine Klonbibliothek mit den ITS-PCR Produkten in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels Sequenzierung mit den Primern M13/T7 und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST.

Probenahme	Anzahl unbekannte Pilze	Anzahl unbekannte Eukaryoten
Stelle 1 Winter	10	2
Stelle 1 Frühling	32	4
Stelle 2 Frühling	47	26
Stelle 1 Sommer	1	3
Stelle 2 Sommer	1	9
Stelle 1 Herbst	5	1

3.1.2.2 Biofilmbildung auf Glasoberflächen

Vergleichend zu den in natürlichen Systemen vorkommenden Biofilmen, wurde auch im künstlichen System, der Kläranlage, Biofilme auf einer Glasoberfläche gezüchtet und anschließend eine Klonbibliothek erstellt. Die Glasobjektträger wurden in einer Glasbox für vier Wochen im Zulauf beziehungsweise im Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut ausgebracht. Schließlich wurden die Objektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült, um alle nicht anhaftende Mikroorganismen zu entfernen. Die Biofilme wurden mit sterilen Zellschabern von der Oberfläche abgekratzt und anschließend die DNA mit Hilfe des Innu SPEED Soil DNA Kits (Analytik Jena, Jena) isoliert. Ein Gemisch an DNA von dem im Biofilm vorkommenden Organismen lag nun vor. Anschließend wurde eine PCR mit den ITS1/ITS4 Primer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und in *E. coli* transformiert. Es wurden jeweils 25 Kolonien von der Agarplatte gepickt und mit Hilfe einer M13/T7 Colony PCR überprüft, ob das Insert aufgenommen wurde. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des RFLP analysiert. Dazu wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *MspI*, verdaut. Die Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert und mit Hilfe des Onlinetools BLAST ausgewertet.

In den beiden erstellten Klonbibliotheken der Glasoberflächen befand sich keine ITS-Sequenz, die einer Art zuzuordnen war. Im Zulaufbiofilm auf der Glasoberfläche befanden sich nur ein unbekannter Pilz und ein unbekannter Einzeller, sonst keine

weitere bestimmbare Art. Im Biofilm aus dem Ablauf der Kläranlage befanden sich ein unbekannter Pilz, sowie acht zuvor noch nicht beschriebene Einzeller.

3.1.2.3 Räumliche Verteilung der Mikroorganismen im Biofilm

Um die räumliche Verteilung der Mikroorganismen innerhalb der Biofilme aus der Kläranlage zu untersuchen, wurde die FISH angewendet. Für die FISH der Biofilme im Zu- und Ablauf der Kläranlage, wurden Glasobjektträger mit entsprechender Halterung (siehe Punkt 3.1.1.2) für einen Monat ausgebracht. Nach der Entnahme der Objektträger wurde die Oberfläche mit einer 0,85%igen Natriumchlorid-Lösung gewaschen, um nicht im Biofilm anhaftende Organismen zu entfernen. Es wurden zwei verschiedene Sonden verwendet. EuUni, eine FAM markierte Sonde, die an die 18S rRNA von Eukaryoten bindet und EuB338, markiert mit Cy3, die an die 16S rRNA von Prokaryoten bindet. Bei der Durchführung wurde nach BASCHIEN, wie in Punkt 5.6.4 beschrieben, verfahren. In Abbildung 13 ist der Ergebnis der FISH von den Biofilmen aus dem Zulauf und Ablauf der Kläranlage zu sehen. Im Zulaufbiofilm sind einige Hyphen und viele Bakterien, die sich direkt um die Hyphe gelagert haben, zu sehen. In den Biofilmen aus dem Ablauf der Kläranlage, waren keine Hyphen zu sehen, sondern nur Hefen und Bakterien.

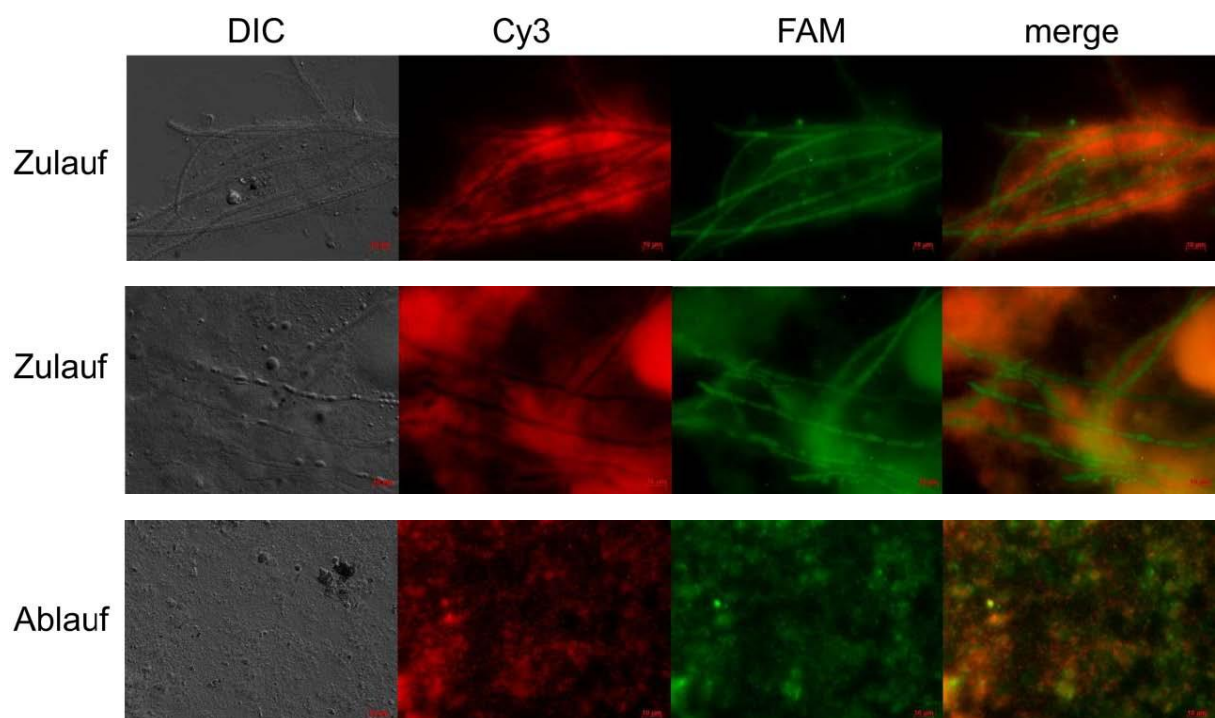


Abbildung 13: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von Biofilmen. Die Objektträger wurde vier Wochen lang in den verschiedenen Habitaten inkubiert und anschließend die FISH mit der für Bakterien spezifischen Sonde EuB338 (in rot dargestellt, Sonde ist an Cy3 gekoppelt) und der für Eukaryoten spezifischen Sonde EuUni (in grün dargestellt, Sonde an FAM gekoppelt) durchgeführt.

Um sicher zu stellen, dass nur die an der Oberfläche anhaftenden Mikroorganismen analysiert werden, wurde diese zuvor mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

3.1.2.4 Populationszusammensetzung der Biofilme aus der Kläranlage

Zur weiteren Analyse der Biofilme aus der Kläranlage, wurde die Biofilmpopulation qualitativ mit Hilfe einer molekularbiologischen Fingerabdruck-Methode untersucht (Muyzer *et al.* 1993; Emtiazi *et al.* 2003). Hierfür wurde die PCR-DGGE verwendet. Mit Hilfe dieser Methode, konnten die Unterschiede in der Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft der zwei verschiedenen Probenahmestellen und der unterschiedlichen Jahreszeiten detektiert werden.

Untersucht wurden Biofilme aus dem künstlich angelegten System der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und es wurde Biofilmmaterial im Zulauf und Ablauf an der Betonwand zu verschiedenen Jahreszeiten entnommen. Die Proben wurden im Sommer Jahr eins, Herbst Jahr eins, Winter Jahr eins, Frühling Jahr eins und Sommer Jahr zwei untersucht.

Die isolierte Biofilm DNA wurde als Template in eine erste PCR mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 eingesetzt und diente als Template in einer zweiten PCR mit dem Primerpaar ITS5GC/ITS4. Dieses PCR-Produkt wurde schließlich mit Hilfe der DGGE aufgetrennt und ist in Abbildung 14 zu sehen.

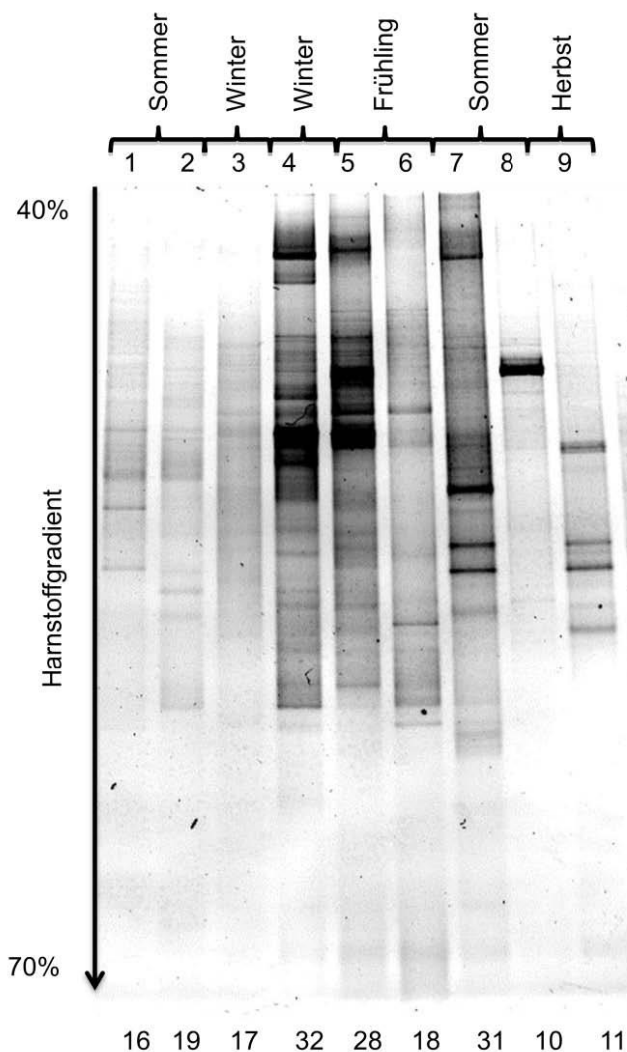


Abbildung 14: PCR-DGGE Analyse der Biofilme aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Spur 1+2 zeigt die aufgetrennten PCR-Produkte der Biofilme vom Sommer Jahr eins und Spur 3+4 vom Winter, Spur 5+6 vom Frühling, 7+8 vom Sommer Jahr zwei und 9 vom Herbst. Auf Spur 1 aufgetragen ist das PCR-Produkt des Biofilms von Stelle 1 der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, auf Spur 2 von Stelle 2. Auf Spur 3 ein Biofilm vom Ablauf der Kläranlage. Spur 4 wurde mit dem PCR-Produkt des direkten Biofilms aus von der Stelle 1 beladen, Spur 5 ist von der Stelle 1 und Spur 6 vom Stelle 2 der Kläranlage. Spur 7 und 8 von Stelle 1 und 2 und Spur 9 von Stelle 1 der Kläranlage. Die Richtung der Elektrophorese ist die gleich wie die des Harnstoffes, dessen Gradient zwischen 40% und 70% liegt. Das Gel lief bei 56°C und 70 V für 16 Stunden. Die Anzahl der vorhandenen DNA Banden ist am Ende jeder Spur aufgeführt.

Die aufgetrennten DNA-Banden der einzelnen Proben wurden analysiert und ausgewertet. Die jeweilige Anzahl an Banden ist am Ende der Bandenspur aufgeführt. Insgesamt ist die Diversität sehr hoch, da jede Bande für eine Art steht. Die Diversität schwankt zwischen den Jahreszeiten, wobei sich die Proben im Sommer Jahr eins relativ ähnlich von der Anzahl der Arten sind.

Zum Vergleich der Gemeinsamkeiten der einzelnen Proben wurde der Dice Koeffizient angewendet. Er gibt für den paarweisen Vergleich der pilzlichen Gemeinschaften die prozentuale Ähnlichkeit an (siehe Tabelle 5) (Murray *et al.* 1996). Die Gemeinsamkeiten liegen zwischen 11% und 57%. Die größte Gemeinsamkeit mit 57% liegt bei der Spur 4, der Stelle 1 im Winter und Spur 5, der Stelle 1 im Frühling, die sich nur durch die Jahreszeit unterscheiden. Auch die zwei Proben des Winters aus dem Ablauf der Kläranlage und Stelle 1 haben mit 49% Übereinstimmung eine große gemeinsame Diversität. Die Gemeinsamkeiten der zwei Proben aus des

Sommers Jahr eins sind mit 46% relativ hoch, trotz der verschiedenen Probenahmestellen. Sonst liegt die Übereinstimmung der Arten zwischen den einzelnen Biofilmen unter 50%.

Tabelle 5: Vergleich der PCR-DGGE Fingerabdrücke der verschiedenen Biofilme aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut mit dem Dice Koeffizienten. Angegeben ist der C_s -Wert. $C_s = 2j/(x+y)$. Mit j = Anzahl der gemeinsamen Banden von x und y ; x = Anzahl der Banden in x ; y = Anzahl der Banden von y . Spur 1: Biofilm Stelle 1, Sommer. Spur 2: Biofilm Stelle 2, Sommer. Spur 3: Biofilm Ablauf Kläranlage, Winter. Spur 4: Stelle 1, Winter. Spur 5+6: Spur 1 und 2, Frühling. Spur 7+8: Stelle 1 und 2, Sommer und Spur 9: Stelle 1, Herbst.

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1,00								
2	0,46	1,00							
3	0,36	0,34	1,00						
4	0,20	0,40	0,49	1,00					
5	0,31	0,32	0,27	0,57	1,00				
6	0,18	0,11	0,29	0,36	0,39	1,00			
7	0,34	0,43	0,25	0,29	0,34	0,29	1,00		
8	0,31	0,34	0,22	0,29	0,21	0,29	0,29	1,00	
9	0,15	0,47	0,36	0,23	0,36	0,28	0,29	0,19	1,00

3.1.3 Charakterisierung von Bakterien in Biofilmen

In dieser Arbeit soll nicht nur auf die Pilze in Biofilmen eingegangen werden, sondern auch auf die Bakterienpopulation. Bakterien weisen im Biofilm völlig andere Eigenschaften auf, als im planktonischen Zustand. Bisher konnte noch keine Bakterienart beobachtet werden, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nur in planktonischer Form vorkommt, da Bakterien die sessile Lebensweise im Vergleich zum planktonischen Wachstum bevorzugen (Christensen, 1989; Carpentier & Cerf, 1993).

3.1.3.1 Die Diversität von Bakterien im Biofilm ist groß

Auch von der Bakterienpopulation in schon vorhandenen Biofilmen wurde eine Klonbibliothek erstellt. Dazu wurden Biofilme aus dem Zulauf und Ablauf der

Kläranlage Karlsruhe-Neureut und aus der Alb entnommen. Diese wurden an der Betonwand des Beckens und in der Alb von Steinen abgekratzt.

Die genomische DNA des jeweiligen Biofilms wurde mit Hilfe des Innu SPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) isoliert. Anschließend wurde eine PCR mit dem Primerpaar 27F und 517R durchgeführt. Diese Primer binden an der eubakteriellen 16S rDNA und es entsteht ein 526 bp großes PCR-Produkt. Dieses wurde wiederum in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert. Es wurden 25 Kolonien gepickt, in eine Colony PCR mit den Primer M13 und T7 eingesetzt und mit *MspI* verdaut, um die unterschiedlichen Sequenzen zu detektieren, die schließlich sequenziert und mit dem Onlinetool BLAST ausgewertet wurden. Das Ergebnis der Klonbibliothek ist in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Identifizierte Bakterien aus schon vorhandenen Biofilmen der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und der Alb bei Karlsruhe. Zur Identifizierung der Bakterien wurde eine Klonbibliothek mit den PCR Produkten der 27F und 517R Primer in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels Sequenzierung mit den Primern M13/T7 und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST.

Spezies	Ordnung	Quelle
<i>Acinetobacter sp.</i>	Pseudomonadales	Zulauf
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Pseudomonadales	Zulauf
<i>Actinobacterium</i> MSB2127		Alb
<i>Arenimonas sp.</i>	Xanthomonadales	Ablauf
<i>Brevundimonas sp.</i>	Caulobacterales	Zulauf
<i>Chryseobacterium sp.</i>	Flavobacteriales	Zulauf
<i>Chryseobacterium hispanicum</i>	Flavobacteriales	Zulauf
<i>Corynebacterium variabile</i>	Actinomycetales	Zulauf
<i>Dechloromonas sp.</i>	Rhodocyclales	Alb
<i>Duganella sp.</i>	Burkholderiales	Zulauf
<i>Janthinobacterium sp.</i>	Burkholderiales	Zulauf
<i>Leptothrix sp.</i>	Burkholderiales	Zulauf
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadales	Zulauf

<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	Xanthomonadales	Ablauf
<i>Ralstonia sp.</i>	Burkholderiales	Alb
<i>Rhodocyclus sp.</i>	Rhodocyclales	Alb
Rickettsiella Symbiont von <i>Asellus aquaticus</i>	Legionellales	Ablauf, Alb
Bacterioidetes		Alb
Beta Proteobacterium		Ablauf, Alb
Burkholderiales	Burkholderiales	Alb
Gamma Proteobacterium		Alb
Spingobacteriales	Spingomonadales	Ablauf

Es wurden viele unterschiedliche Bakterienarten in den drei verschiedenen Biofilmen gefunden, die zur besseren Übersicht und Verteilung der Häufigkeit der einzelnen Arten in einem Diagramm in Abbildung 15 dargestellt sind.

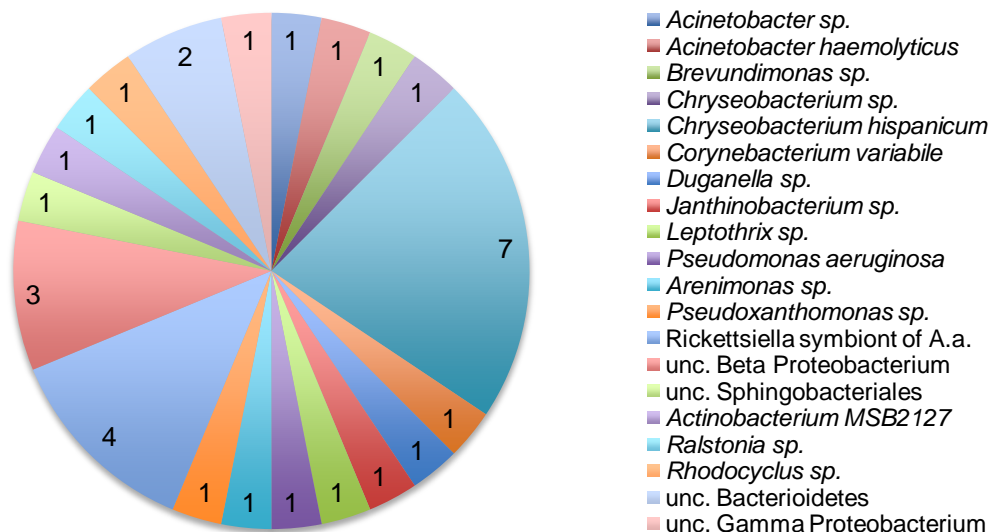


Abbildung 15: Verteilung der Arten anhand der Anzahl der gefundenen Sequenzen im Biofilm.
Die Anzahl der gefundenen Arten ist im Diagramm dargestellt.

Mit sieben gefundenen Arten kommt *Chryseobacterium hispanicum* im Zulauf am häufigsten, gefolgt von Rickettsiella, einem Symbiont von *Asellus aquaticus*. Die

Verteilung anhand der Ordnung der gefundenen Bakterienarten im Biofilm ist in Abbildung 16 zu sehen. Die Ordnung Flavobacteriales ist mit acht gefundenen Arten die am Häufigsten vorkommende, gefolgt von Legionellales und Burkholderiales mit jeweils vier Arten.

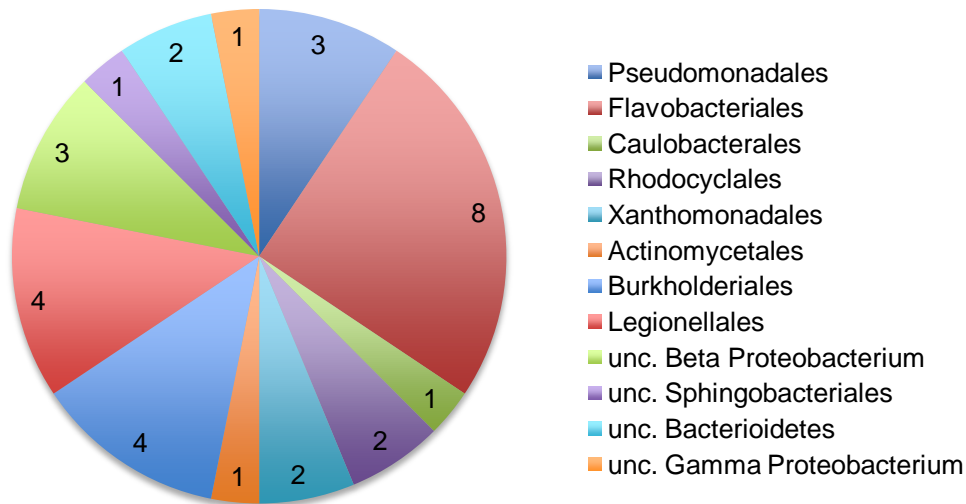


Abbildung 16: Verteilung der vorkommenden Ordnungen in den Klonbibliotheken der Biofilme aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und der Alb. Die Anzahl der gefundenen Arten einer Ordnung ist im Diagramm dargestellt.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Bakterienspezies wurden auch Arten gefunden, die zuvor anhand ihrer Sequenz noch nicht beschrieben wurden. Im Biofilm aus dem Zulauf der Kläranlage wurden sechs Sequenzen von Bakterien gefunden, die noch nicht bekannt sind. Im Biofilm aus dem Ablauf waren es 17 Arten und in der DNA aus dem Biofilm der Alb wurden elf Sequenzen gefunden, die zuvor noch nicht beschrieben wurden.

3.1.3.2 Bakterien können neue Biofilme auf Glas bilden

Im Vergleich zu den schon ausgereiften Biofilmen, wurden auch hier Biofilme in der Alb und im Zu- und Ablauf der Kläranlage angezogen und schließlich eine Klonbibliothek erstellt. Dazu wurden Glasobjektträger in einer Glasbox für vier Wochen in dem entsprechenden Gewässer ausgehängt. Anschließend wurden die Objektträger mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült, um nicht anhaftende Organismen zu entfernen. Der Biofilm wurde mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und schließlich die DNA mit dem Innu SPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) isoliert.

Es folgte eine PCR mit dem Primerpaar 27F und 517R. Das Amplifikat wurde in den pCR2.1-TOPO Vektor kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert. Es wurden 25 Kolonien gepickt und mit *MspI* verdaut, um die unterschiedlichen Sequenzen zu detektieren, die schließlich sequenziert und mit dem Onlinetool BLAST ausgewertet wurden. Das Ergebnis der Klonbibliothek ist in Tabelle 7 zu sehen. Die Diversität in den Biofilmen auf der Glasoberfläche ist hoch. Zusätzlich zu den in Tabelle 7 aufgelisteten Arten wurden in jedem Biofilm noch Arten gefunden, die anhand ihrer Sequenz noch nicht beschrieben wurden. Im Biofilm auf der Glasoberfläche, der im Ablauf der Kläranlage inkubiert wurde, wurden 17 Arten gefunden, deren Sequenz noch nicht beschrieben wurde. Im Biofilm, der in den Gewässern der Alb auf Glas wuchs, entstanden 13 Arten und im Biofilm aus dem Zulauf der Kläranlage acht Arten.

Tabelle 7: Identifizierte Bakterien aus Biofilmen von einer Glasoberfläche, die im Zulauf und Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, sowie der Alb bei Karlsruhe angezogen wurden. Zur Identifizierung der Bakterien wurde eine Klonbibliothek mit den PCR Produkten der 27F und 517R Primer in *E. coli* erstellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte mittels Sequenzierung mit den Primern M13/T7 und anschließender Auswertung mit dem Onlinetool BLAST.

Spezies	Ordnung	Isolat
<i>Arcobacter sp.</i>	Campylobacterales	Zulauf
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Campylobacterales	Zulauf
<i>Cellvibrio sp.</i>	Pseudomonadales	Ablauf
<i>Cyanobacterium sp.</i>	Chroococcales	Alb
<i>Dechloromonas sp.</i>	Rhodocyclales	Alb
<i>Duganella zoogloeooides</i>	Burkholderiales	Alb
<i>Flavobacterium sp.</i>	Flavobacteriales	Ablauf
<i>Flavobacterium limicola</i>	Flavobacteriales	Ablauf
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	Burkholderiales	Alb
Rickettsiella Symbiont von <i>Asellus aquaticus</i>	Legionellales	Ablauf
<i>Trichococcus sp.</i>	Lactobacillales	Zulauf
Altererythrobacter	Sphingomonadales	Alb
Bacterioidetes		Ablauf, Zulauf

Beta Proteobacterium	Ablauf, Alb
Clostridiales	Zulauf
Deltaproteobacterium	Zulauf
Fusobacteria	Zulauf
Verrucomicrobia	Ablauf

Zur besseren Übersicht, wurde die Anzahl der jeweiligen gefundenen Art in einem Diagramm (siehe Abbildung17) dargestellt. Die am häufigsten isolierte DNA-Sequenz war die von *Arcobacter sp.* und *Arcobacter cryaerophilus* mit jeweils vier gefundenen DNA-Sequenzen, gefolgt von Arten der Bacterioidetes und der Beta Proteobakterien.

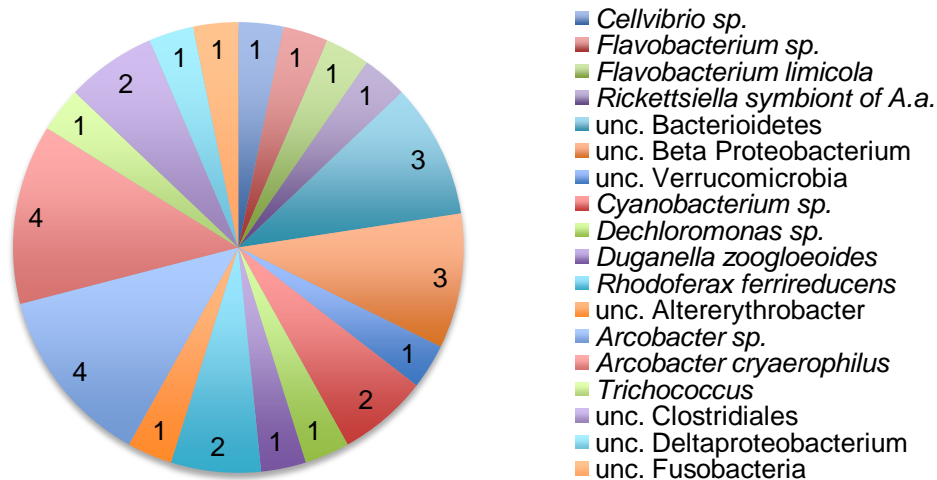


Abbildung 17: Verteilung der Arten anhand der Anzahl der gefundenen Sequenzen in den Biofilmen auf den Glasoberflächen. Die Anzahl der gefundenen Arten ist im Diagramm dargestellt.

In Abbildung 18 ist die Verteilung der Arten anhand ihrer Ordnung in einem Diagramm dargestellt.

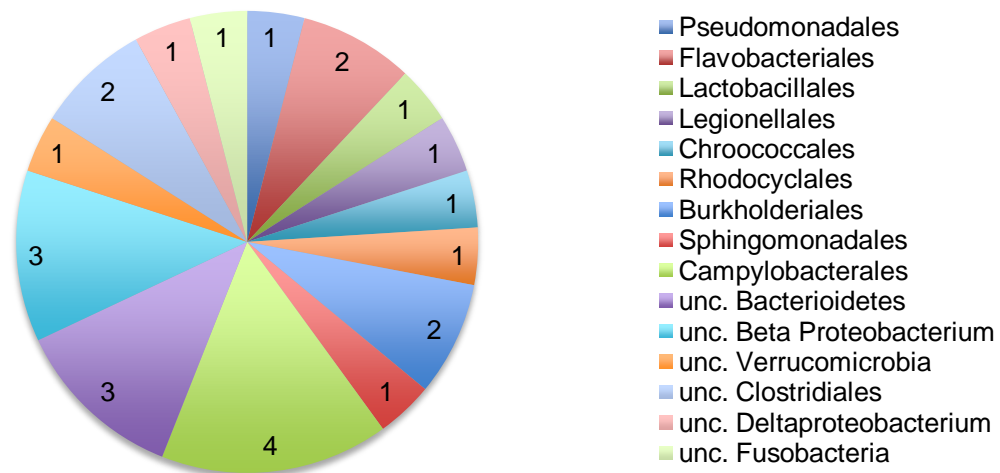


Abbildung 18: Verteilung der vorkommenden Ordnungen in den Klonbibliotheken der Biofilme aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und der Alb. Die Anzahl der gefundenen Arten einer Ordnung ist im Diagramm dargestellt.

3.1.3.3 Vergleich der Bakterienpopulation zwischen den Biofilmen

Zur weiteren Analyse der verschiedenen Biofilme, wurde die Biofilmpopulation qualitativ mit Hilfe einer molekularbiologischen Fingerabdruck-Methode, PCR-DGGE, untersucht (Muyzer *et al.* 1993; Emtiazi *et al.* 2003). Mit Hilfe dieser Methode, konnten die Unterschiede in der Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft zwischen zwei Probenahmestellen in der Kläranlage Karlsruhe-Neureut im Sommer, vom Ablauf der Kläranlage im Winter und von einer Glasfläche, die in der Alb im Winter inkubiert wurde, detektiert werden.

Die isolierte Biofilm DNA wurde als Template in eine PCR mit dem Primerpaar 27F und 517R eingesetzt. Die 526 bp großen PCR-Produkte wurden schließlich mit Hilfe der DGGE aufgetrennt. Das Gel lief für 16 Stunden bei 56°C und 70 V. In Abbildung 19 ist das Gelbild der DGGE mit den aufgetragenen Bakterienproben zu sehen. Insgesamt liegt eine hohe eubakterielle Diversität in den einzelnen Biofilmproben vor. Pro isolierter eubakterieller DNA aus dem Biofilm sind zwischen 27 und 46 Banden, also Arten, zu sehen. Die genaue Anzahl steht am unteren Teil des Gels. Die Diversität ist im Ablaufbiofilm und im Zulaufbiofilm von der ersten Stelle am höchsten und im Biofilm auf der Glasoberfläche am geringsten.

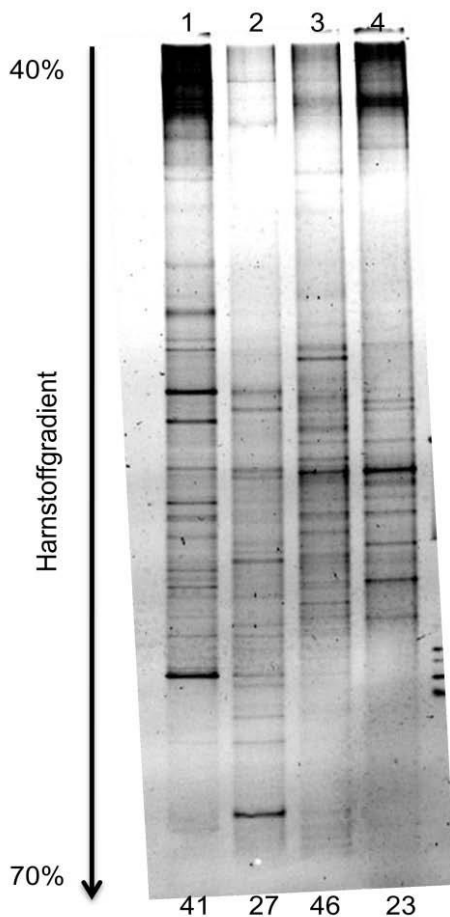


Abbildung 19: PCR-DGGE Analyse von Bakterien aus verschiedenen Biofilmen. Die DNA wurde aus den jeweiligen Biofilmen isoliert und in eine PCR mit den Primern 27F und 517R eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden schließlich auf das denaturierende Gel aufgetragen. Spur 1 zeigt die aufgetrennten Banden von einem Biofilm der Stelle 1 aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, Spur 2 von der Stelle 2 aus der Kläranlage, Spur 3 zeigt das aufgetrennten PCR-Produkt eines Biofilms aus dem Ablauf der Kläranlage und Spur 4 von einem Biofilm, der aus einer Glasoberfläche in der Alb herangezogen wurde. Die Richtung der Elektrophorese ist die gleich wie die des Harnstoffes, wo der Gradient zwischen 40% und 70% liegt. Das Gel lief bei 56°C und 70 V für 16 Stunden. Die Anzahl der vorhandenen DNA Banden ist am Ende jeder Spur aufgeführt.

Der Dice Koeffizient für den paarweisen Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften gibt die prozentuale Ähnlichkeit der einzelnen Biofilme an (siehe Tabelle 8). Der prozentuale Anteil an gemeinsamen Bakterienarten ist bei diesen Biofilmproben nicht so hoch. Die größte Übereinstimmung ist bei den beiden Proben aus der Kläranlage (Stelle 1 und 2) und zwischen dem Biofilm aus dem Ablauf und dem von der Glasoberfläche aus der Alb, mit jeweils 38%. Die Probenahmestelle in der Alb liegt direkt hinter dem Ablauf der Kläranlage und es konnten sich viele der dort im Biofilm wachsenden Bakterien auf der Glasoberfläche anlagern und einen neuen Biofilm bilden.

Tabelle 8: Vergleich der PCR-DGGE Fingerabdrücke der Bakterien vonden verschiedenen Biofilme mit dem Dice Koeffizienten. Angegeben ist der C_s -Wert. $C_s=2j/(x+y)$. Mit j = Anzahl der gemeinsamen Banden von x und y ; x = Anzahl der Banden in x ; y = Anzahl der Bande von y . Spur 1 zeigt die aufgetrennten Banden von einem Biofilm der Stelle 1 aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, Spur 2 von der Stelle 2 aus der Kläranlage, Spur 3 zeigt das aufgetrennten PCR-Produkt einen Biofilms aus dem Ablauf der Kläranlage und Spur 4 von einem Biofilm, der aus einer Glasoberfläche in der Alb herangezogen wurde.

Spur	1	2	3	4
1	1,00			
2	0,38	1,00		
3	0,32	0,30	1,00	
4	0,25	0,36	0,38	1,00

3.2 Untersuchung des Biofilmwachstums am Beispiel von *A. nidulans* und *F.oxysporum*

Über die Anpassung von filamentösen Pilzen an das Wachstum von Biofilmen ist noch nicht viel bekannt, weshalb das Biofilmwachstum am Beispiel von *A. nidulans* und *F. oxysporum* analysiert werden sollte. Der Einfluss von verschiedenen Agenzien auf das Biofilmwachstum von *F. oxysporum* wurde getestet, ebenso die Expression von Stressgenen und die Fähigkeit von verschiedenen Mutanten einen Biofilm auszubilden.

3.2.1 *A. nidulans*kann einen Biofilmbilden

A. nidulans ist ein filamentöser, homothallischer Schimmelpilz, welcher ubiquitär im Boden verbreitet ist. Er gehört zur Klasse der Ascomyceten und ist zur sexuellen, sowie asexuellen Entwicklung fähig (Pontecorvo *et al.* 1953; Clutterbuck, 1969). Wächst ein frei lebender Organismus in einem Biofilm, so passt er sich den dortigen Bedingungen an (Costerton *et al.* 1995; Costerton *et al.* 1999). Um zu untersuchen wie sich ein Pilz an das Leben im Biofilm anpassen kann, wurde *A. nidulans* ausgewählt, da dessen Genom vollständig sequenziert ist und er als Modellorganismus der filamentösen Pilze gilt (Galagan *et al.* 2005). Des Weiteren ist sein Genom leicht zugänglich und er ist leicht zu handhaben (Sievers *et al.*1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb überprüft, ob *A. nidulans* in einem Biofilm wachsen kann.

Dazu wurde das Plasmid pJH19 verwendet, das eine Kernlokalisierungsdomäne (des Gens *stuA*) gekoppelt an *DsRed* besitzt und unter dem konstitutiven Promotor der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpdA*) steht. Dieses Plasmid wurde in den *A. nidulans* Wildtypstamm FGSC4 transformiert (SJZ02). Mit Hilfe dieser Eigenschaft konnte direkt fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden, ob *A. nidulans* im Biofilm wachsen kann. Dazu wurde eine Glasbox mit Glasobjektträger und 200 ml Komplexmedium, 10^5 Sporen von SJZ02 und 100 μ l konzentrierter Ablauf der Kläranlage Karlsruhe beimpft. Die Objektträger wurden bei 37°C inkubiert und nach sieben und zehn Tagen und nach 15 Wochen mikroskopiert.

Bei der mikroskopischen Untersuchung konnte *A. nidulans* im Biofilm nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20). Seine Sporen waren fest im Biofilm eingebettet, was durch mehrfaches Spülen mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung sichergestellt wurde.

Nach sieben Tage Inkubation ist nur eine Spore zu erkennen, die noch nicht ausgekeimt ist, nach zehn Tagen kann man ausgekeimte Hyphen erkennen und nach 15 Wochen ist ein ausgebreitetes Hyphennetz zu erkennen.

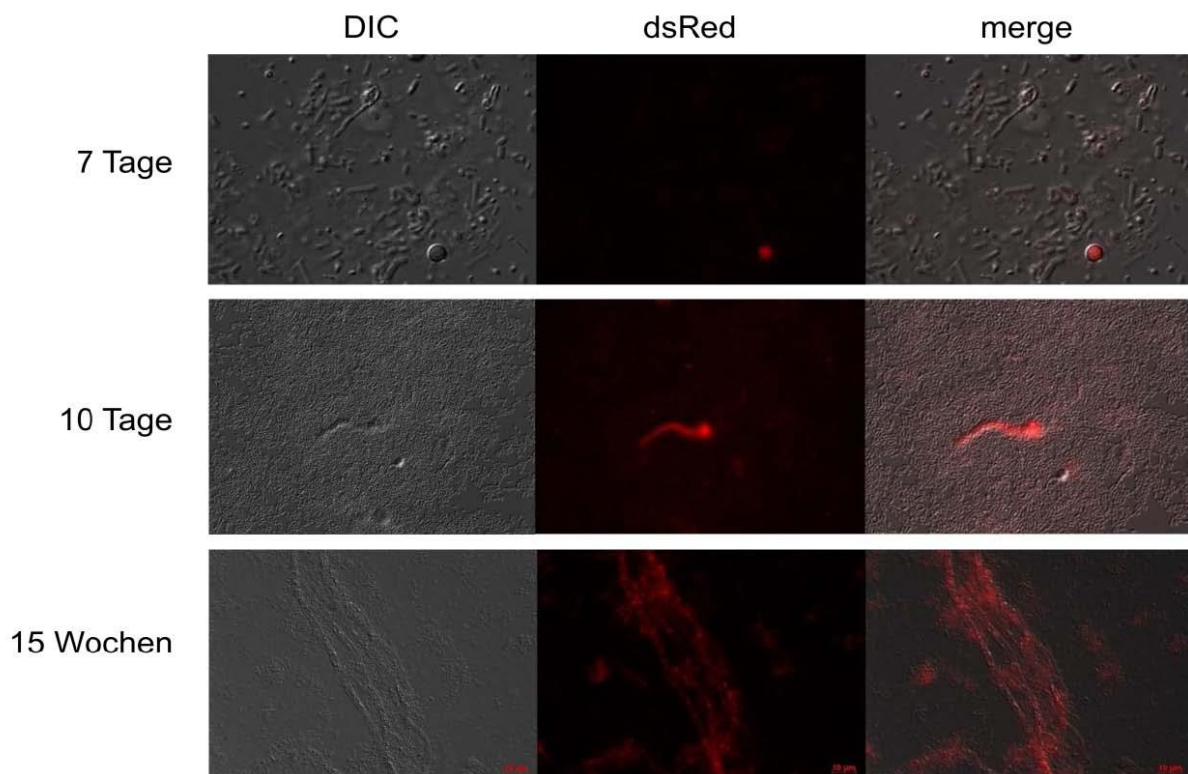


Abbildung 20: *A. nidulans* im Biofilm. In *A. nidulans* wurde die Kernlokalisierungsdomäne von *StuA* mit N-terminalem *DsRed* eintransformiert, um ihn mikroskopisch besser zu erkennen. Die Abbildung zeigt das Wachstum von *A. nidulans* im Biofilm nach 7 und 10 Tagen und nach 15 Wochen. Es wurden 10^5 Sporen von SJZ02 und 200 μ l konzentrierter Ablauf in einer Glasbox mit Objektträgern

und 200 ml Komplexmedium angeimpft. Anschließend wurde der Objektträger mit steriler 0,85% Natriumchlorid-Lösung gewaschen und nicht anhaftende Organismen zu entfernen.

Es konnte gezeigt werden, dass *A. nidulans*, wenn auch nur sehr langsam, einen Biofilm bilden und darin wachsen kann.

3.2.2 Untersuchung des Biofilms anhand von *F. oxysporum*

Da *A. nidulans* im Biofilm zwar wachsen kann, dies aber nur sehr langsam, wurde nach einem anderen filamentösen Pilz gesucht, um das Biofilmwachstum zu untersuchen. Als erstes wurde nach filamentösen Pilzen gesucht, deren Genom bereits sequenziert ist und von denen bekannt ist, ob sie im Biofilm wachsen können. Dabei fiel die Wahl auf *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* und *Fusarium oxysporum*. *A. flavus* und *A. fumigatus* schieden aus, da sie die Sicherheitsstufe S2 haben und *A. niger*, da es noch nicht eindeutig sicher ist, ob er wirklich im Biofilm wachsen kann. Somit fiel die Wahl auf *F. oxysporum*, von dem es einige Publikationen gibt, die belegen, dass er im Biofilm wachsen kann (Raad & Hachem, 1995; Elvers *et al.* 2000; Imamura *et al.* 2008; Ramani & Chaturvedi, 2011). Es wurde gezeigt, dass der Pilz Biofilme auf Kontaktlinsen, Venenkathetern und zusammen mit *Stenotrophomonas maltophilia* bilden kann.

In dieser Arbeit sollte das Biofilmwachstum anhand des filamentösen Ascomyceten *F. oxysporum* untersucht werden.

3.2.2.1 *F. oxysporum* kann einen Biofilm auf Glasoberflächen bilden

Um das Biofilmwachstum von *F. oxysporum* in unseren Ansätzen zu bestätigen, wurde hier die Biofilmbildung auf Glasoberflächen untersucht.

Um den Pilz später im Biofilm wieder zu erkennen, wurde das Plasmid pNRPK2GFP1, das die Kernlokalisierungsdomäne *stuA* mit *gfp* unter dem konstitutiven Promotor *gpdA* besitzt, in den Wildtypstamm 4287 transformiert. Dieses Plasmid wurde gewählt, damit der Zellkern leuchtet und somit nur die lebenden Zellen detektiert werden, des Weiteren weisen Pilzhyphen öfters eine Autofluoreszenz auf, weshalb das GFP nicht im Cytoplasma exprimiert wurde. Da jedoch niemand in unserem Labor mit diesem Pilz gearbeitet hat, stellte sich dies als schwieriger wie erwartet heraus. Zuerst wurde das Transformationsprotokoll von *Alternaria alternata* verwendet, da dieser Pilz *F. oxysporum* sehr ähnlich ist und in

unserem Labor damit gearbeitet wird. Jedoch funktionierte die Transformation mit dieses Protokoll nicht, woraufhin das Protokoll für die Transformation von *Fusarium fujikuroi* von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Bettina Tudzynski von der Universität Münster verwendet wurde, die freundlicherweise auch den Wildtypstamm von *F. oxysporum* zur Verfügung stellte. Das Plasmid besitzt zur Selektion eine Hygromycin-Resistenzkassette, sodass nur die Protoplasten auf Medium mit Hygromycin wachsen können, die das Plasmid aufgenommen haben. Zur Analyse der Transformanten, wurden diese mikroskopisch untersucht und der Zellkern mit Hoechst (siehe Punkt 5.6.3) gegengefärbt. Der positive Transformant, SJZ03, wurde schließlich für die Biofilmuntersuchungen verwendet.

Die Untersuchungen wurden mit dem in Punkt 3.1.1.2 beschriebenen Biofilmassay gemacht. Dazu wurden die Plastikröhren (siehe Punkt 5.5.3) mit Komplexmedium oder synthetischem Abwasser gefüllt und schließlich mit 10^7 Sporen angeimpft. Für die Herstellung der Sporensuspension wurde Myzel mit etwas Medium von der bewachsenen Agarplatte abgekratzt und schließlich über steriles Miracloth filtriert, um restliches Myzel zu entfernen. An die Plastikröhren war eine Schlauchpumpe angeschlossen, die das Medium mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 ml/min durch die mit Glasobjektträgern bestückten Plastikröhren pumpte, die bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das Biofilmwachstum wurde nach 16, 24 und 40 Stunden mikroskopisch untersucht. Um sicher zu stellen, dass nur die im Biofilm anhaftenden Organismen untersucht werden, wurden die Glasobjektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült. Dieser Versuch wurde zum einen nur mit *F. oxysporum* durchgeführt und zusätzlich noch mit konzentriertem Ablauf aus der Kläranlage als Inokulum.

In Abbildung 21 ist das Biofilmwachstum von *F. oxysporum* in Komplexmedium anhand mikroskopischer Aufnahmen zu sehen. Bereits nach 16 Stunden sind ausgekeimte Sporen an der Oberfläche angehaftet und nach 40 Stunden sind bereits kompakte Hyphengeflechte zu sehen.

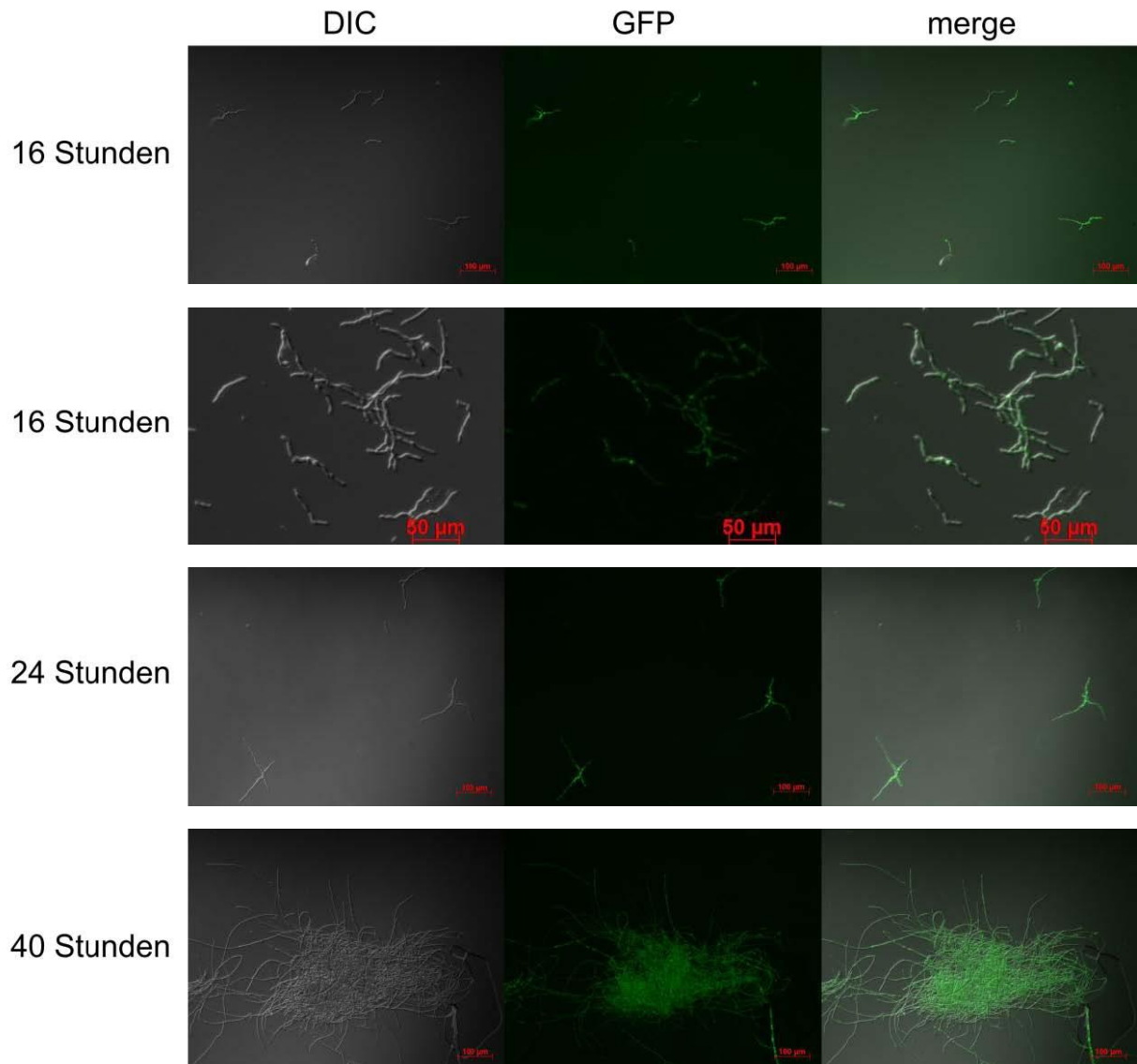


Abbildung 21: Biofilmbildung von *F. oxysporum* auf Glas in Komplexmedium. 10^7 Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) wurden mit Komplexmedium in Röhren mit Glasobjektträger bei einer konstanten Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min bei Raumtemperatur für 16, 24 und 40 Stunden inkubiert. Vor dem mikroskopieren wurden die Objektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

Zusätzlich zur Biofilmbildung in Komplexmedium, wurde auch die Biofilmbildung mit synthetischem Abwasser als Nahrungsquelle untersucht. Synthetisches Abwasser entspricht in seiner organischen Belastung kommunalem Abwasser. Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen wie mit Komplexmedium durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt. Hier scheinen sich nach 16 Stunden bereits mehr ausgekeimte Hyphen an die Oberfläche angelagert zu haben. Auch waren nach 40 Stunden bereits mehr Hyphennester zu sehen als in den Proben, die in Komplexmedium gewachsen sind.

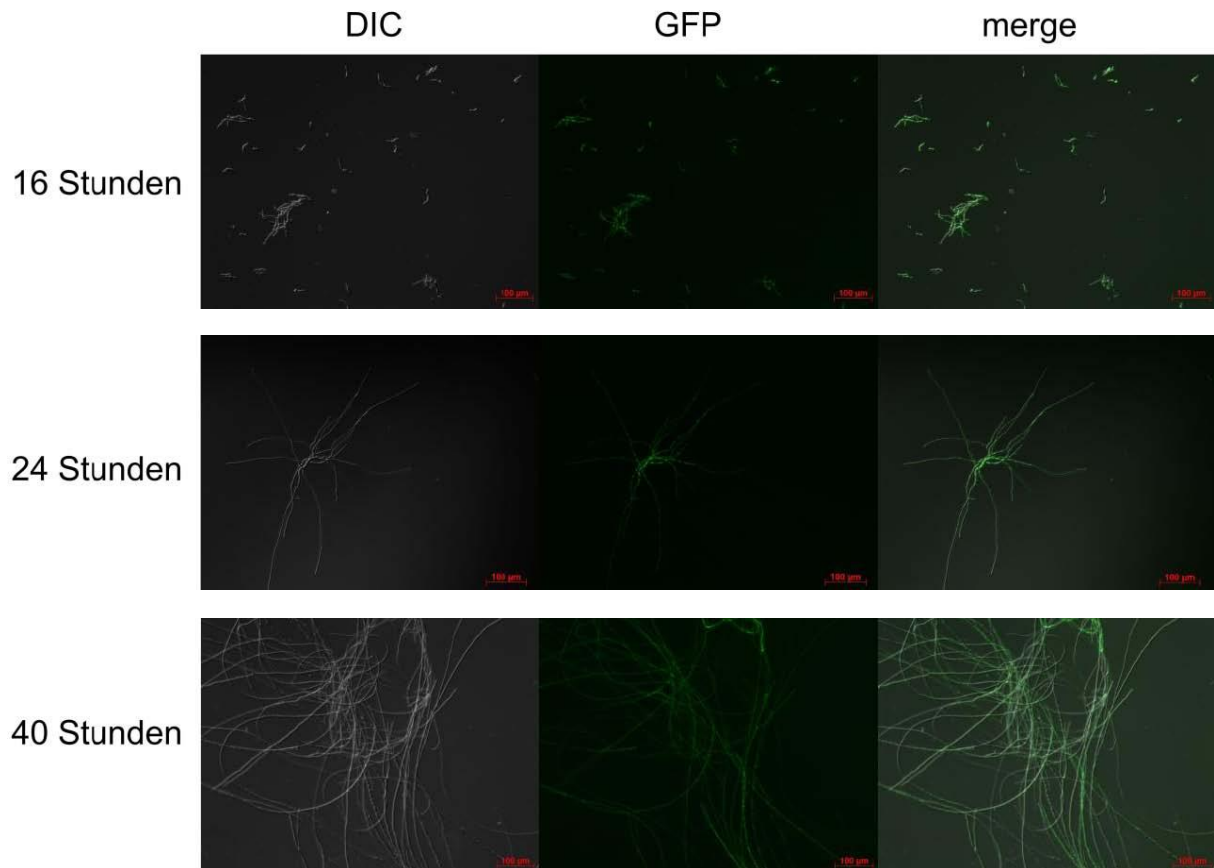


Abbildung 22: Biofilmbildung von *F. oxysporum* auf Glas in synthetischem Abwasser. 10^7 Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) wurden mit synthetischem Abwasser in Röhren mit Glasobjektträger bei einer konstanten Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min bei Raumtemperatur für 16, 24 und 40 Stunden inkubiert. Vor dem mikroskopieren wurden die Objektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich *F. oxysporum* bei der Biofilmbildung verhält, wenn noch andere Mikroorganismen im umgebenden Medium vorhanden sind. Dazu wurde zusätzlich zu den Sporen noch pro Liter Medium 1 ml konzentriertes Ablauf-Abwasser aus der Kläranlage Karlsruhe zugegeben. Dieses Inokulum zeichnet sich durch eine hohe Diversität an Mikroorganismen aus. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

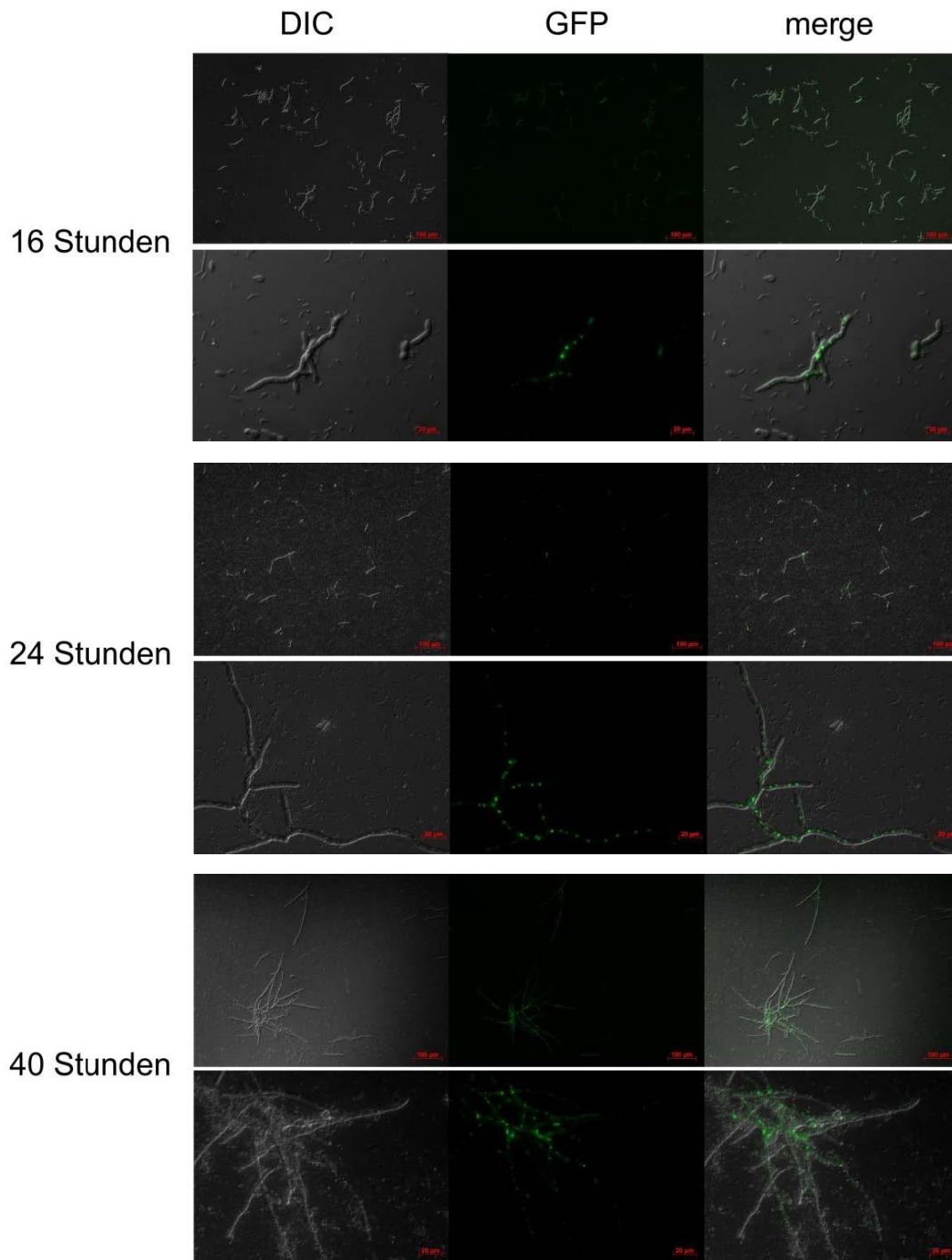


Abbildung 23: Biofilmbildung von *F. oxysporum* auf Glas in Komplexmedium mit konzentriertem Ablauf-Abwasser als Inokulum 10^7 Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) wurden mit Komplexmedium in Röhren mit Glasobjektträger bei einer konstanten Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min bei Raumtemperatur für 16, 24 und 40 Stunden inkubiert. Vor dem mikroskopieren wurden die Objektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

Auch hier wurde das Wachstum in synthetischem Abwasser untersucht, um heraus zu finden, ob sich die Anlagerung der Pilze und anderen Mikroorganismen anders

verhält, wenn das Medium dem von der Kläranlage entspricht. In Abbildung 24 kann man erkennen, dass *F. oxysporum* bereits nach 16 Stunden zahlreich im Biofilm vorhanden ist.

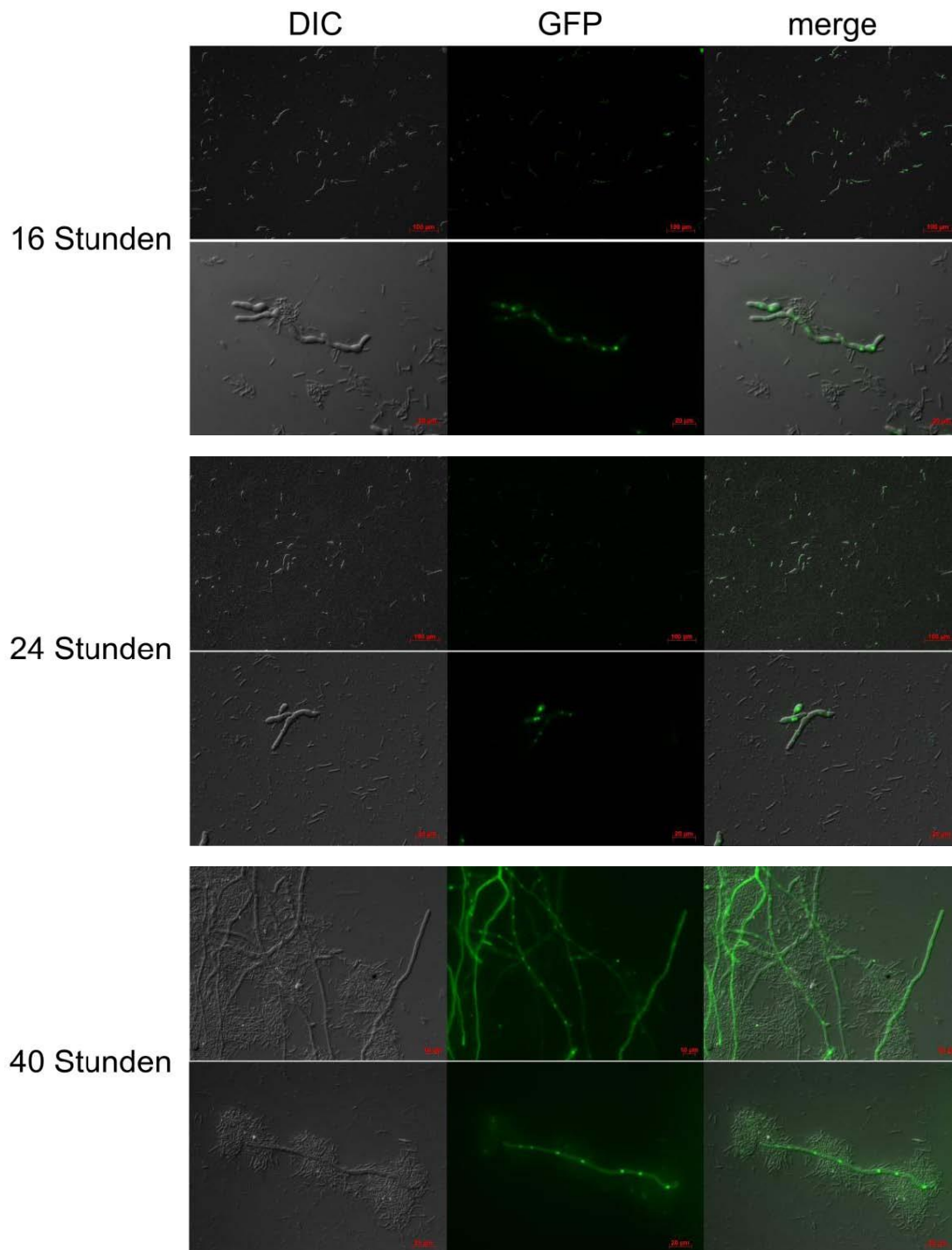


Abbildung 24: Biofilmbildung von *F. oxysporum* auf Glas in synthetischem Abwasser mit konzentriertem Ablauf-Abwasser als Inokulum. 10^7 Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) wurden mit synthetischem Abwasser in Röhren mit Glasobjektträger bei einer konstanten Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min für 16, 24 und 40 Stunden inkubiert. Vor dem mikroskopieren wurden die Objektträger mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

3.2.2.2 Der pH-Wert beeinträchtigt die Biofilmbildung

Zusätzlich soll hier der Einfluss des pH-Wertes auf die Biofilmbildung untersucht werden, da im Biofilm Gene für die Stressantwort in Bezug auf pH-Werte vermehrt exprimiert werden (siehe Punkt 3.2.3.6).

Die Biofilmbildung unter verschiedenen pH-Bedingungen wurde fluoreszenzmikroskopisch und durch Messung der Intensität des Fluoreszenzsignals untersucht. Zuerst wurde die Biofilmbildung mikroskopisch untersucht. Dafür wurden Glasobjektträger in einer Glasbox mit 200 ml Komplexmedium (pH 5 und pH 8) und 10^5 Sporen von SJZ03 angeimpft. Die Objektträger wurden vor dem Mikroskopieren mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült. Untersucht wurde die Biofilmbildung nach 48 Stunden und sieben Tagen bei einer Wachstumstemperatur von 28°C. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 zu sehen. Die Sporen können sich bei pH 5 und pH 8 zwar an die Glasoberfläche anheften, jedoch nicht auskeimen, wie es bei pH 6.5 der Fall ist (siehe Abbildung 21).

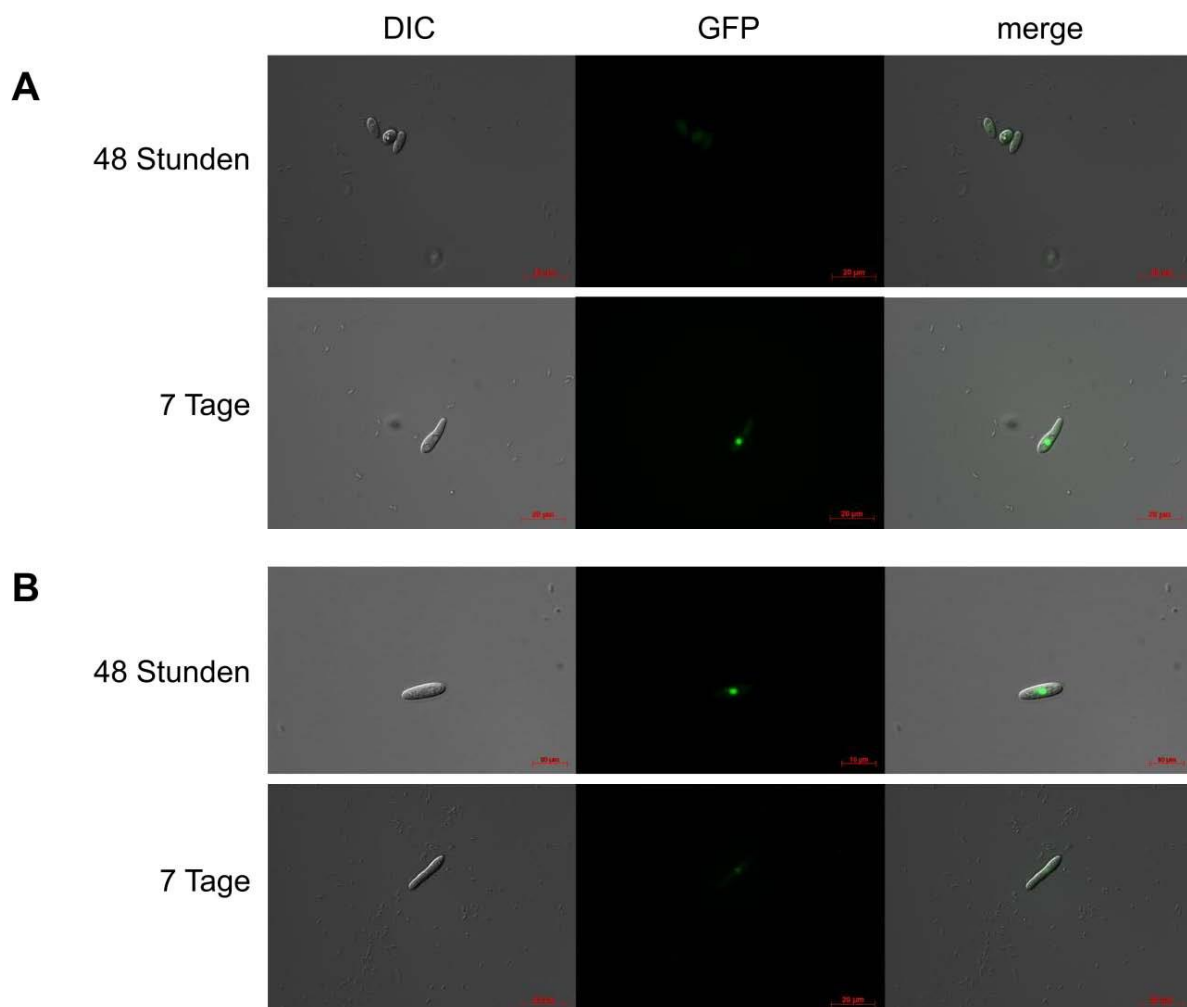


Abbildung 25: Biofilmbildung von *F. oxysporum* auf Glas unter verschiedenen pH-

Bedingungen 10^5 Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) wurden mit Komplexmedium in einer Glasbox mit Glasobjektträgern bei Raumtemperatur für 48 Stunden und sieben Tage inkubiert. Vor dem mikroskopieren wurden die Objektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült. **(A)** Hier wurde Komplexmedium pH 5.0 verwendet. **(B)** Hier wurden die Sporen in Komplexmedium pH 8.0 angeimpft. Die Sporen sind im Vergleich zu pH 6.5 (siehe Abbildung 21) selbst nach sieben Tagen noch nicht ausgekeimt.

Zur Messung des Biofilmwachstums anhand des Fluoreszenzsignals wurde der Stamm SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) gewählt. Dazu wurden 96-well Platten (BD Falcon 96 Flat transparent/black) aus Polystyren verwendet. Diese sind grau, nur der Boden der Mulde ist durchsichtig, um eine Streuung des Fluoreszenzsignals zu vermeiden. Die Mikrotiterplatten wurden mit je 200 μ l Komplexmedium und $2 \cdot 10^4$ Sporen angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für 48 Stunden. Anschließend wurden die Mulden zwei Mal mit 0,85% Natriumchlorid-Lösung gewaschen um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Das Fluoreszenzsignal, das der *Platereader* misst, wird relativ zueinander, also zwischen den Proben gemessen. Als Referenz wird die Mulde ausgewählt, bei der das größte Wachstum vermutet wird, was in diesem Fall pH 6.5 war. Es wurde Komplexmedium mit verschiedenen pH-Werten verwendet, um den Einfluss des pH-Wertes auf die Biofilmbildung zu bestimmen. Die Biofilmbildung bei pH 5; 6.5; 7.5; 8 und 9 wurde untersucht. Pro zu untersuchendem pH-Wert wurden zwei Ansätze pipettiert und daraus der Mittelwert berechnet. In Abbildung 26 ist das Ergebnis der Fluoreszenzmessung mit Hilfe des *Platereaders* zu sehen. Zwischen den einzelnen pH-Werten ist kein großer Unterschied im Wachstum zu erkennen. Bei pH-Wert 6.5, welches auch der normale pH-Wert von Komplexmedium ist, haben sich die meisten Sporen im Biofilm angelagert, hier ist die relative Fluoreszenz (gemessen in RFU, relative fluorescence unit) mit 1940 am höchsten. Bei pH 9 können sich am wenigstens Sporen und Hyphen im Biofilm am Muldenboden anheften, hier liegt die RFU bei nur 1513.

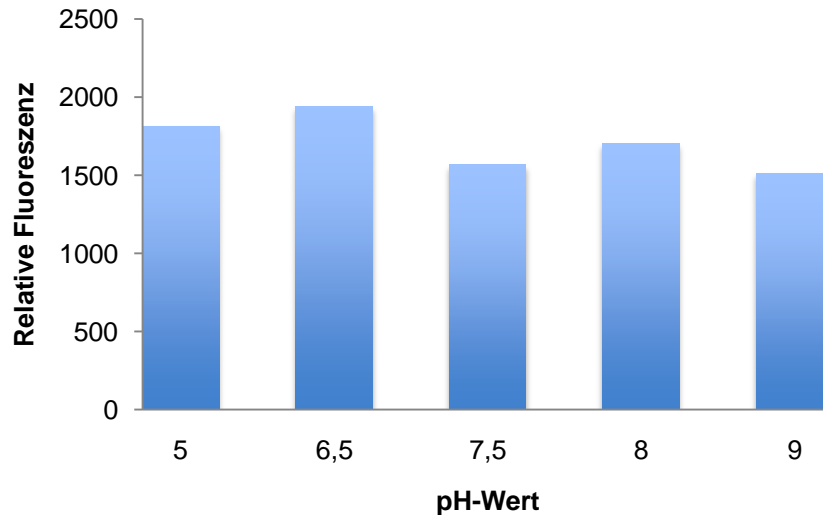


Abbildung 26: Messung der relativen Fluoreszenz zur Bestimmung des Wachstums von *F. oxysporum* im Biofilm. Es wurden Mulden von einer Mikrotiterplatte mit 200 μ l Komplexmedium mit verschiedenen pH-Werten mit $2 \cdot 10^4$ Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) angeimpft und bei 28°C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Mulden zwei Mal mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Pro Probe wurden zwei Ansätze pipettiert und der Mittelwert berechnet. Es wird die relative Fluoreszenz (RFU, relative Fluoreszenz Unit) berechnet, die sich auf einen Referenzwert, in diesem Fall pH 6,5, bezieht. Es sind keine großen Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen den einzelnen pH-Werten zu sehen.

3.2.3 Stressgene in *F. oxysporum*

In den Genomen von Bakterien bis Mensch sind Stressgene allgegenwärtig und sind üblicherweise hoch konserviert. Verschiedene Stressgen-Familien können anhand ihrer molekularen Masse sowie der Funktion ihrer Proteine unterschieden werden. Während Stresssituationen, wie beispielsweise Hitze oder chemische Stressoren (Alkohol, reaktiver Sauerstoff, hohe Salzkonzentration), ebenso biologische Faktoren (Wachstum, Hormone, Viren oder Bakterien), werden einige Mitglieder von Stressgenfamilien vermehrt exprimiert (Rensing *et al.* 1998).

In *F. oxysporum* sind bis jetzt hauptsächlich Stressgene bekannt, die auf eine Schwankung im pH-Wert reagieren, sowie eine schon beschriebene Histidin-Kinase.

3.2.3.1 Die Histidin-Kinase Fhk1

Histidin-Kinasen erlauben dem Organismus, seine Umgebung wahrzunehmen und darauf zu antworten (Bilwes *et al.* 1999). In *F. oxysporum* wurde bis jetzt eine Histidin-Kinase beschrieben.

Die Histidin-Kinase *fhk1* (Fusarium Histidin-Kinase 1) (FOXG_01684) aus *F. oxysporum* gehört zu den Klasse III Histidinkinasen (HK). Klasse III HK sind beim Dimorphismus wichtig, sowie bei der Virulenz von Humanpathogenen, wie zum Beispiel bei *Candidaalbicans* (Yamada-Okabe *et al.* 1999). Es wurde gezeigt, dass eine *fhk1* Deletionsmutante resistent gegenüber verschiedenen Fungiziden, wie Phenylpyrrol ist, und eine geringere Sensitivität gegenüber hyperosmotischem und osmotischem Stress, sowie eine reduzierte Virulenz gegenüber Tomatenpflanzen zeigt (Rispaill & Di Pietro, 2010). Mutanten, denen das *fhk1* Gen fehlt, sind in vielen Virulenzfunktionen, wie der Wurzelanheftung, der Wirt-Penetration oder in der vegetativen Hyphenfusion beeinträchtigt (Di Pietro *et al.* 2001; Delgado-Jarana *et al.* 2005; Prados Rosales & Di Pietro, 2008). *F. oxysporum* besitzt noch 21 weitere HK, deren Funktionen jedoch noch nicht bekannt sind (Rispaill & Di Pietro, 2010).

Das Gen, welches für *fhk1* codiert, hat eine Länge von 4069 Basenpaaren und besitzt fünf Introns. Das gebildete Fhk1 (siehe Abbildung 27) besteht laut Broad Institute aus 1089 Aminosäuren und besitzt vier HAMP-Domänen (Histidine Kinase, Adenylate Cyclase, Methyl Bindeprotein und Phosphatase) (660-981 bp, 1048-1257 bp, 1324-1533 bp und 1600-1870 bp). Außerdem sind eine His Kinase A (2249-2446 bp), eine ATPase (2585-1944 bp) und eine Responseregulator Receiver Domäne (3392-3813 bp) vorhanden.



Abbildung 27: Konservierte Domänen in Fhk1. Das Fhk1 Protein hat eine Länge von 1089 Aminosäuren und besitzt vier HAMP-Domänen (660-981 bp, 1048-1257 bp, 1324-1533 bp und 1600-1870 bp), eine His Kinase A (2249-2446 bp), eine ATPase (2585-1944 bp) und eine Responseregulator Receiver Domäne (3392-3813 bp).

Fhk1 weist eine hohe Homologie zu anderen Klasse III HK auf. Wie zum Beispiel zu Os1 von *Neurospora crassa* (80% Übereinstimmung), zu Hik1 von *Magnaporthe grisea* (78% Übereinstimmung), zu Bos1 von *Botrytis cinerea* (76% Übereinstimmung), zu Nika von *Aspergillus nidulans* (68% Übereinstimmung) und zu Dic1 aus *Cochliobolus heterostrophus*, wo die Homologie immerhin noch 64% beträgt. Das Alignment der entsprechenden Gene ist in Abbildung 28 dargestellt.

Anhand dieser Daten kann man davon ausgehen, dass *fhk1* ortholog zu *os-1* in *N. crassa* ist (Rispaill & Di Pietro, 2010).

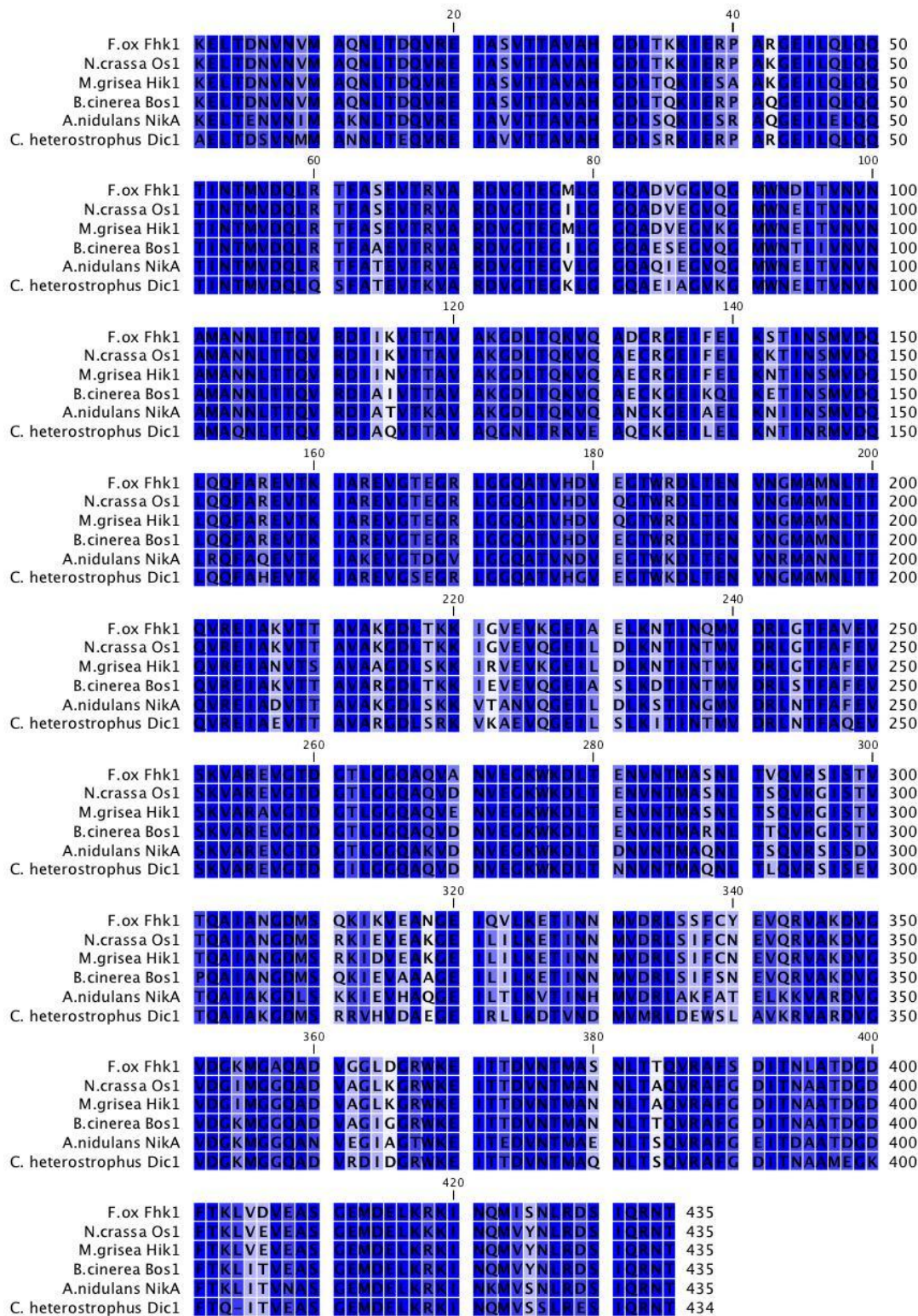


Abbildung 28: Alignment von Fhk1 aus *F. oxysporum* mit den homologen Proteinen Os1 aus *N. crassa*, Hik1 aus *M. grisea*, Bos1 aus *B. cinerea*, NikA aus *A. nidulans* und Dic1 aus *C. heterostrophus*. Das Alignment von Fhk1 mit Klasse III HK von anderen Pilzen zeigt eine hohe Gemeinsamkeit zu den Histidin Kinasen aus anderen Organismen.

3.2.3.2 Der pH-Response Transkriptionsfaktor PacC

Pilze haben einen effizienten Signalmechanismus entwickelt, um Schwankungen im pH-Wert zu erkennen und darauf zu reagieren. Der pH-Response Transkriptionsfaktor *pacC* (FOXG_02222) fungiert als eine Leitkomponente in diesem Signalweg, indem er als Transkriptionsaktivator von alkalisch exprimierten Genen, sowie als Repressor von Säure-induzierten Genen dient (Tilburn *et al.* 1995; Espeso & Arst, 2000). Das *pacC* Transkriptionslevel ist bei alkalischen Bedingungen am höchsten und unter sauren Wachstumsbedingungen am niedrigsten, unabhängig von der benutzten Kohlenstoffquelle (Caracuel *et al.* 2003).

Das Gen, welches für *pacC* codiert, hat eine Länge von 2636 Basenpaaren und besitzt drei Introns. Das gebildete PacC (siehe Abbildung 29) besteht aus 400 Aminosäuren und besitzt eine C₂H₂ Zinkfinger-Domäne (640-767 bp).



Abbildung 29: Konservierte Domäne von PacC: Das PacC Protein hat eine Länge von 400 Aminosäuren und besitzt eine C₂H₂ Zinkfinger-Domäne (640-767 bp).

PacC weist eine geringe Homologie zu PacC Transkriptionsfaktoren aus anderen Organismen auf (siehe Abbildung 30). Wie zum Beispiel zu PacC von *Aspergillus niger* (46 % Übereinstimmung), von *Aspergillus nidulans* (45% Übereinstimmung), von *Penicillium chrysogenum* (41% Übereinstimmung), von *Sclerotinia sclerotiorum* (45% Übereinstimmung) und zu PacC aus *Acremonium chrysogenum*, wo die Homologie mit 74% am Höchsten ist. In *A. nidulans* fungiert der Transkriptionsfaktor PacC als Aktivator von Genen, die unter alkalischen Bedingungen exprimiert werden und als Repressor von Genen, die unter sauren Bedingungen exprimiert werden (Penalva *et al.* 2008).

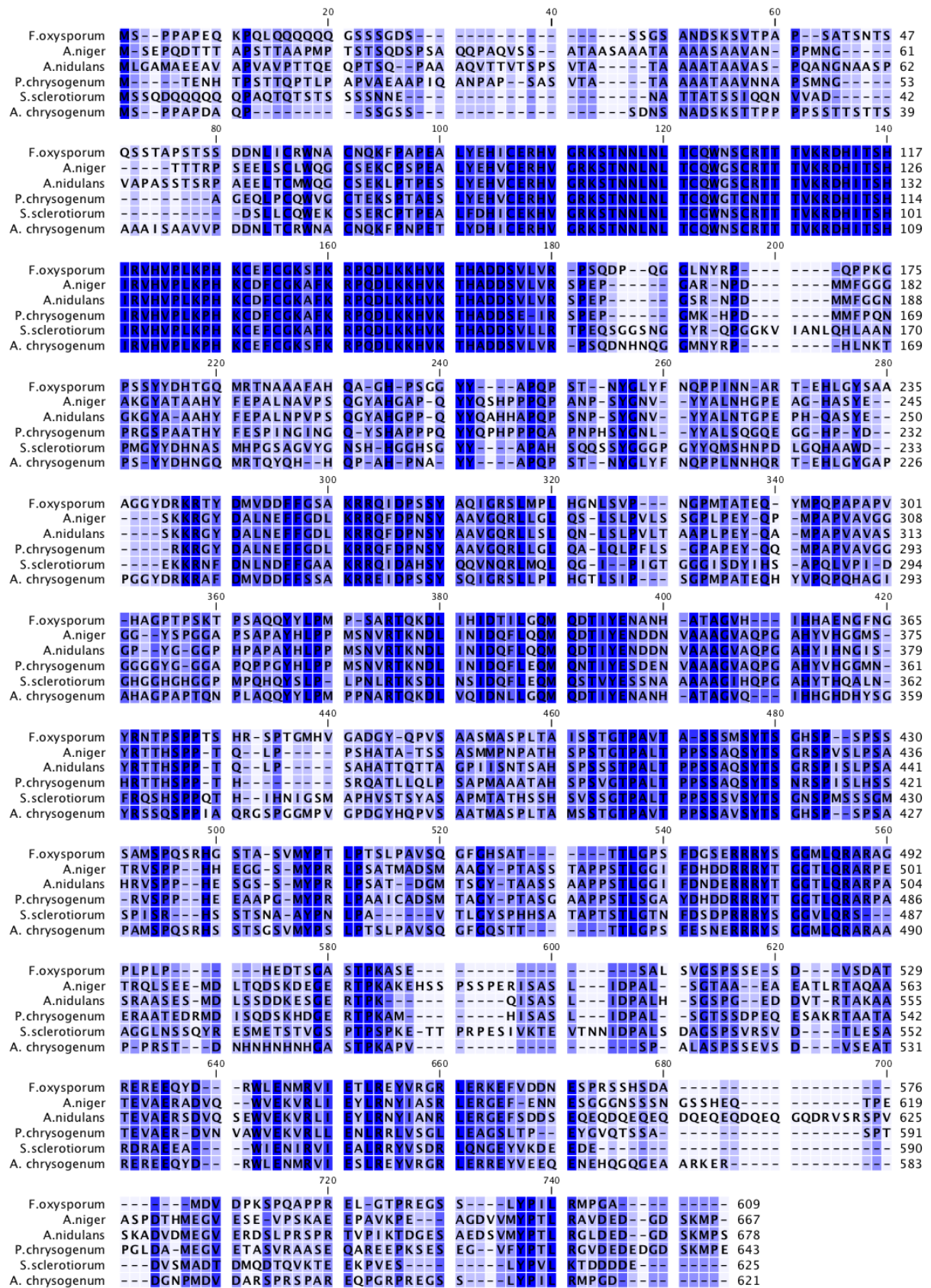


Abbildung 30: Alignment von PacC aus *F. oxysporum* mit den homologen Proteinen PacC aus *A. niger*, *A. nidulans*, *P. chrysogenum*, *S. sclerotiorum* und *A. chrysogenum*.

3.2.3.3 Der pH-Response Transkriptionsfaktor PalA

Das Gen, welches für *palA* codiert, hat eine Länge von 2816 Basenpaaren und besitzt drei Introns. Das gebildete PalA (FOXG_11003) (siehe Abbildung 31) besteht aus 841 Aminosäuren und besitzt eine BRO1-like-Domäne (1492-2746 bp).



Abbildung 31: Konservierte Domänen von PalA: Das PalA Protein hat eine Länge von 2816 Aminosäuren und besitzt eine BRO1-like-Domäne (1492-2746 bp)

In anderen Organismen wie *A. nidulans* oder *S. cerevisiae* gibt es auch ein pH-Response Transkriptionsfaktor PalA, bzw. BRO1, jedoch ist die Homologie zu dem aus *F. oxysporum* nur sehr gering. In *A. nidulans* ist PalA Teil eines Signalübertragungsweges, der die pH-Regulation durch Genexpression vermittelt und an der umgebenden pH-Regulation beteiligt ist (Negrete-Urtasun *et al.* 1997).

3.2.3.4 Der pH-Response Regulator PalC

Der pH-Response Regulator PalC (FOXG_09279) besteht aus 479 Aminosäuren und besitzt keine konservierte Domäne. Das Gen, welches für *palC* kodiert, hat eine Länge von 1946 Basenpaaren und besitzt ein Intron.

Homologe zu PalC gibt es beispielsweise in *N. crassa* oder *M. oryzae*, wo die Homologie 58% beziehungsweise 59% beträgt. Das zu PalC homologe PalC in *A. nidulans* (42% Übereinstimmung) ist Teil eines pH-Signal Transduktionsweges der in einer alkalischen Umgebung aktiv ist (Tilburn *et al.* 2005).

3.2.3.5 Der Response Regulator FOXG_6549

Der Response Regulator FOXG_6549 besteht aus 144 Aminosäuren und besitzt keine konservierte Domäne. Das Gen, welches für dieses Protein kodiert, besteht aus 604 Basenpaaren und hat zwei Introns. Über dieses Gen ist bisher nichts bekannt und es gibt auch keine Homologe in anderen Organismen.

3.2.3.6 Veränderte Expression von Stressgenen im Biofilm

Stressgene werden in Biofilmen vermehrt exprimiert (siehe Punkt 2.3). In dieser Arbeit sollen fünf verschiedene Stressgene von *F. oxysporum* bezüglich ihrer Expression im Biofilm untersucht werden. Auf der *Fusarium* Datenbank auf der Seite des Broad Institutes wurde nach schon beschriebenen Stressgenen gesucht und die

Expression mittels quantitativer *Real time* PCR untersucht. Die Expression von der Histidin-Kinase *Fhk1*, den pH-Response Transkriptionsfaktoren *PacC* und *PalA* und den pH-Response Regulatoren *PalC* und *FOX_6549* wurde untersucht. Um Biofilmmaterial für die RNA-Isolierung zu gewinnen, wurden zwei Glasboxen mit je zehn Objektträger mit 200 ml Komplexmedium (pH 6.5) und 10^7 Sporen angeimpft. Diese wurden für zehn Tage bei 28°C stehend inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung geschwenkt, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Das Biofilmmaterial wurde mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um Material vom planktonischen Wachstum zu gewinnen, wurde ein Kolben mit Komplexmedium (pH 6.5) mit Sporen von SJZ03 angeimpft und schüttelnd für 48 Stunden inkubiert. Das Myzel wurde über Miracloth abfiltriert und schließlich bis zur RNA-Isolation für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren. Für die RNA-Isolation wurde das Material über Nacht im Gefriertrockner lyophilisiert. Die RNA wurde mit Hilfe von TRIzol isoliert (siehe Punkt 5.4.15) und für die quantitative *Real time* PCR verwendet. Es wurden jeweils drei biologische Replikate und davon jeweils noch ein technisches Replikat eingesetzt. Als Haushaltsgen diente *tubB*, welches für α -Tubulin codiert. Das Ergebnis der relativen Expression im Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum ist in Abbildung 32 dargestellt. Der pH-Transkriptionsfaktor *pacC* ist im Vergleich zum planktonischen Wachstum im Biofilm um das 30-fache erhöht exprimiert und der pH-Transkriptionsfaktor *palA* um 15-fache. Die anderen Gene sind im Biofilm nur minimal erhöht im Vergleich zum planktonischen Wachstum. *Fhk1* und *palC* sind um jeweils das 1,5-fache und *FOX6549* um das 0,6-fache erhöht.

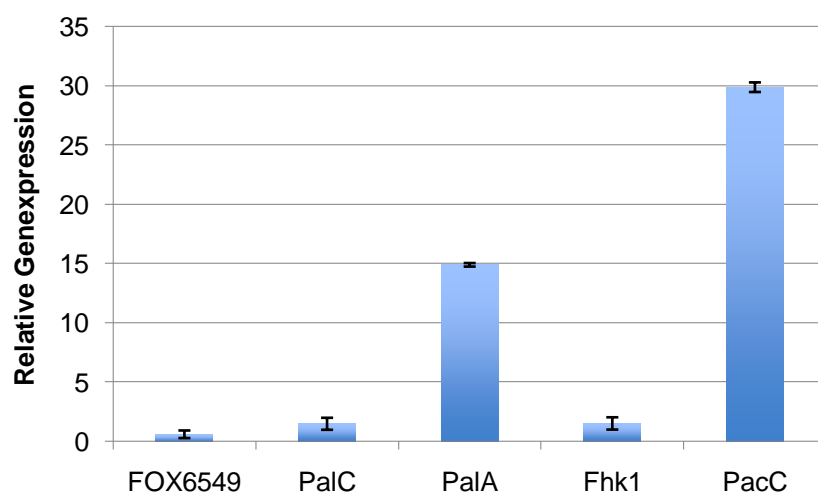


Abbildung 32: Analyse der Genexpression von *FOX6549*, *palC*, *palA*, *fhk1* und *pacC* im Biofilmwachstum. Es wurden drei biologische Replikate und davon jeweils ein technisches Replikat für die qRT-PCR verwendet. Als Haushaltsgen wurde *tubA* benutzt. Mit Hilfe der erhaltenen Werte wurden der $\Delta\Delta C_t$ -Wert, die Standardabweichung und damit der Fehler berechnet. Die pH-Transkriptionsfaktoren *pacC* und *palA* sind um das 30-fache, bzw. 15-fache im Vergleich zum planktonischen Wachstum exprimiert.

3.2.3.7 Expression von Stressgenen bei unterschiedlichen pH-Werten

Da die pH-Response Transkriptionsfaktoren PacC und PalA im Biofilm verstärkt exprimiert werden, sollte die Expression im Biofilm unter verschiedenen pH-Bedingungen getestet werden. Auch der pH-Response Regulator PalC wurde getestet. Um Biofilmmaterial für die RNA Isolierung zu gewinnen, wurden zwei Glasboxen mit je zehn Objektträger mit 200 ml Komplexmedium (pH 5, pH 6.5 und pH 8) und 10^7 Sporen angeimpft. Diese wurden für zehn Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung geschwenkt, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Der Biofilm wurde mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt. Um Material von freilebenden Zellen zu gewinnen, wurde ein Kolben mit Komplexmedium mit den entsprechenden pH-Werten und Sporen von SJZ03 angeimpft und 48 Stunden bei 28°C schüttelnd inkubiert. Das Biofilmmaterial und das Myzel der planktonischen Phase wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und schließlich bis zur RNA-Isolation für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren. Für die RNA-Isolation wurde das Material über Nacht im Gefriertrockner lyophilisiert und die RNA mit Hilfe von TRIzol isoliert (siehe Punkt 5.4.15). Die isolierte RNA wurde dann für die quantitative *Real time* PCR verwendet. Es wurden jeweils drei biologische Replikate und davon jeweils noch ein technisches Replikat eingesetzt. Als Haushaltsgen diente *tubB*, welches für α -Tubulin codiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 zu sehen. *PacC* wird im Biofilm nur bei einem pH-Wert von 6.5 exprimiert, und zwar um das 30-fache im Vergleich zu pH 5 und pH 8 (siehe Abbildung 33A). Wohingegen es im planktonischen Wachstum relativ wenig exprimiert wird. *PalA* wird ebenfalls im Biofilm bei einem pH-Wert von 6.5 des Mediums verstärkt exprimiert, im Vergleich zu pH 5 und pH 8. Im planktonischen Wachstum wird es wiederum bei pH 5 und pH 8 verstärkt exprimiert (siehe Abbildung 33B). Der pH-Response Regulator PalC wird hingegen im Biofilm bei pH 6.5 nur wenig exprimiert, dafür verstärkt bei pH 5 und pH 8. Im planktonischen ist die Expression bei pH 5 am stärksten (siehe Abbildung 33C).

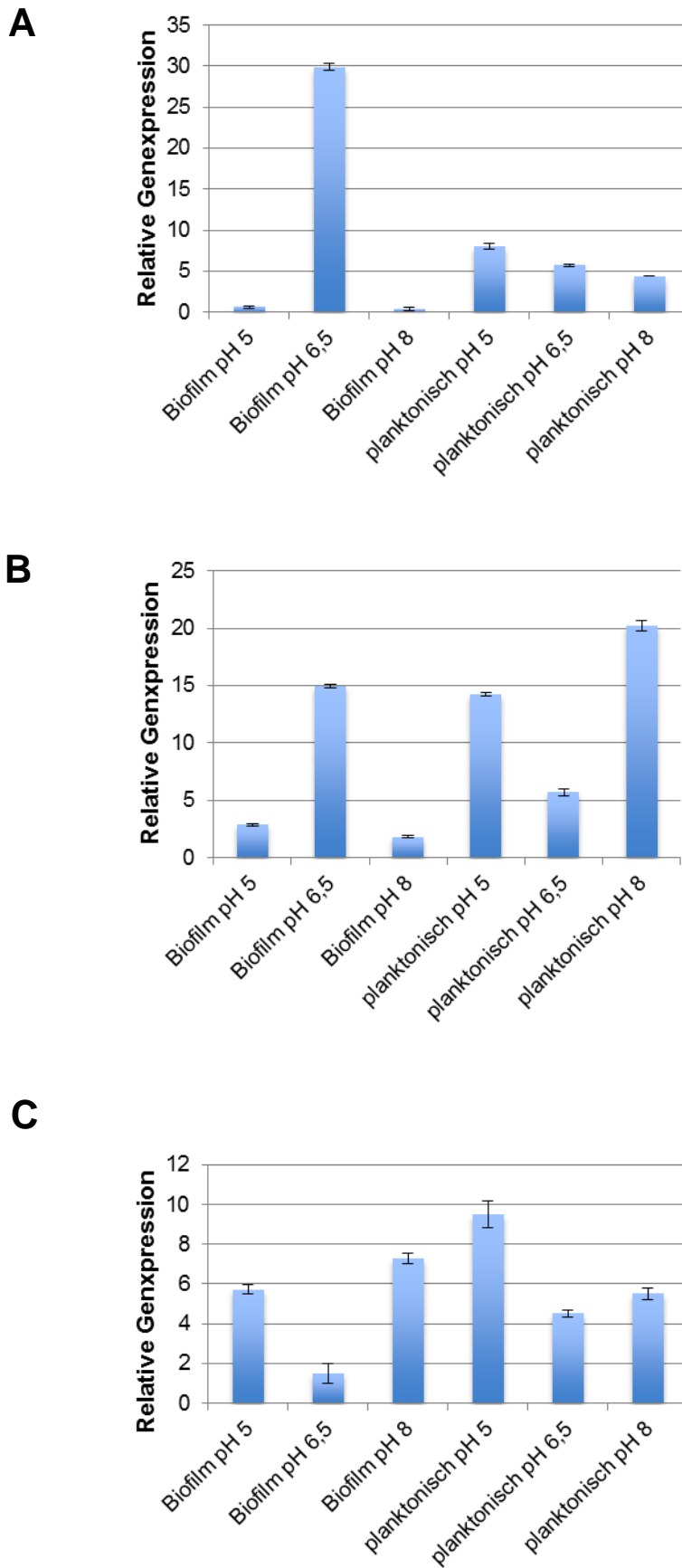


Abbildung 33: Analyse der Genexpression von *pacC*, *palA*, und *pacC* unter verschiedenen pH-

Bedingungen. Es wurden drei biologische Replikate und davon jeweils ein technisches Replikat für die qRT-PCR verwendet. Als Haushaltsgen wurde *tubA* benutzt. Mit Hilfe der erhaltenen Werte wurden der $\Delta\Delta C_t$ -Wert, die Standardabweichung und damit der Fehler berechnet. **(A)** Eine Expression von *pacC* im Biofilm findet nur bei pH 6.5 statt, im planktonischen wird *pacC* immer exprimiert. **(B)** *PalA* wird bei pH 6.5 im Biofilm verstärkt exprimiert. **(C)** *PalC* wird bei pH 6.5 am wenigsten exprimiert und bei pH 5 und 8 vermehrt exprimiert.

3.2.4 Bakterienbeeinflussen die Biofilmbildung von *F. oxysporum*

Zusätzlich zu den Mikroorganismen aus dem konzentrierten Abwasser, sollte auch die Biofilmbildung mit *E. coli* bzw. *Pseudomonas putida* untersucht werden. *E. coli* und *P. putida* sind gut untersuchte Biofilmbakterien (Pratt & Kolter, 1998; Gjermansen *et al.* 2005). Es sollte untersucht werden, ob *F. oxysporum* besser oder schlechter im Biofilm wachsen kann, wenn diese Bakterienspezies anwesend sind. Zum einen wurde das Biofilmwachstum mikroskopisch untersucht und zum anderen das Fluoreszenzsignal mit Hilfe des *Platereaders* gemessen. In beiden Fällen wurde der Stamm SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA; gpd(p)::hph::trp(t)*) verwendet. Zuerst wurde die Biofilmbildung mikroskopisch analysiert. Dazu wurden Glasobjektträger in einer Petrischale mit 20 ml Komplexmedium (pH 6.5), 10^5 Sporen von SJZ03 und je 1 μ l der Bakterienübernachtskultur beimpft. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Objektträger entnommen und in 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung geschwenkt, um nicht anhaftende Organismen zu entfernen. Untersucht wurde das Biofilmwachstum unter Anwesenheit von *E. coli* TOP10 und *P. putida* DSM 7152. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 34 zu sehen. Das Biofilmwachstum auf einer Glasoberfläche in Anwesenheit von *E. coli* (siehe Abbildung 34A) scheint etwas langsamer zu verlaufen. Nach 24 Stunden sind in Anwesenheit von *E. coli* nur Sporen zu sehen, während im Biofilm von *F. oxysporum* allein, alle Sporen bereits ausgekeimt sind (vgl. Abbildung 21 und 22). Nach 48 Stunden sind lange Hyphen zu sehen, wobei nach 72 Stunden nur ausgekeimte Sporen zu sehen waren (siehe Abbildung 34A). Das Biofilmwachstum in Anwesenheit von *P. putida* verläuft bis nach 48 Stunden nach der Inkubation vergleichbar wie das ohne Bakterium (siehe Abbildung 21 und 22), nach 72 Stunden jedoch weist der Pilz eine abnormale Form auf (siehe Abbildung 34B).

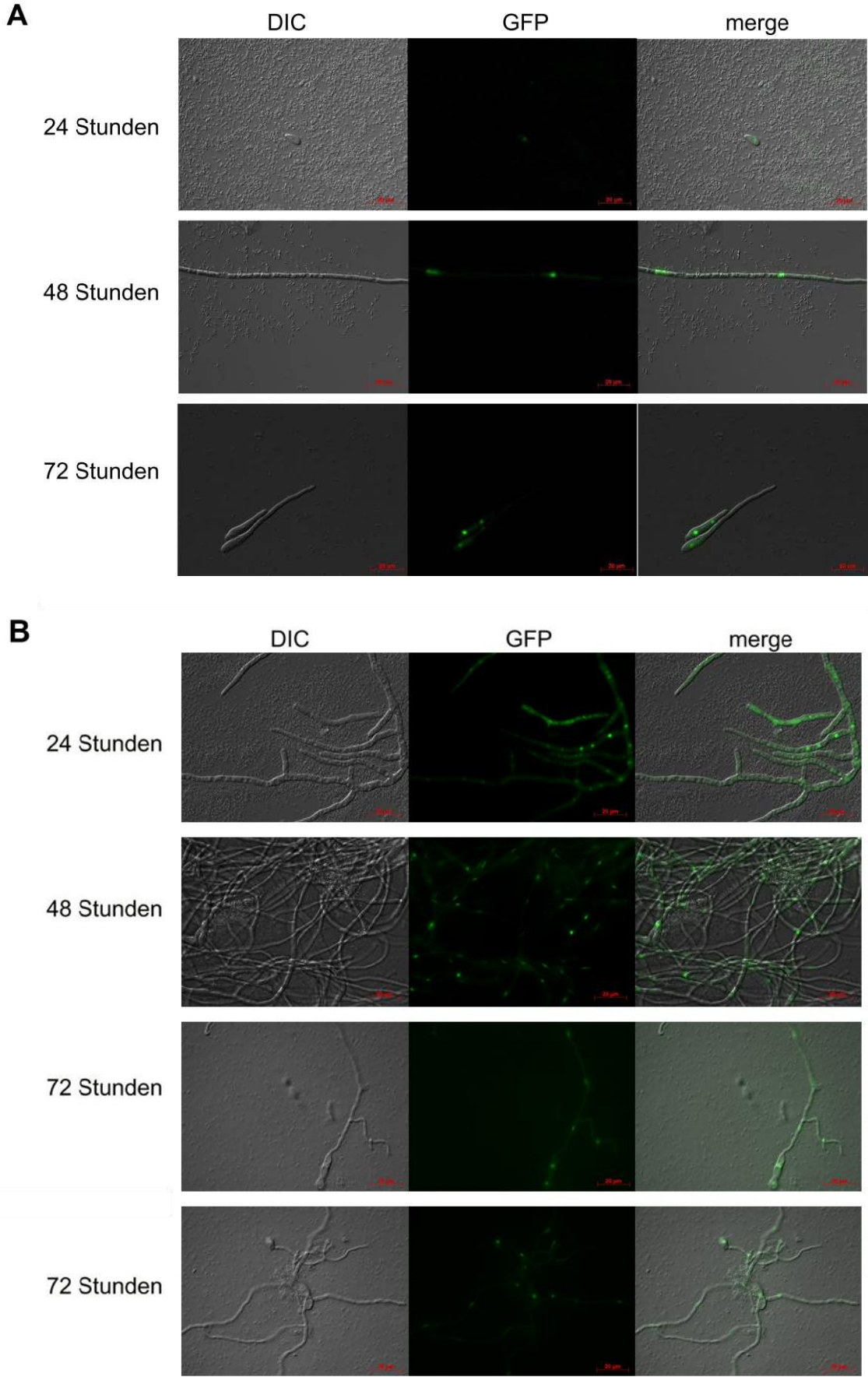


Abbildung34: Biofilmbildung von *F. oxysporum* mit *E. coli* und *P. putida* 10^5 Sporen von SJZ03

(*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) und je 1 μ l der Bakterienübernachtskultur wurden mit Komplexmedium (pH 6.5) in einer Glasbox mit Glasobjektträgern bei Raumtemperatur für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Vor dem mikroskopieren wurden die Objektträger mit steriler 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült. **(A)** Biofilmwachstum von *F. oxysporum* und *E. coli*. Hier scheint der Pilz normal zu wachsen. **(B)** Biofilmwachstum von *F. oxysporum* und *P. putida*. Nach 72 Stunden sieht der Pilz abnormal aus.

Zur Messung des Biofilmwachstums anhand des Fluoreszenzsignals wurde der Stamm SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) ausgewählt. Dazu wurde eine 96-well Platte (BD Falcon 96 Flat transparent/black) verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit je 200 μ l Komplexmedium, $2 \cdot 10^4$ Sporen und 1 μ l der Bakterienübernachtskultur pro Mulde angeimpft. Auch hier wurde das Medium mit pH 5, pH 6.5, pH 7.5, pH 8 und pH 9 getestet. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für 48 Stunden. Anschließend wurden die Mulden zwei Mal mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Zum Vergleich ist im Diagramm in Abbildung 35 noch einmal das Wachstum von *F. oxysporum* im Biofilm ohne Zugabe von Bakterien mit dargestellt. Generell kann *F. oxysporum* in Biofilm besser ohne das Vorhandensein von Bakterien wachsen (siehe Abbildung 35). Das Wachstum ist bei allen pH-Werten ohne Zugabe von *E. coli* und *P. putida* fast doppelt so groß wie in Anwesenheit der Bakterien. Lediglich bei pH 5 und Zugabe von *P. putida* kann der Pilz fast so gut wie ohne Bakterien wachsen.

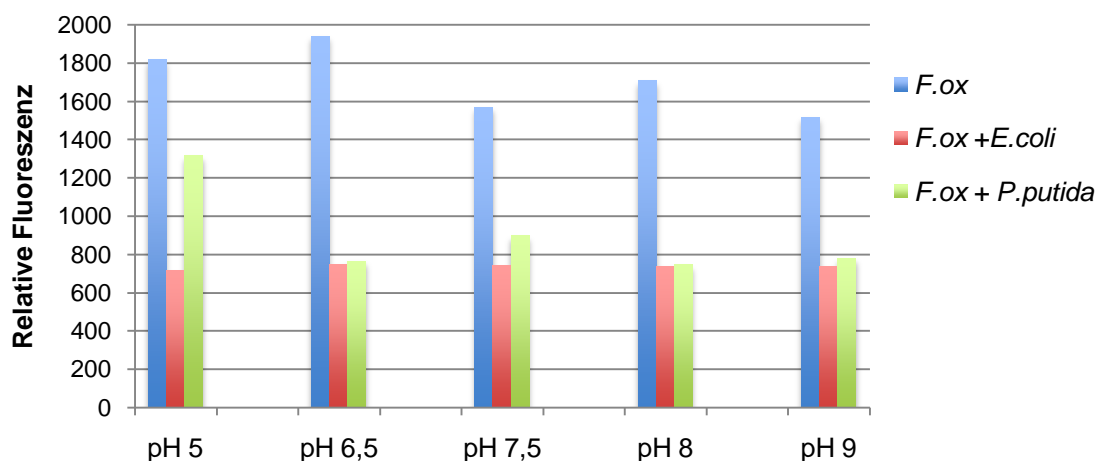


Abbildung 35: Messung der relativen Fluoreszenz zur Bestimmung des Wachstums von *F. oxysporum* mit *E. coli* bzw. *P. putida* im Biofilm. Es wurden Mulden von einer Mikrotiterplatte mit 200 μ l Komplexmedium verschiedenen pH-Wertes mit $2 \cdot 10^4$ Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) und 1 μ l der entsprechenden Bakterienübernachtskultur angeimpft und bei 28°C für

48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Mulden zwei Mal mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült, um nicht anhaftendes Myzel und Bakterien zu entfernen. Pro Probe wurden zwei Ansätze pipettiert und der Mittelwert berechnet. Es wird die relative Fluoreszenz berechnet, die sich auf einen Referenzwert, in diesem Fall pH 6.5 ohne Bakterien bezieht. Bei Zugabe von Bakterien ist das Wachstum von *F. oxysporum* im Biofilm deutlich geringer. In Anwesenheit von Bakterien kann *F. oxysporum* unter der Zugabe von *P. putida* bei pH 5 am besten im Biofilm wachsen. Die Werte werden in RFU (relative Fluoreszenz Unit) gemessen.

3.2.5 Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf die Biofilmbildung

Im Biofilm ist der Schutz gegenüber antimikrobiellen Reagenzien erhöht. Bakterien und Pilze sind bis zu 1000-fach weniger anfällig gegen Antimikrobiotika, als frei lebende Organismen (Ramage *et al.* 2001; Di Bonaventura *et al.* 2006). Die Architektur des Biofilms und die Präsenz von extrazellulären Substanzen reduziert wahrscheinlich das Eindringen der Fungizide und Antibiotika (Baillie *et al.* 2000). Deshalb soll hier die Resistenz des Biofilms gegenüber antimikrobiellen Substanzen getestet werden.

Fünf verschiedene Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet. Zum einen Glucanex, eine Mischung von verschiedenen Enzymen, welche die Zellwand verdauen und normalerweise zur Herstellung von Protoplasten eingesetzt wird. Glucanex ist ein Beta-Glucanase Präparat, das von *Trichoderma harzianum* produziert wird. Ursprünglich wurde Glucanex entwickelt, um die Klärung und Filtration von Weinen zu verbessern, die aus mit *Botrytis* infizierten Trauben erzeugt werden (Datenblatt Glucanex bei Glösmann-Rohstoffe, abgerufen am 30. Januar 2013). Dieses Enzymgemisch wurde getestet, um den Schutz im Biofilm gegenüber lytischen Enzymen zu testen. Des Weiteren wurde Amphotericin B, ein Polyen-Makrolakton aus *Streptomyces nodosum*, einem Actinobacterium aus der Gattung der Streptomyceten getestet (Datenblatt Amphotericin B bei Sigma-Aldrich, abgerufen am 30. Januar 2013). Es wird als Antimykotikum bei Pilzinfektionen eingesetzt. Ebenfalls getestet wurde Benomyl, ein Fungizid, das an die Mikrotubuli bindet, wodurch wichtige Prozesse, wie der intrazelluläre Transport und die Zellteilung nicht mehr ablaufen können. Calcofluor White, ein fluoreszenter Farbstoff, welcher an Cellulose und Chitin bindet, wurde ebenfalls auf seinen Einfluss auf die Biofilmbildung untersucht. Dieser Farbstoff zeigt bereits einen Effekt in der Wachstumshemmung von *Aspergillus nidulans* (Beatrice Gutt, unveröffentlicht). Zuletzt wurde noch ein antimikrobielles Peptid, Sub5, getestet. Dieses Peptid war bei

Tests auf das Wachstum von *A. nidulans* das wirksamste antimikrobielle Peptid (Mania *et al.* 2010). Antimikrobielle Peptide haben ein breites Wirkungsspektrum. Sie wirken gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, pathogene Hefen, Viren und filamentöse Pilze.

Die Wirkung der Reagenzien wurde auf das planktonische und das Biofilmwachstum getestet. Zum Testen der Wirkung auf das planktonische Wachstum, wurde ein Mikrotiterscreening-Assay mit Resazurin nach Mania *et al.* 2010 durchgeführt (siehe Punkt 5.5.5). Resazurin ist ein blauer Redox-Farbstoff, der durch die Respiration der Zellen zu dem pinken Farbstoff Resorufin reduziert wird. Jede Mulde der Mikrotiterplatte wurde mit 200 μ l Medium und einer definierte Menge von 10^4 Sporen pro 10 μ l des Wiltyps 4287 angeimpft. Resazurin wurde ins Medium gegeben, sodass eine 100 μ M Lösung entstand. Dieser Test wurde mit den oben genannten Substanzen durchgeführt. Von den zu testenden Substanzen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodass die Konzentration zwischen 0,8 und 100 μ g/ml lag. Pro zu testender Substanz wurden zwei Ansätze pipettiert. Als Kontrolle diente nur Medium mit Sporen ohne Resazurin und Medium mit Resazurin mit und ohne Sporen. Die Platte wurde für 16-24 Stunden bei 28°C inkubiert. Das Ergebnis des Assays ist in Abbildung 36 zu sehen. Glucanex, Amphotericin B und Benomyl hatten auch in der höchsten Konzentration von 100 μ g/ml keinen Effekt auf das planktonische Wachstum von *F. oxysporum*. Bei Calcofluor White hingegen konnte der Pilz ab einer Konzentration von höher als 6,3 μ g/ml nicht mehr wachsen. Das Selbe ist bei dem antimikrobiellen Peptid Sub5 der Fall, hier findet das Wachstum nur bis zu einer Konzentration von 6,3 μ g/ml statt.

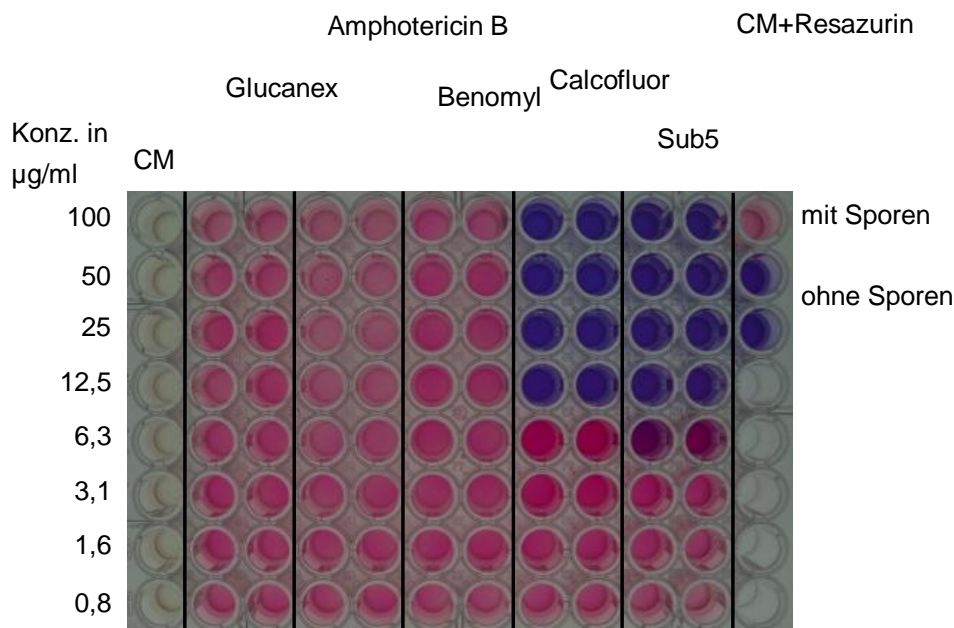
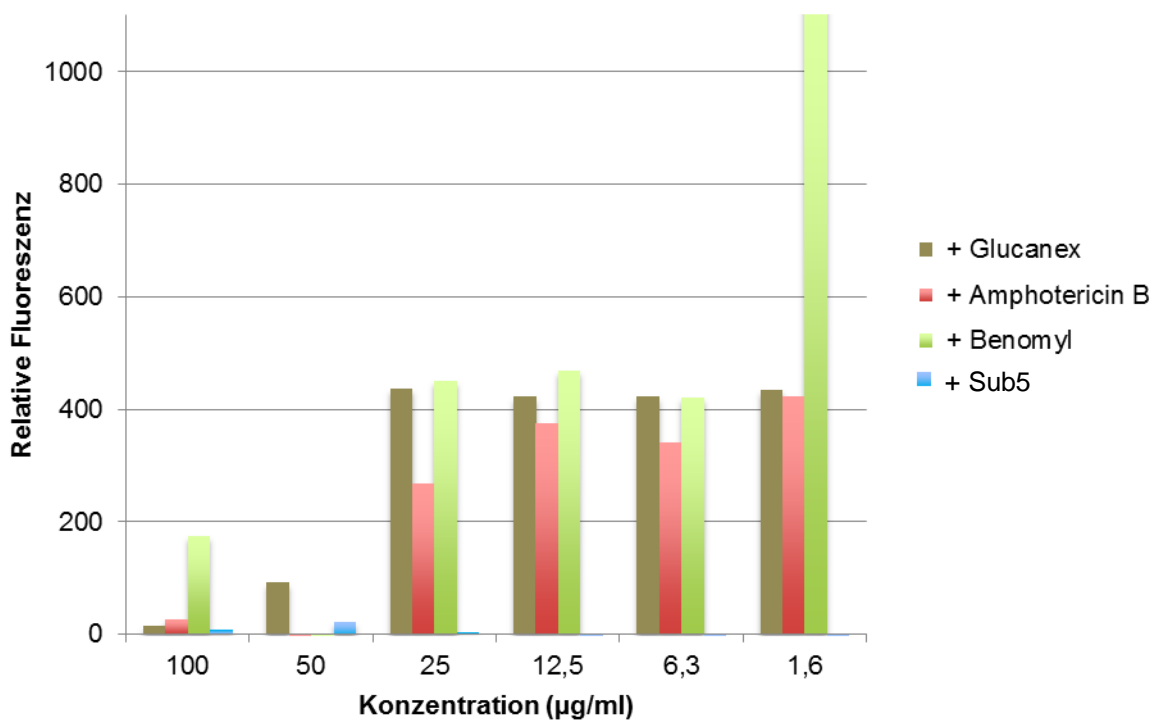


Abbildung 36: Mikrotiterscreening-Assay der getesteten Substanzen im planktonischen Wachstum. In jeder Mulde befinden sich 10^4 Sporen vom *F. oxysporum* Wildtyp 4287 in 200 µl Komplexmedium (CM) und 100 µM Resazurin. Die Platte wurde stehend bei 28°C für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration der einzelnen Substanzen ist an der linken y-Achse aufgeführt. Pro zu testender Substanz wurden zwei Ansätze pipettiert. Als Kontrolle diente nur Komplexmedium mit Sporen und Komplexmedium mit Resazurin mit und ohne Sporen.

Die Wirkung der gleichen Substanzen wurde auch auf das Biofilmwachstum getestet. Hier wurde ebenfalls eine Mikrotiterplatte mit 200 µl Komplexmedium (pH 6.5) und 10^4 Sporen des Stammes SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA*; *gpd(p)::hph::trp(t)*) angeimpft, jedoch ohne Zugabe von Resazurin. Die Platte wurde stehend bei 28°C für 48 Stunden inkubiert und anschließend die Mulden zwei Mal mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Das Biofilmwachstum wurde anhand des Fluoreszenzsignals mit Hilfe des *Platereaders* ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt. Ohne Zugabe von Bakterien und antimikrobiellen Substanzen liegt das Wachstum von *F. oxysporum* bei pH 6.5 bei knapp 2000 RFU (relative Fluoreszenz Unit). Das antimikrobielle Peptid Sub5 hat einen großen Einfluss auf das Biofilmwachstum von *F. oxysporum*. Selbst bei der geringsten Zugabe von 1,6 µl/ml kann sich bereits kein Biofilm mehr bilden (siehe Abbildung 37A). Wohingegen im planktonischen Wachstum der Pilz bei einer Konzentration niedriger als 12,5 µg/ml Sub5 wachsen kann (siehe Abbildung 36). Bei Amphotericin B und Glucanex findet das Biofilmwachstum bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml statt. Vergleichend hierzu im planktonischen Wachstum

kann der Pilz bei allen getesteten Konzentrationen von Amphotericin B und Glucanex wachsen (siehe Abbildung 36). Ebenso bei Benomyl, wo jedoch eine geringe Fluoreszenz gemessen wurde, diese jedoch erst ab einer Konzentration von 25 µg/ml signifikant ist (siehe Abbildung 37A). Im planktonischen Wachstum kann *F. oxysporum* bei allen getesteten Konzentrationen wachsen. Der Einfluss von Calcofluor White auf das Biofilmwachstum von *F. oxysporum* ist in Abbildung 37B dargestellt. Hier ist kein Einfluss auf das Biofilmwachstum zu erkennen, jedoch ist hier das Wachstum im planktonischen nur bei einer Konzentration von unter 12,5 µg/ml möglich (siehe Abbildung 36).

Beim Testen des Einflusses von Glucanex auf das planktonische beziehungsweise Biofilmwachstum hätte man eventuell noch eine Postivkontrolle hinzunehmen müssen, um zu schauen ob die Enzymaktivität unter den getesteten Bedingungen noch vorhanden ist. Jedoch ist im Biofilm unter Zugabe von Glucanex bei einer Konzentration von 100 und 50 µg/ml kein Wachstum von *F. oxysporum* feststellbar, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Enzyme unter den getesteten Bedingungen aktiv sind.

A

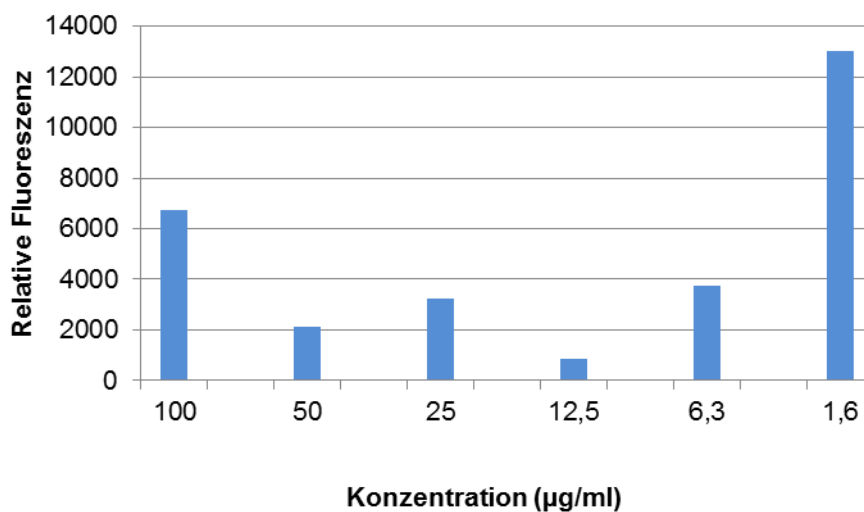
B

Abbildung 37: Messung der relativen Fluoreszenz zur Bestimmung des Wachstums von *F. oxysporum* unter Zugabe von antimikrobiellen Substanzen im Biofilm. Es wurden Mulden einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Komplexmedium (pH 6.5) mit $2 \cdot 10^4$ Sporen von SJZ03 (*gpd(p)::gfp::stuA; gpd(p)::hph::trp(t)*) angeimpft. Die Konzentration der zugegebenen Substanzen ist auf der X-Achse aufgeführt. Pro zu testender Substanz wurden zwei Ansätze pipettiert und die Platte bei 28°C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Mulden zwei Mal mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gespült, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Zur besseren Übersicht des Wachstums wurden zwei getrennte Diagramme erstellt. (A) Wirkung der getesteten Substanzen auf die Biofilmbildung. Benomyl zeigt den geringsten Einfluss auf das Biofilmwachstum, der sich bei einer Konzentration von 100 µg/ml ausbilden kann. Unter Zugabe des antimikrobiellen Peptids Sub5 kann sich auch bei der geringsten Konzentration kein Biofilm ausbilden. Unter Zugabe von Benomyl und Glucanex kann sich ab einer Konzentration von 25 µg/ml ein Biofilm bilden. (B) Wirkung von Calcofluor White auf die Biofilmbildung. Hier schwanken die Ergebnisse etwas, jedoch kann *F. oxysporum* bei allen Konzentrationen wachsen. Die Werte werden in RFU (relative Fluoreszenz Unit) gemessen.

3.2.6 Einfluss verschiedener Gene auf die Biofilmbildung

In einem Biofilm werden nicht nur Stressgene, sondern auch viele andere verschiedene Gene im Vergleich zum planktonischen Wachstum exprimiert (Yeater *et al.* 2007). Mutanten der nachfolgenden beschriebenen Gene wurden auf ihre Fähigkeit einen Biofilm zu bilden untersucht.

3.2.6.1 Die MAP Kinase Fmk1

Die MAP Kinase Fmk1 in *F. oxysporum* ist erforderlich für die Infektion von Pflanzen (Di Pietro *et al.* 2003). Sie gehört zu der Untergruppe YERK1 („yeast and fungal extracellular signal-regulated kinase“) (Kültz, 1998). Deletionsmutanten von

fmk1 sind fehlerhaft in mehreren Virulenz-Funktionen, wie beispielsweise der Anhaftung an Tomatenwurzeln, die Penetration, dem invasiven Wachstum ins Pflanzengewebe und die Sekretion von pektolytischen Enzymen (Di Pietro *et al.* 2001; Delgado-Jarana *et al.* 2005). Fmk1 ist auch für die vegetative Hyphenfusion notwendig, einen ubiquitären Prozess in filamentösen Pilzen. Fmk1 kontrolliert verschiedene wichtige Schritte in der Pathogenese von *F. oxysporum* und weist auf eine grundlegende Rolle der entsprechenden MAP Kinase Wege in Pflanzenpathogenen hin (Prados Rosales & Di Pietro, 2008).

Die am besten erforschten Mitglieder dieser Unterfamilie sind Fus3 und Kss1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Hier kontrolliert Fus3 die Transduktion von extrazellulären Mating Pheromon Signalen (Elion *et al.* 1990), wohingegen Kss1 die Filamentbildung induziert, wenn Stickstoff der limitierende Faktor ist (Madhani *et al.* 1997).

In Abbildung 38 ist das Alignment von Fmk1 aus *F. oxysporum* mit homologen MAP Kinasen aus anderen Organismen dargestellt. Die Homologie zu den Proteinen aus anderen Organismen ist sehr hoch. Wie zum Beispiel zu MAPK aus *Fusarium solani* (99% Übereinstimmung), zu Cmk1 aus *Colletotrichum lagenarium* (98% Übereinstimmung), zu Pmk1 aus *Magnaporthe grisea* (97% Übereinstimmung), Bmp1 aus *Botrytis cinerea* (95% Übereinstimmung) und zu Chk1 aus *Cochliobolus heterostrophus*, wo die Homologie immerhin noch bei 93% liegt. Die Homologie zu Kss1 und Fus3 aus *Saccharomyces cerevisiae* beträgt 59% bzw. 58 %.

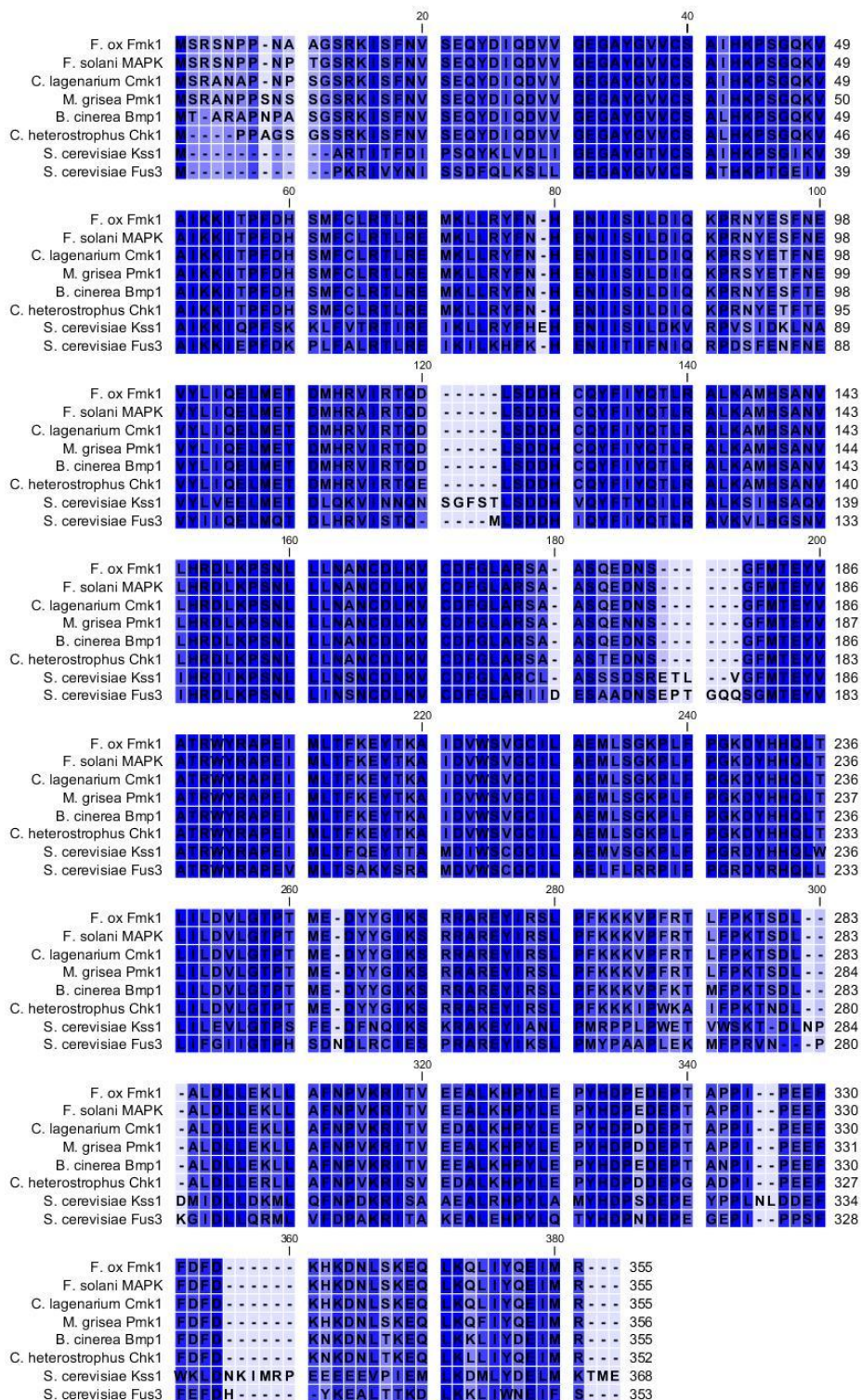


Abbildung 38: Alignment von Fmk1 von *F. oxysporum* mit homologen MAP Kinasen, MAPK von *F. solani*, CMK1 von *C. lagenarium*, Pmk1 von *M. grisea*, Bmp1 von *B. cinerea*, Chk1 von *C. heterostrophus* und Kss1 und Fus3 aus *S. cerevisiae*.

3.2.6.2 Der Transkriptionsfaktor Ste12

Der Transkriptionsfaktor Ste12 (FOXG_02103) ist homolog zu dem aus *S. cerevisiae* bekannten Homeodomänenprotein Ste12p, welches ein Schlüssel-

Transkriptionsfaktor abwärts der MAP-Kinasen (MAP, engl. mitogen-activated protein) Fus3 und Kss1 ist (Qi & Elion, 2005). Ste12p bindet an Elemente der Pheromonantwort und der Filamentbildung, um die Gene, die in das invasive Wachstum involviert sind, zu regulieren (Madhani & Fink, 1997).

RISPAIL und DI PIETRO haben herausgefunden, dass Ste12 weder notwendig für das vegetative Hyphenwachstum und die Fusion ist, noch für die Anheftung an Tomatenwurzeln. Deletionsmutanten von *ste12* sind im Wachstum in Tomatenpflanzen und Apfelpewebe gehemmt und haben eine reduzierte Virulenz gegenüber Tomaten, vergleichbar mit den $\Delta fmk1$ Mutanten (Risipail & Di Pietro, 2009).

Ste12 besteht aus 696 Aminosäuren (siehe Abbildung 39) und besitzt einen N-terminalen STE-like Transkriptionsfaktor (964-1347 bp) und zwei C-terminale C₂H₂ Zinkfinger-Domänen (2524-2647 bp und 2663-2784 bp). Das Gen, welches für *Ste12* codiert, hat eine Länge von 3443 Basenpaaren und besitzt vier Introns.



Abbildung 39: Konservierte Domänen von Ste12: Das Ste12 Protein hat eine Länge von 696 Aminosäuren und besitzt einen STE-like Transkriptionsfaktor (964-1347 bp) zwei C₂H₂ Zinkfinger-Domänen (2524-2647 bp und 2663-2784 bp)

Ste12 aus *F. oxysporum* hat einige Homologe in anderen Organismen (siehe Abbildung 40), Mst12 aus *Magnaporthe grisea*, Ste12 aus *Colletotrichum lindemuthianum*, SteA aus *Neurospora crassa*, SteA aus *Aspergillus nidulans*, Cph1 von *Candida albicans* und Ste12p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Homologie beträgt zwischen 61 und 79%. Anhand dieser Daten, kann man sagen, dass *ste12* aus *F. oxysporum* das strukturelle Ortholog von *ste12* aus *S. cerevisiae* ist (Risipail & Di Pietro, 2009).

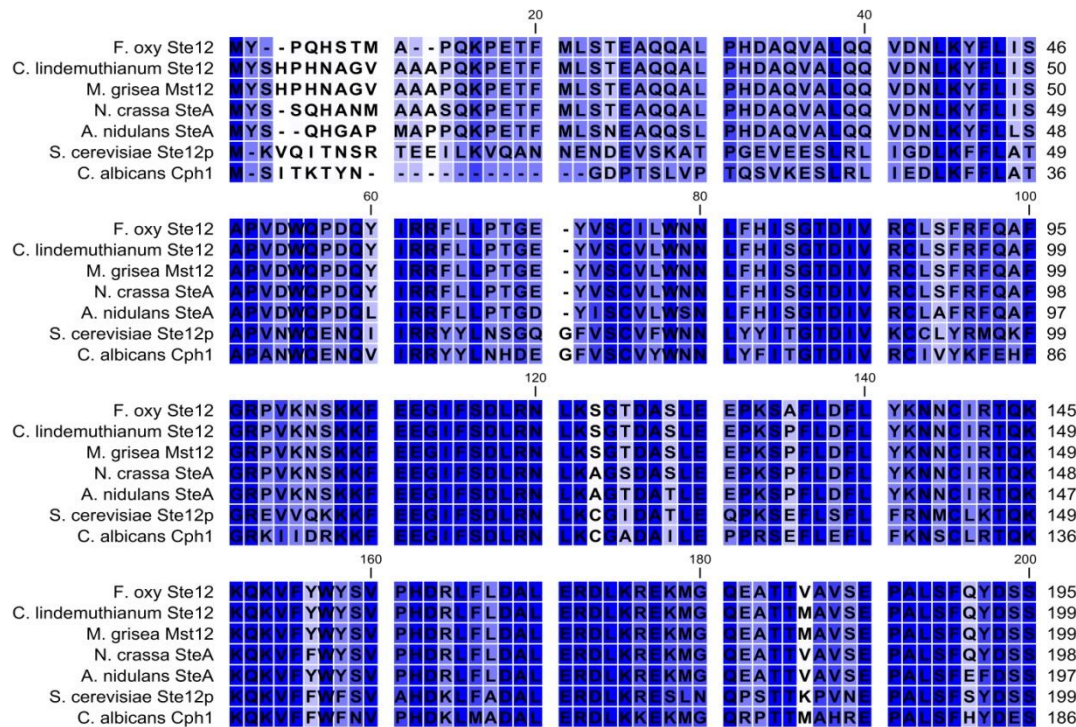


Abbildung 40: Alignment von Ste12 aus *F. oxysporum* mit den homologen Proteinen Mst12 aus *M. grisea*, Ste12 aus *C. lindemuthianum*, SteA aus *N. crassa*, SteA aus *A. nidulans*, Cph1 aus *C. albicans* und Ste12p aus *S. cerevisiae*. Gezeigt sind nur jeweils die ersten 200 Aminosäuren, da diese eine höhere Homologie ausweisen, als die restlichen Aminosäuren.

Abbildung 41 zeigt ein Modell für die Rolle von Ste12 in *F. oxysporum*. Ste12 reguliert das invasive Wachstum abwärts der Fmk1 MAP Kinase, wobei die verbleibenden Fmk1-kontrollierten Funktionen durch andere, unbekannte Transkriptionsregulatoren vermittelt werden. Möglicherweise regulieren zusätzliche Wege die Ste12 Aktivität. Die durch Ste12 vermittelte invasive Wachstumsfunktion spielt eine Schlüsselrolle in der Virulenz bei Pflanzen (Rispaill & Di Pietro, 2009).

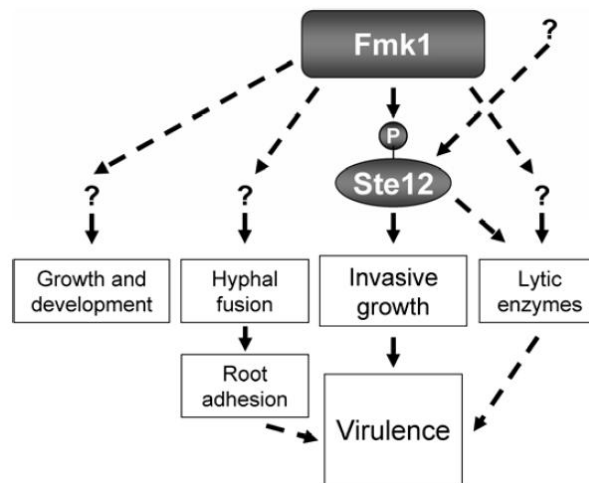


Abbildung 41: Modell für die Rolle von Ste12 und Fmk1 in *F. oxysporum*. Ste12 reguliert das invasive Wachstum abwärts der Fmk1 MAP Kinase, wobei die verbleibenden Fmk1-kontrollierten Funktionen durch andere, unbekannte Transkriptionsregulatoren vermittelt werden. Möglicherweise regulieren zusätzliche Wege die Ste12 Aktivität. Die durch Ste12 vermittelte invasive Wachstumsfunktion spielt eine Schlüsselrolle in der Virulenz bei Pflanzen (Rispaill & Di Pietro, 2009)

3.2.6.3 Das Membran Mucin Msb2

Msb2 aus *F. oxysporum*, ein hoch glykosiliertes Mucin Membranprotein, hat eine Domänenstruktur ähnlich zu der von Msb2 aus *S. cerevisiae* und steuert das Wachstum auf festen Oberflächen unter Stickstoff-Limitierung und Zellwandstress. Die *msb2* Deletionsmutante ist sensitiver gegenüber Zellwand-bindenden Substanzen wie Kongorot, ein Azofarbstoff, und Calcofluor White, ein Fluoreszenzfarbstoff, der an Cellulose und Chitin bindet, als der Wildtyp Stamm. Eine $\Delta msb2 \Delta fmk1$ Doppelmutante ist signifikant sensitiver gegenüber diesen Substanzen, als die Einzelmutanten, woraus man schließen kann, dass Msb2 und Fmk1 zusätzliche Funktionen in der Zellwand-Stressantwort haben (Pérez-Nadales & Di Pietro, 2011).

Das Membran Mucin Msb2 (FOXG_09254) hat eine Größe von 1129 Aminosäuren. Das Gen, welches für Msb2 codiert hat eine Länge von 4123 Basenpaaren und besitzt keine Introns und konservierten Domänen. Eine schematische Darstellung von Msb2 nach PÉREZ-NADALES ist in Abbildung 42 zu sehen.

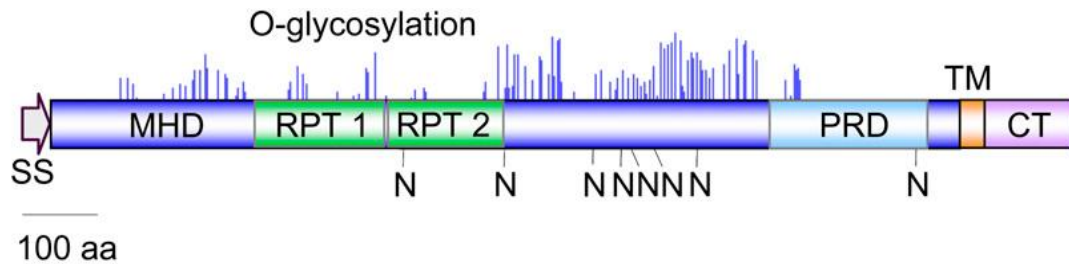


Abbildung 42: Schematische Darstellung von Msb2 aus *F. oxysporum*. Gezeigt ist die N-terminale Signalsequenz (SS), die extrazelluläre Ser/Thr/Pro-reiche Mucin-homologe Domäne mit unvollständigen Wiederholungen (RPT), die positive regulatorische Domäne (PRD), eine Transmembran Domäne (TM) und der cytoplasmatische Schwanz. O-glykosylierte Stellen (blaue Peaks) und N-glykosylierte Stellen (N). Jeder Peak repräsentiert den Wert für einen Serin oder Threonin-Rest in der Sequenz, der über einem bestimmten Stellenwert liegt. (Pérez-Nadales & Di Pietro, 2011)

3.2.6.4 Fso1 ist essentiell für die Hyphenfusion

Fso1 (FOXG_01690) ist essentiell für die Hyphenfusion. Deletionsmutanten, in denen dieses Gen ausgeschaltet ist, können keine Hyphenaggregate ausbilden und nicht an Pflanzenwurzeln anhaften, des Weiteren ist die Virulenz gegenüber Pflanzen leicht reduziert (Prados Rosales & Di Pietro, 2008).

Fso1 besteht aus 1197 Aminosäuren (siehe Abbildung 43) und besitzt eine WW-Domäne (2478-2570 bp). Das Gen, welches für *fso1* codiert, hat eine Länge von 3966 Basenpaaren und besitzt zwei Introns. Die WW-Domäne ist eine der kleinsten bekannten Protein-Protein-Interaktionsdomänen mit 35-40 Aminosäuren (Macias *et al.* 2002).



Abbildung 43: Konservierte Domäne von Fso1. Das Fso1 Protein hat eine Länge von 1197 Aminosäuren und besitzt eine WW-Domäne (2478-2570 bp).

Das zu *Fso1* aus *F. oxysporum* homologe *So* aus *N. crassa* besitzt ebenfalls eine WW-Domäne und die Homologie beträgt 61% (siehe Abbildung 44). *So* aus *N. crassa* ist notwendig für die vegetative Zellverschmelzung, die Deletionsmutante zeigt einen Defekt in der Keimung und der Hyphenfusion (Fleißner *et al.* 2005).

3.2.6.5 Die Deletion dieser Gene beeinflusst die Biofilmbildung

Insgesamt wurden sechs verschiedene Deletionsmutanten auf ihre Fähigkeit einen Biofilm auszubilden getestet. Die Deletionsmutanten wurden von Professor Dr. Antonio DiPetro von der Universität von Córdoba zur Verfügung gestellt. Eine Mutante, der das Gen *fhk1* für die Histidin-Kinase fehlt, zeigt eine leicht erhöhte Genexpression im Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum (siehe Punkt 3.2.3.6). Ebenso wurde eine Deletionsmutante des pH-Response Regulators PacC, der im Biofilm eine 30-fach erhöhte Expression zeigt, getestet (siehe Abbildung 32). Des Weiteren wurden Deletionsmutanten der MAP Kinase Fhk1, die für die vegetative Hyphenfusion notwendig ist, des Transkriptionsfaktors Ste12, in der das Wachstum in Tomatenpflanzen und Äpfeln gehemmt ist und von dem Membran Mucin Msb2, das für die Stressantwort der Zellwand verantwortlich ist, getestet. Zusätzlich wurde noch der Stamm $\Delta fso1$ getestet, dem ein Gen, das essentiell für die Hyphenfusion ist, fehlt. Der Phänotyp der einzelnen Mutanten auf Komplexmedium ist in Abbildung 45A gezeigt. Es ist kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen.

Da die Mutanten bei der mikroskopischen Beobachtung ein eher abnormales Wachstum aufwiesen, wie vermehrte Verzweigungen oder kurvig Wachstum, wurde von jeder Mutante 100 Hyphen ausgewertet und mit dem Wildtyp verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 45B zu sehen. Der Wildtyp weist ein meist normales, also eher gerades Wachstum der Hyphen auf, nur wenige sind kurvig, verzweigt oder beides. Die Mutante des Membran Mucins Msb2 hingegen bringt mit über 80% fast nur verzweigte Hyphen hervor. Die Deletionsmutante von *pacC* hingegen zeigt ein nahezu ausgeglichenes Wachstum zwischen kurvigen und verzweigten Hyphen mit jeweils ca. 40%. Ein ebenfalls vermehrt verzweigtes Wachstum zeigt der $\Delta fhk1$ Stamm und der $\Delta fso1$ Stamm zeigt mit über 70% kurvigen Hyphen ein fast ausschließlich kurvig Wachstum. Die *fmk1* Deletionsmutante zeigt ein fast ausgeglichenes Wachstum zwischen normalem, kurvigem und verzweigtem Wachstum. Der $\Delta ste12$ Stamm weist einen ähnlichen Phänotyp wie der Wildtyp auf, über 60% der Hyphen wachsen normal und 30% kurvig.

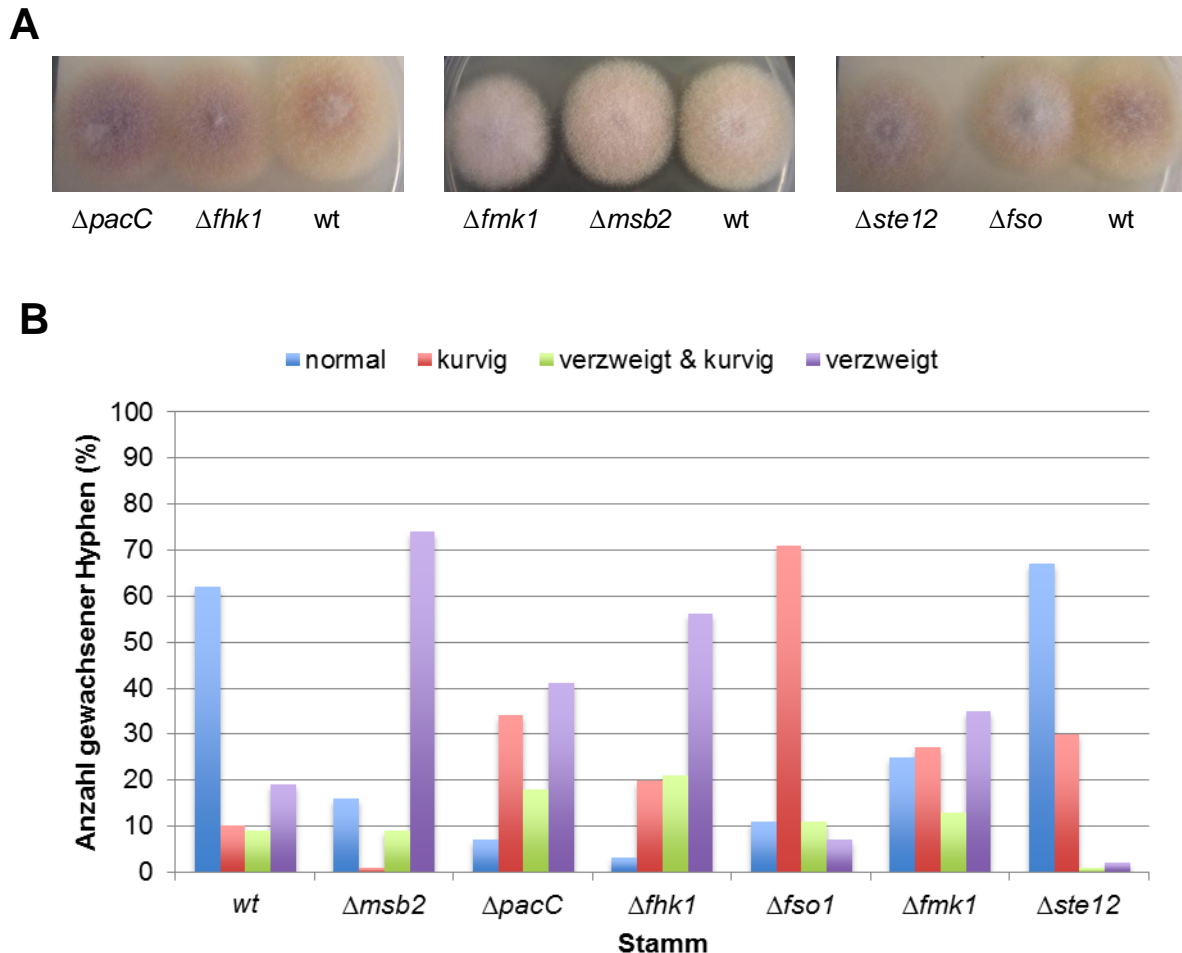


Abbildung 45: Auswirkungen veränderter Expression von *msb2*, *pacC*, *fhk1*, *fso1*, *fmk1* und *ste12* auf den Phänotyp. (A) Phänotyp der Deletionsmutanten auf Komplexmedium. Es ist kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. **(B)** Quantifizierung phänotypischer Effekte durch veränderte Expression. Der Wildtyp weist zu 60% ein normales Wachstum auf, wohin gegen bei $\Delta msb2$ und $\Delta fhk1$ die meisten Hyphen ein sehr verzweigtes Wachstum aufweisen. Bei $\Delta pacC$ und $\Delta fmk1$ sind fast gleich viele kurvige und verzweigte Hyphen vorhanden. Von $\Delta fso1$ sind fast alle ausgewerteten Hyphen kurvig, nur $\Delta ste12$ weist ein normales Wachstum mit einigen kurvig Hyphen auf.

Nun sollte die Biofilmbildung der Mutanten untersucht werden. Es wird vermutet, dass sich die Mutanten aufgrund der Deletion und deren bisher beschriebenen Auswirkungen auch bei der Biofilmbildung anders verhalten. Von jeder der sechs *Knock Out* Mutanten wurde durch Co-Transformation mit zwei Plasmiden ein Stamm hergestellt, dessen Zellkern grün fluoresziert. Es wurde das Plasmid pNRPK2GFP1, das die Kernlokalisierungsdomäne *stuA* mit *gfp* unter dem konstitutiven Promotor *gpdA* besitzt und das Plasmid pAK10 verwendet. Da alle Deletionsmutanten bis auf $\Delta fmk1$ eine Hygromycin-Resistenzkassette besitzen, wurde zur Selektion der

positiven Transformanten noch ein weiterer Marker benötigt. Das Plasmid pNRPK2GFP1 besitzt zur Selektion eine Hygromycin-Resistenzkassette und das Plasmid pAK10 eine Geneticin-Resistenzkassette, sodass nur die Protoplasten auf Medium mit Geneticin wachsen können, die das Plasmid pAK10 und bestenfalls pNRPK2GFP1 aufgenommen haben. Die Zugabe von Hygromycin ins Medium ist nicht notwendig, da die Mutanten auch ohne Aufnahme von pNRPK2GFP1 auf diese Medium wachsen könnten. Zur Analyse der Transformanten, wurden diese mikroskopisch untersucht und der Zellkern mit Hoechst (siehe Punkt 5.6.3) gegengefärbt. So entstanden folgende Stämme. SJZ04, $\Delta fso1$ mit *gfp::stuA*, einer Hygromycin und Geneticin Resistenz; SJZ05, $\Delta pacC$ mit *gfp::stuA*, einer Hygromycin und Geneticin Resistenz; SJZ06, $\Delta fmk1$ transformiert mit pNRPK2GFP1, also *gfp::stuA* mit Hygromycin Resistenz. Dieser Stamm war schon zuvor resistent gegen Geneticin; SJZ07, $\Delta fhk1$; SJZ08, $\Delta msb2$ und SJZ09, $\Delta ste12$, jeweils mit *gfp::stuA*, einer Hygromycin und Geneticin Resistenz.

Die transformierten Stämme wurden zur Bestimmung der Biofilmbildung anhand des Fluoreszenzsignals verwendet. Dazu wurde pro Stamm eine Mikrotiterplatte mit grauen Mulden und durchsichtigen Boden verwendet. Es wurde pro Mulde 200 μ l Komplexmedium (pH 5, 6.5, 7.5, 8 und 9) und $2 \cdot 10^4$ Sporen des jeweiligen *gfp::stuA* Stammes pipettiert. Pro Probe wurde ein doppelter Ansatz pipettiert und bei der Auswertung der Mittelwert aus beiden Werten berechnet. Die Mikrotiterplatten wurden bei 28°C stehend für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Mulden der Platten zwei Mal mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Das Ergebnis ist in Abbildung 46 dargestellt. Alle Deletionsmutanten können einen Biofilm bilden, wobei bei einigen Mutanten das Fluoreszenzsignal, und somit die Zahl des angehafteten Myzels größer als das vom Wildtyp Stamm ist. Vor allem bei der *msb2* Deletionsmutante ist das Fluoreszenzsignal bei allen pH-Werten bis auf pH 5 um ein vielfaches erhöht. Auch bei dem $\Delta pacC$ Stamm ist das Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Der $\Delta fmk1$ Stamm kann bei pH 6.5 und 7.5 am besten wachsen. Der $\Delta ste12$ Stamm hingegen wächst mit steigenden pH-Wert auch im Biofilm besser.

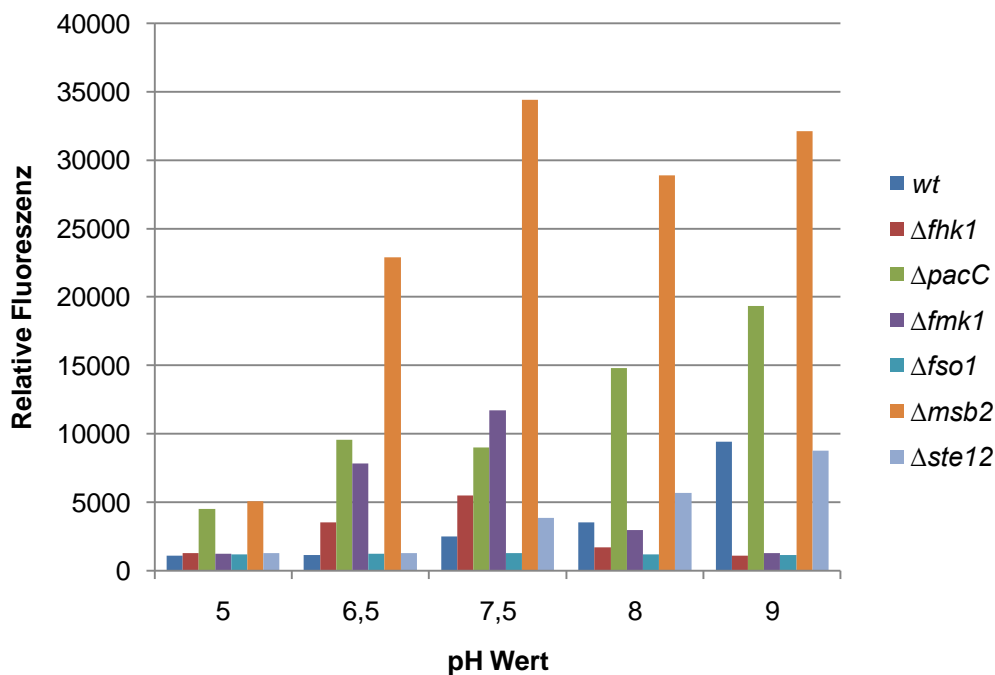
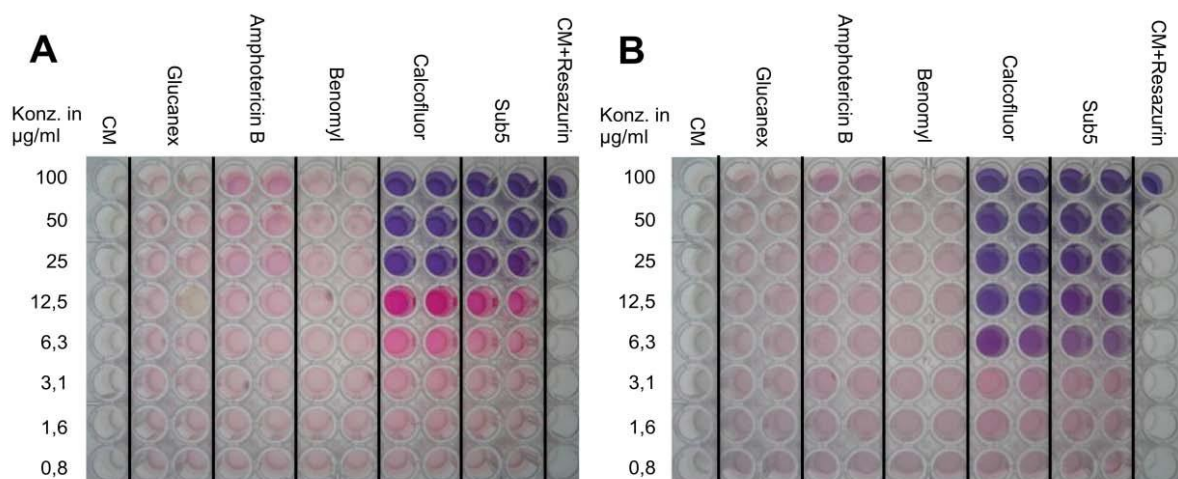


Abbildung 46: Messung der relativen Fluoreszenz zur Bestimmung des Wachstums der Deletionsmutanten von *F. oxysporum* Biofilm. Es wurden Mulden von einer Mikrotiterplatte mit 200 μ l Komplexmedium mit verschiedenen pH-Werten mit $2 \cdot 10^4$ Sporen der verschiedenen Knock Out Stämme mit *gfp::stuA* angeimpft (SJZ04-SJZ09) und bei 28°C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Mulden zwei Mal mit 0,85% Natriumchlorid-Lösung gespült, um nicht anhaftendes Myzel zu entfernen. Pro Probe wurden zwei Ansätze pipettiert und der Mittelwert berechnet. Es wird die relative Fluoreszenz berechnet, die sich auf einen Referenzwert, in diesem Fall auf das Wachstum vom Wildtyp bei pH 6.5 bezieht. Das Biofilmwachstum ist in allen Mutanten größer bzw. gleich groß wie das vom Wildtyp. Vor allem bei $\Delta pacC$ und $\Delta msb2$ ist die relative Fluoreszenz um einiges größer als im Wildtyp, was bedeutet, dass sich hier mehr Hyphen und Sporen im Biofilm angelagert haben.

Zusätzlich zur Untersuchung des Biofilmwachstums, wurde auch die Sensitivität der Deletionsmutanten gegenüber antimikrobiellen Substanzen im planktonischen Wachstum getestet. Dafür wurde ein Mikrotiterscreening-Assay mit Resazurin nach Mania *et al.* 2010 durchgeführt. Resazurin ist ein blauer Redox-Farbstoff, der durch die Respiration der Zellen zu dem pinken Farbstoff Resorufin reduziert wird. Jede Mulde der Mikrotiterplatte wurde mit 200 μ l Medium und einer definierte Menge von 10^4 Sporen pro 10 μ l der jeweiligen Deletionsmutante angeimpft. Resazurin wurde ins Medium gegeben, so dass eine 100 μ M Lösung entstand. Dieser Test wurde mit den in Punkt 3.2.5 bereits am Wildtyp getesteten Substanzen durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden für 16-24 Stunden bei 28°C inkubiert. Von den zu testenden Substanzen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodass die Konzentration

zwischen 0,8 und 100 $\mu\text{g/ml}$ lag. Pro zu testender Substanz wurden zwei Ansätze pipettiert. Als Kontrolle diente nur Medium mit Sporen ohne Resazurin und Medium mit Resazurin mit und ohne Sporen. Das Ergebnis des Resazurintests ist in Abbildung 47 dargestellt. Alle Deletionsstämme sind gegen die getesteten Konzentrationen von Glucanex, Amphotericin B und Benomyl resistent. Lediglich in der Sensitivität gegenüber Calcofluor und dem antimikrobiellen Peptid Sub5 sind Unterschiede zwischen den Stämmen zu erkennen. Das Ergebnis des Tests von $\Delta fhk1$ ist in Abbildung 47A zu sehen. Dieser Stamm kann ab einer Calcofluor und Sub5 Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ nicht mehr wachsen, ebenso wie $\Delta fmk1$ (siehe Abbildung 47C), $\Delta msb2$ (siehe Abbildung 47E) und $\Delta ste12$ (siehe Abbildung 47F). Die beiden Stämme $\Delta pacC$ und $\Delta fso1$ sind sensitiver gegenüber Calcofluor und Sub5 und können nur bis zu einer Konzentration von 3,1 $\mu\text{g/ml}$ wachsen (siehe Abbildung 47B und D).

Im Vergleich zum Wildtyp, bei dem Glucanex, Amphotericin B und Benomyl auch in der höchsten Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ keinen Effekt auf das Wachstum hatten, ist dies auch bei den Mutanten der Fall. Bei Calcofluor White hingegen konnte der Pilz ab einer Konzentration die höher als 6,3 $\mu\text{g/ml}$ ist, nicht mehr wachsen. Hier sind die $\Delta pacC$ und $\Delta fso1$ Stämme sensitiver als der Wildtyp. Unter Zugabe des antimikrobiellen Peptids Sub5 findet im Wildtyp das Wachstum nur bis zu einer Konzentration von 6,3 $\mu\text{g/ml}$ statt. Hier sind die $\Delta fhk1$, $\Delta fmk1$, $\Delta msb2$ und $\Delta ste12$ Mutanten resistenter als der Wildtyp, sie können noch bei einer Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ wachsen. $\Delta pacC$ und $\Delta fso1$ jedoch nur bis zu einer Konzentration von 3,1 $\mu\text{g/ml}$ Sub5. Da die Mutanten und der Wildtyp ähnlich auf die antimikrobiellen Substanzen wirken, wurde darauf verzichtet, die Wirkung im Biofilm zu testen.



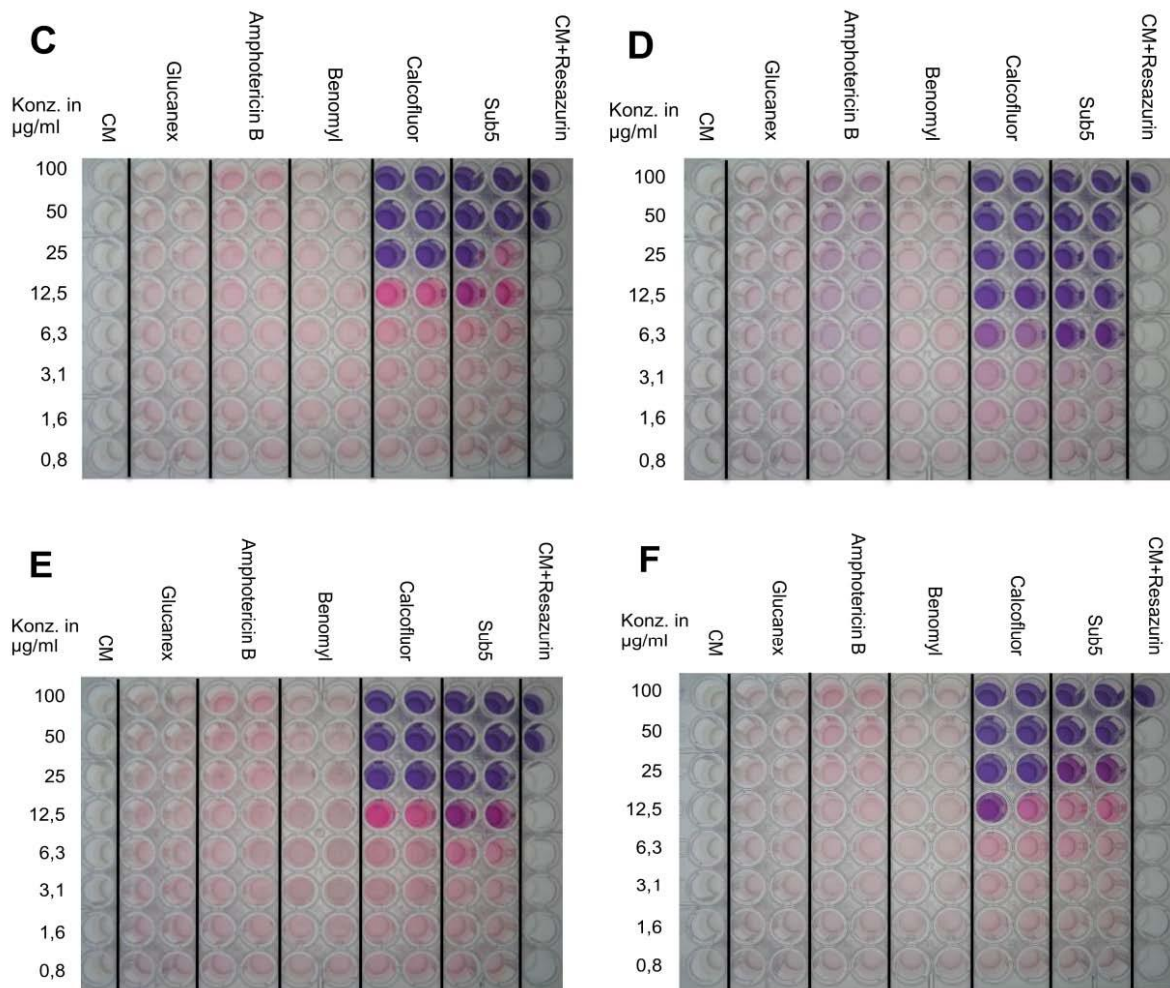


Abbildung 47: Mikrotiterscreening-Assay der Deletionsmutanten, getestet mit verschiedenen Substanzen im planktonischen Wachstum. In jeder Mulde befinden sich 10^4 Sporen der Deletionsmutanten von *F. oxysporum* in 200 µl Komplexmedium (CM) und 100 µM Resazurin. Die Platte wurde stehend bei 28°C für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration der einzelnen Substanzen ist an der linken y-Achse aufgeführt. Pro zu testender Substanz wurden zwei Ansätze pipettiert. Als Kontrolle diente nur Komplexmedium mit Sporen und Komplexmedium mit Resazurin mit und ohne Sporen. Bei Zugabe von Glucanex, Amphotericin B und Benomyl wird bei keinem der getesteten Stämme das Wachstum gehemmt. (A) Resazurin-Test von $\Delta fhk1$, nur bei Calcofluor und Sub5 ist das Wachstum ab einer Konzentration von 12,5 µg/ml gehemmt. (B) Der Stamm $\Delta pacC$ ist sensibler gegenüber Calcofluor und Sub5 wie die anderen Stämme. Er kann nur bis zu einer Konzentration von 3,1 µg/ml wachsen. (C) Der Stamm $\Delta fmk1$ ist wiederum resistenter, als $\Delta pacC$, er kann bis zu einer Konzentration von 12,5 µg/ml Calcofluor und Sub5 wachsen. (D) Beim Stamm $\Delta fso1$ findet ebenfalls kein Wachstum bei Calcofluor und Sub5 bei einer Konzentration höher wie 3,1 µg/ml statt. Bei den anderen getesteten Substanzen findet ein Wachstum bei allen Konzentrationen statt. (E) Der Stamm $\Delta msb2$ verhält sich bezüglich der Resistenz wie $\Delta fmk1$, und kann bis zu einer Konzentration von 12,5 µg/ml Calcofluor und Sub5 wachsen. Bei den anderen getesteten Substanzen kann er bei allen Konzentrationen wachsen. (D) Der Stamm $\Delta ste12$ kann bei allen Substanzen bis auf Calcofluor und Sub5 wachsen. Hier findet ab einer Konzentration von 12,5 µg/ml kein Wachstum mehr statt.

4 Diskussion

Biofilme sind in der Natur weit verbreitet und spielen auch in der Medizin eine große Rolle (Spormann, 2008). Sie können praktisch alle Oberflächen besiedeln, da ihr Anspruch an diese relativ gering ist (Flemming, 1991). Über Pilze in Biofilmen ist noch recht wenig bekannt, weshalb diese in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden. Zu Beginn wurde das Vorkommen von Pilzen in natürlichen und künstlichen Habitaten untersucht, um einen Eindruck zu bekommen, welche Pilze in nativen Biofilmen vorkommen können. Zusätzlich wurden auch Bakterien im natürlichen Habitat untersucht und Biofilme in den verschiedenen Habitaten auf einer Glasoberfläche gezüchtet. Um zukünftig die Anpassung von filamentösen Pilzen an das Wachstum in Biofilmen auf molekularbiologischer Ebene studieren zu können, wurde überprüft, ob *A. nidulans* und *F. oxysporum* im Biofilm wachsen können. Diese Pilze eignen sich für solche Untersuchungen gut, da ihr Genom vollständig sequenziert und leicht zugänglich ist (Galagan *et al.* 2005; Michielse & Rep, 2009). Die Expression verschiedener Gene im Biofilm wurde getestet, ebenso die Fähigkeit von Deletionsmutanten, einen Biofilm auszubilden. Des Weiteren wurde der Schutz gegenüber antimikrobiellen Substanzen im Biofilm getestet.

4.1 Charakterisierung von Pilzen in Biofilmen

Zur Charakterisierung der Pilzpopulation in Biofilmen wurden verschiedene Methoden verwendet. Die Pilzpopulation wurde molekularbiologisch durch das Erstellen einer Klonbibliothek und der Auftrennung durch die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) untersucht, sowie visuell mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

4.1.1 Geringe Diversität in natürlichen Habitaten

Um einen Eindruck über die Diversität der Pilze in den Biofilmen zu bekommen wurden von den Biofilmproben aus den natürlichen Habitaten Klonbibliotheken erstellt.

Im Biofilm, der aus dem See entnommen wurde, wurde *Anguillospora longissima*, ein Schlauchpilz, *Cladosporium cladosporioides*, ein sogenannter Schwärzepilz, *Heliscus lugdunensis*, ein aquatischer Schlauchpilz und *Phoma herbarum*, ein parasitischer

Pilz (vgl. Tabelle 1) gefunden. Der Schlauchpilz *A. longissima* wurde schon im Biofilm eines Gebirgsbachs mit Hilfe der FISH nachgewiesen (Baschien, 2008). Von *C. cladosporioides* ist bisher kein Biofilmwachstum bekannt. Normalerweise kommt dieser Pilz bevorzugt in Sumpfgebieten, im Wald und in Gärten vor, da er auf verfaultem Laub beziehungsweise Pflanzen wächst (Schubert *et al.* 2007). Auch von *H. lugdunensis*, gibt es keinen Hinweis, dass er in einem anderen Biofilm gefunden wurde. *P. herbarum* wurde im Wasser eines Wasserverteilungssystems in Warschau gefunden (Grabińska-Łoniewska *et al.* 2007), jedoch ist kein Biofilmwachstum von diesem Pilz bekannt. Die gefundenen Arten gehören innerhalb der Ascomyceten bis auf *H. lugdunensis* alle der Klasse der Dothideomyceten an. Die andern gefundenen ITS-Sequenzen im Biofilm waren noch nicht beschriebene Arten, jedoch ist es nicht unüblich, dass bei einer Klonbibliothek als Ergebnis viele zuvor anhand ihrer Sequenz nicht beschriebene Arten gefunden werden, da mit dieser Methode auch nicht kultivierbare Pilze detektiert werden (Schmeisser *et al.* 2003).

Zusätzlich zu den schon vorhandenen Biofilmen, wurde auch die Reproduzierbarkeit der Biofilme in der Alb getestet. Es wurde nur der humanpathogene Pilz *Candida tropicalis*, im Biofilm gefunden. *C. tropicalis* ist ein typischer und gut untersuchter Biofilmpilz (Harrison *et al.* 2007) und im Vergleich zu planktonischen Zellsuspensionen resistenter gegenüber Desinfektionsmittel und Antimykotika (Chandra *et al.* 2001; Harrison *et al.* 2006). Dies lässt darauf schließen, dass nicht alle im Biofilm vorkommenden Arten sich innerhalb von vier Wochen auf einer neuen Oberfläche ansiedeln können, beziehungsweise gar nicht auf einer Glasoberfläche wachsen können.

4.1.2 Die Diversität von Pilzen in künstlichen Habitaten ist groß

In der Kläranlage sind Mikroorganismen entscheidend an der Reinigung des Abwassers beteiligt, weshalb hier die Diversität von Bakterien und Pilzen sehr hoch ist (Rodgers *et al.* 2006). Bereits HIREMATH untersuchte die Pilzpopulation einer Kläranlage in Dharwad, Indien. Dazu wurde das Abwasser auf Kartoffel-Dextrose Agar mit Streptomycin ausplattiert. Es wurden 13 verschiedene Pilzarten isoliert, darunter auch *Trichosporon sp.*, der auch in dieser Arbeit im untersuchten Biofilm der Kläranlage häufig vorkam (Hiremath *et al.* 1985). In dieser Arbeit wurde vergleichend zu der Pilzpopulation in natürlichen Habitaten, auch die Population in künstlichen Habitaten, der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, untersucht. Es wurde zuerst eine

Klonbibliothek der zwei verschiedenen Probenahmestellen in der Kläranlage erstellt. Insgesamt wurden 24 verschiedenen Arten anhand ihrer ITS-Sequenz identifiziert. (vgl. Tabelle 3). Es wurden hauptsächlich Arten der Saccharomycetales und Tremellales gefunden, darunter einige typische Biofilmarten wie *Candida pelliculosa*, *C. tropicalis*, *Mucor racemosus* und *Saccharomyces cerevisiae*. PANNANUSORN zeigte das Biofilmwachstum von *C. pelliculosa* auf Silikon-Elastomeren (Pannanusorn *et al.* 2012). Dieser Pilz wurde auch im Zulaufabwasser der Kläranlage gefunden (Diplomarbeit, Julia Zoller 2009) und es liegt somit nahe, dass er auch im Biofilm des Zulaufs vorkommt. Ebenso der pathogene Stamm *Candida tropicalis*, der Biofilme unter anderem auf medizinischen Implantaten und auf Wirtsepithelzellen bildet (Bizerra *et al.* 2007) und typisch für die Kläranlage ist, wo er auch im unbehandelten Abwasser gefunden wurde (Buck & Bubucis, 1978). Das Biofilmwachstum von *Mucor racemosus* wurde in einem städtischen Wasserverteilungssystem von Doggett, 2000 gezeigt. DOGGETT verwendete bei seinen Untersuchungen jedoch eine klassische Isolationsmethode, er isolierte die verschiedenen Arten mit Hilfe von Kulturmedium. *M. racemosus* wurde ebenfalls bei früheren Untersuchungen des Zulaufabwassers gefunden (Diplomarbeit, Julia Zoller 2009). Ebenfalls ein typischer Biofilmbildner ist *S. cerevisiae*, der als Modell für die pilzliche Biofilmbildung gilt (Reynolds & Fink, 2001) und im Zulaufbiofilm der Kläranlage gefunden wurde. Im Vergleich zu den Klonbibliotheken der natürlichen Habitate, wurden hier deutlich mehr verschiedene Pilzarten im Biofilm gefunden. Eine Übersicht über die im Biofilm gefundenen und typischen Biofilmarten ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht von typischen Biofilmpilzen, die in der Kläranlage gefunden wurden

Spezies	Ordnung
<i>Candida pelliculosa</i>	Saccharomycetales
<i>Candida tropicalis</i>	Saccharomycetales
<i>Mucor racemosus</i>	Mucorales
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales

Es wurden 96 Arten gefunden, deren ITS-Sequenz nicht zuzuordnen ist, da diese Pilze vermutlich nicht kultivierbar sind (siehe Tabelle 4). Dies ist beim Erstellen einer Klonbibliothek nicht ungewöhnlich und auch bei Bakterien häufig der Fall, wo viele

neue und nicht kultivierte Arten mittels einer Klonbibliothek isoliert werden (Schmeisser *et al.* 2003). Isoliert man Bakterien mit der klassischen Methode, also auf Kulturmedium aus Biofilmen, so sind zumindest die kultivierbaren Organismen leicht zu isolieren. Die Arbeitsgruppe um SCHMEISSER isolierte Bakterien mit Hilfe einer Klonbibliothek aus einem Trinkwasser-Biofilm, wobei sie 650 Klone analysierten. Hierbei konnten nur 81 verschiedene Arten identifiziert werden, der Rest waren zuvor anhand ihrer Sequenz noch nicht beschriebene Bakterienarten (Schmeisser *et al.* 2003).

Phylogenetische Analysen zeigten jedoch, dass die meisten der im Biofilm der Kläranlage gefundenen unbekannt Arten mit Arten aus der Gattung *Candida* und *Trichoderma* verwandt sind.

Mit Hilfe der FISH konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Diversität von Bakterien und Pilzen im Biofilm von Zulauf und Ablauf sehr hoch ist (siehe Abbildung 13). Es wurden Sonden für die 18S rRNA von Pilzen und 16S rRNA von Bakterien verwendet. Es konnten jedoch viel mehr Bakterien als Pilze in den untersuchten Biofilmen nachgewiesen werden, was dem Ergebnis der Klonbibliothek des Biofilms auf der Glasoberfläche entspricht, wo mehr Bakterien- als Pilzarten gefunden wurden. Insgesamt waren die Objektträger stärker bewachsen als die, die in den natürlichen Gewässern inkubiert wurden, was ebenfalls auf eine größere Diversität von Mikroorganismen in der Kläranlage schließen lässt. Bei der FISH von Abwasserbiofilmen kann man erkennen, dass die Zulauf- und Ablaufbiofilme unterschiedlich bewachsen sind (siehe Abbildung 13). Die Zulaufbiofilme scheinen dichter besiedelt und dicker zu sein, während das Wachstum im Ablaufbiofilm eher dünnflächig erscheint. Das liegt wahrscheinlich daran, dass im Zulauf mehr Bakterien vorhanden sind, die auf dem Substrat eine flächendeckende Matrix aufbauen können und der Biofilm dreidimensionaler wächst.

Von den Biofilmproben aus der Kläranlage wurden ebenfalls eine Populationsanalyse mit Hilfe der PCR-DGGE und die anschließende Auswertung mit dem Dice-Koeffizienten durchgeführt (siehe Abbildung 14 und Tabelle 5). Es wurden Proben von den zwei verschiedenen Probenahmestellen zu allen vier Jahreszeiten miteinander verglichen. Generell ist die Pilzdiversität bei Stelle 1, also direkt hinter dem Grobrechen der Kläranlage größer. Jedoch muss die Anzahl und die Intensität der Banden nicht zwingend die Anzahl und Häufigkeit von Arten repräsentieren. So

ist es zum Beispiel bei Bakteriengemeinschaften der Fall, da Sequenzheterogenitäten in ribosomalen Genen durchaus zu mehr als einer DGGE-Bande führen können (Nübel *et al.* 1996). Die Auswertung mittels des Dice-Koeffizienten zeigt, dass die größte Übereinstimmung der Pilzorganismen zwischen Probenahmestelle 1 im Winter und Frühling bei 57% liegt, die sich nur durch die Jahreszeit der Probenentnahme unterscheiden (siehe Tabelle 5). Somit liegt nahe, dass die Pilzdiversität im Biofilm ähnlich ist. Es gibt keine vergleichbare Arbeit, in der die Pilzpopulation aus Biofilmen in der Kläranlage mittels DGGE-PCR analysiert wurde, da sich die meisten Gruppen auf die Bakterien konzentrieren.

4.2 Charakterisierung der Bakterienpopulation in Biofilmen

Um einen Eindruck über die Bakterienpopulation in Biofilmen zu bekommen, wurde in dieser Arbeit auch auf die Bakterien in Biofilmen der Kläranlage eingegangen. Untersucht wurden Biofilme aus dem Zulauf und dem Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und der Alb bei Eggenstein-Leopoldshafen anhand der 16S rDNA. Die Ordnung der Flavobacteriales ist mit acht gefundenen Arten die am Häufigsten vorkommende Ordnung, gefolgt von Legionellales und Burkholderiales mit jeweils vier Arten. Hier wurden ebenso wie bei den Pilzen viele unbekannte Bakterienarten gefunden, was jedoch nicht überraschend ist, da ca. 95% bis 99% aller auf der Erde vorkommenden Bakterienarten noch nicht näher bekannt sind (Mozaffari, 2011). Bakterien bevorzugen die sessile Lebensweise im Vergleich zum planktonischen Wachstum. Bisher konnte noch keine Bakterienspezies beobachtet werden, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nur in planktonischer Form vorkommt (Christensen, 1989; Carpentier & Cerf, 1993). Es wurde einige Biofilmbakterien gefunden, deren Wachstum bereits untersucht wurde (siehe Tabelle 10). Zum Beispiel *Acinetobacter sp.*, ein pathogener Erreger, der üblicherweise im Abwasser vorkommt und Biofilme bilden kann (James *et al.* 1995; Hendrickx *et al.* 2003). Ebenso *Brevundimonas sp.* und *Chryseobacterium sp.* deren Biofilmwachstum zusammen mit anderen in der Erde vorkommenden Arten untersucht wurde (Burmolle *et al.* 2007). *Corynebacterium variabile* wurde in einem Biofilm gefunden, der in einem Batch-Biofilm-Reaktor durch Zugabe von Belebtschlamm aus einer Kläranlage gewachsen ist (Xiao *et al.* 2008). *Dechloromonas sp.* wurde in einem Biofilm auf einem Rohr das in Mischwasser inkubiert wurde, mit Hilfe der PCR-DGGE und anschließender Sequenzierung der Bande, gefunden (Yu *et al.* 2010). Mit

Pseudomonas aeruginosa wurde ein gut untersuchtes Biofilmbakterium gefunden, das als Modellorganismus der Biofilmentstehung gilt (Ghafoor *et al.* 2011). Es ist ein weit verbreiteter Boden- und Wasserkeim, der in feuchten Milieus vorkommt und dessen Genexpression während der Biofilmbildung analysiert wurde (Whiteley *et al.* 2001).

Tabelle 10: Übersicht von Biofilmbakterien, deren Biofilmwachstum bereits untersucht wurde und die in der Kläranlage, sowie in der Alb gefunden wurden

Spezies	Ordnung
<i>Acinetobacter sp.</i>	Pseudomonadales
<i>Brevundimonas sp.</i>	Caulobacterales
<i>Chryseobacterium sp.</i>	Flavobacteriales
<i>Corynebacterium variabile</i>	Actinomycetales
<i>Dechloromonas sp.</i>	Rhodocyclales
<i>Duganella sp.</i>	Burkholderiales
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadales

Ebenso wurde die Fähigkeit der im Gewässer vorkommenden Bakterien einen neuen Biofilm auf einer Glasoberfläche auszubilden, untersucht. Die am häufigsten isolierten Arten waren *Arcobacter sp.* und *Arcobacter cryaerophilus* mit jeweils vier Arten, gefolgt von Arten der Bacteroidetes und der Beta Proteobakterien. Die am häufigsten vertretene Ordnung ist die der Campylobacterales mit vier gefundenen Arten. Bakterien können sich im Vergleich zu den in der Kläranlage vorkommenden Pilzen schneller an eine Glasoberfläche anheften, wie das Ergebnis zeigt. Es wurden deutlich mehr Bakterienarten im Biofilm auf der Glasoberfläche isoliert, als Pilzspezies. Es wurden einige Bakterien gefunden, deren Biofilmwachstum schon untersucht wurde (siehe Tabelle 11). *Dechloromonas sp.* wurde in einem Biofilm auf einem Rohr gefunden (Yu *et al.* 2010) und *Flavobacterium limicola* auf einem Schilfstängel in einem Fluss in Ungarn (Rusznayák *et al.* 2007). *Rhodoferrax ferrireducens*, ein Bakterium, das Eisen (III) mit Acetat als Kohlenstoffquelle reduziert, wächst im Biofilm auf einer Anodenoberfläche (Liu *et al.* 2007).

Tabelle 11: Übersicht von Biofilmbakterien, deren Biofilmwachstum bereits untersucht wurde und die auf dem Biofilmen auf der Glasoberfläche gefunden wurden

Spezies	Ordnung
<i>Dechloromonas sp</i>	Rhodocyclales
<i>Flavobacterium limicola</i>	Flavobacteriales
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	Burkholderiales
<i>Trichococcus sp.</i>	Lactobacillales

Vergleichend zu den schon vorhandenen Biofilmen wurden drei Arten und Vertreter von zwei Klassen im Biofilm auf der Glasoberfläche wieder gefunden. Darunter *Dechloromonas sp.*, *Duganella sp.* und *Rickettsiella*, ein Symbiont von *Asellus aquaticus*, sowie Arten aus der Klasse der Bacteroidetes und den Beta Proteobakterien, was bedeutet, dass Vertreter dieser Arten sich relativ schnell auf einer neuen Oberfläche ansiedeln können.

Die Diversität der Biofilme und die Gemeinsamkeiten zwischen den Biofilmen wurden mit Hilfe der PCR-DGGE untersucht. Hier wurden Biofilme vom Zu- und Ablauf der Kläranlage, der Alb und einem Biofilm, der auf einer Glasoberfläche in der Alb angezogen wurde, miteinander verglichen. Anhand des DGGE-Gels sind im Vergleich zu den Pilzen mehr Banden zu erkennen, was bedeutet dass die Diversität der Bakterien in den untersuchten Biofilmen größer ist, als die der Pilze. Bei den Bakterien liegt die Anzahl der Banden, die im Regelfall für die Anzahl der Arten steht, zwischen 23 und 46 (siehe Abbildung 19). Die Übereinstimmungen der Biofilme liegen zwischen 23% und 38%, wobei die Übereinstimmung zwischen beiden Probenahmestellen in der Kläranlage und zwischen dem Ablauf der Kläranlage und dem Biofilm auf der Glasoberfläche mit 38% am größten ist (vgl. Tabelle 8). Die relativ große Übereinstimmung von Ablauf und Alb ist damit verbunden, dass der Ablauf der Kläranlage in die Alb geleitet wird und die Probenahmestelle der Alb nur einige Meter nach dem Zufluss des Ablaufs erfolgte.

4.3 *A. nidulans* kann im Biofilm wachsen

In dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass *A. nidulans* im Biofilm wachsen kann und fest eingebettet ist (vgl. Abbildung 20). Jedoch konnten sich erst nach relativ langer Zeit von 15 Wochen Hyphen bilden. Da *A. nidulans* erst nach so langer Zeit

„richtig“ im Biofilm wachsen kann, wird vermutet, dass er sich den Bedingungen im Biofilm nicht gut anpassen kann und nicht vor den anderen Mikroorganismen im Biofilm geschützt ist. Bisher gibt es keine vergleichbare Literatur, in der beschrieben wird, ob *A. nidulans* zum Biofilmwachstum fähig ist. Generell gibt es sehr wenige Berichte über die Molekularbiologie und die funktionelle Genomik von *Aspergillus* Biofilmen (Gutiérrez-Correa *et al.* 2012). MOWAT entwickelte ein einfaches Modell, um die Wirkung von Antimykotika auf multizelluläre Gemeinschaften von *A. fumigatus* zu testen (Mowat *et al.* 2007). Bis zu einer Inkubationszeit von zehn Stunden wurde kein filamentöses Wachstum beobachtet, danach erfolgte jedoch ein exponentieller Anstieg der Biofilmbiomasse (Hyphen und extrazelluläres Material) und der Zellaktivität. Zusammenfassend zeigt die Studie, dass *A. fumigatus* die Fähigkeit besitzt, anhaftende vielzellige Biofilm-Strukturen zu bilden, die resistent gegenüber den Auswirkungen der Antimykotika sind. Von *A. niger* ist ebenfalls bekannt, dass er in Biofilmen wachsen kann und dies für die Bildung von Cellulase genutzt wird. Die Produktion von Cellulase des Biofilms ist im Biofilm 70% höher als die des planktonischen Myzels (Villena *et al.* 2006).

4.4 Untersuchung der Biofilmbildung anhand von *F. oxysporum*

Da *A. nidulans* im Biofilm zwar wachsen kann, jedoch nur sehr langsam, wurde für weitere Biofilmuntersuchungen der pflanzenpathogene Modellorganismus *F. oxysporum* gewählt. Es gibt einige wenige Publikationen, die das Wachstum von *F. oxysporum* im Biofilm belegen. So wurde zum Beispiel die Biofilmbildung auf Kontaktlinsen (Imamura *et al.* 2008, Ramani & Chaturvedi, 2011) und auf Venenkathetern untersucht (Raad & Hachem, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *F. oxysporum* Biofilme alleine, sowie zusammen mit anderen Mikroorganismen, auf Glasoberflächen und Polystyren ausbilden kann. Zur Untersuchung des Biofilmwachstums wurde ein *F. oxysporum* Stamm hergestellt, der die Kernlokalisierungsdomäne des Gens *stuA* mit *gfp* unter dem konstitutiven Promotor *gpdA* besitzt (SJZ03). Bereits nach 40 Stunden bildeten sich große Hyphennester (siehe Abbildung 21). Der Pilz scheint besser zu wachsen, wenn Bedingungen wie in der Kläranlage herrschen, also das Medium dem kommunalen Abwasser entspricht.

RAMANI benutzte für seine Biofilmuntersuchungen RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe), ein Zellkulturmedium. Darin ließ er *F. oxysporum* Sporen für 48 Stunden in einer Durchflussskammer wachsen. Der Biofilm wurde schließlich mit 5-Chloromethylfluorescein Diacetat (CMFDA, färbt lebende Zellen) und SytoxRed (färbt tote Zellen) gefärbt (siehe Abbildung 5). Dieser *F. oxysporum* Biofilm ist deutlich kompakter und dreidimensionaler, als der in dieser Arbeit untersuchte Biofilm von *F. oxysporum* (Ramani & Chaturvedi, 2011).

Um zu untersuchen, wie *F. oxysporum* im Biofilm wächst, wenn noch andere Mikroorganismen vorhanden sind, wurde zu den Sporen konzentrierter Ablauf aus der Kläranlage als Inokulum gegeben. Hier scheint es bei der Inkubation mit Komplexmedium, sowie synthetischem Abwasser, als ob der Pilz zusammen mit anderen Mikroorganismen besser an eine Oberfläche anheften kann, da große Hyphennester beobachtet wurden (siehe Abbildung 23 und 24). Es ist bereits bekannt, dass sich in einem gemischten Biofilm Bakterien als erstes an eine Oberfläche anlagern, eine EPS ausbilden und sich erst dann andere Mikroorganismen wie Pilze und Einzeller anlagern (Flemming & Wingender, 2001). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der *F. oxysporum* in Anwesenheit von Bakterien und anderen Mikroorganismen aus der Kläranlage besser im Biofilm wachsen kann (siehe Abbildung 23 und 24).

In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass im Biofilm Gene für die Stressantwort in Bezug auf den pH-Wert vermehrt exprimiert werden (siehe Punkt 3.2.3.6), weshalb hier der Einfluss des pH-Wertes auf die Biofilmbildung ebenfalls untersucht wurde. Das Biofilmwachstum bei pH 5 und pH 8 wurde mikroskopisch bestimmt. Unter diesen pH-Bedingungen können die Sporen auch nach sieben Tagen nicht auskeimen (vgl. Abbildung 25). Die flüssige Komponente, also das Medium, beeinflusst mit seinem pH-Wert den Aufbau und die Struktur des Biofilms (Martenssen, 2001). Laut FLEMMING sind Mikroorganismen im Biofilm vor pH-Extremen zwar geschützt (Flemming & Wingender, 2001), jedoch konnte sich auch nach sieben Tagen kein kompakter Biofilm ausbilden. FERRIS zeigte, dass auch bei einem sauren pH-Wert von 3.1 Biofilme auf Ehoxylinharz-imprägniertem Filterpapier in Wasser das mit Metallen aus Minenabfällen verunreinigt ist, wachsen können (Ferris *et al.* 1989). Eine Übersicht über die pH-Regulation in *A. nidulans* ist in Abbildung 48 dargestellt. Der Signaltransduktionsweg, der den umgebenden pH-Wert erkennt, ist anders als andere bekannte Signaltransduktionswege. Es ist nur die

Funktion von vier der sechs Pal-Genen bekannt, PalA, PalB, PalH und Pall. Es gibt zwei potentielle Plasmamembran pH-Sensoren, Pall und PalH, welche das Signal an den Multiproteinkomplex mit PalA, PalB und Vps32 weiterleiten. PacC wird durch den Pal-Signalweg aktiviert und aktiviert alkalisch exprimierte Gene und reprimiert Säure-induzierte Gene (Arst & Penalva, 2003).

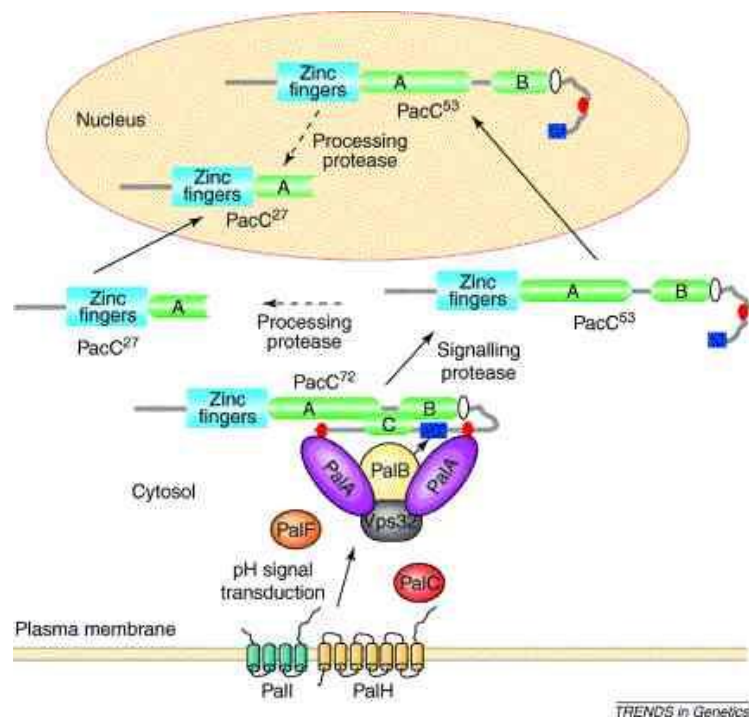


Abbildung 48: Modell der pH-Regulation am Beispiel von *A. nidulans*. Eine oder Beide der Membranproteine PalH und Pall übermitteln das alkalische pH-Signal über undefinierte Schritte zu der Signal-Protease PalB. Die Position des Multiproteinkomplexes mit PalA, PalB und Vps32 mit der Interaktion zwischen dem PalA Dimer und den zwei PalA Bindestellen ist hypothetisch. (Arst & Penalva, 2003)

Das Biofilmwachstum bei einem pH-Wert von 5 und 8 wurde ebenfalls anhand des *F. oxysporum* Stammes SJZ03 und der Auswertung des Fluoreszenzsignals mittels *Platereaders* bestimmt. Zusätzlich wurde auch das Biofilmwachstum bei pH 7.5 und pH 9 gemessen (siehe Abbildung 26). Zwischen den einzelnen pH-Werten ist kein großer Unterschied im Wachstum zu erkennen. Bei pH 6.5, haben sich am meisten Sporen im Biofilm angelagert und bei pH 9 können sich am wenigstens Sporen und Hyphen im Biofilm am Muldenboden der Mikrotiterplatte anheften. Jedoch kann man mit dieser Methode nur die Signalstärke von GFP messen und keine Aussage über das Wachstum des Pilzes machen. So kann es sein, dass die gemessene Fluoreszenz zwar sehr hoch im Vergleich zu den anderen pH-Werten ist,

jedoch nicht, ob nur Sporen vorhanden sind oder auch Hyphen. Die Werte stimmen mit den Ergebnissen der Mikroskopie überein. Hier wurde bei pH 5; 6.5 und 8 ein Anheften an die Oberfläche, also eine Biofilmbildung beobachtet, wobei bei pH 5 und 8 eine hohe Anzahl an Sporen vorhanden waren, die nicht ausgekeimt waren (siehe Abbildung 25).

Da in Biofilmen Stressgene vermehrt exprimiert werden (Ren *et al.* 2003; Yeater *et al.* 2007), wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene Stressgene von *F. oxysporum* bezüglich ihrer Expression im Biofilm getestet. Die Expression der Histidin-Kinase Fhk1, den pH-Response Transkriptionsfaktoren PacC und PalA und den pH-Response Regulatoren PalC und FOX_6549 bei pH 6.5 im Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum wurde untersucht. Der pH-Transkriptionsfaktor *pacC* ist im Vergleich zum planktonischen Wachstum im Biofilm 30-fach erhöht exprimiert und der pH-Transkriptionsfaktor *palA* um das 15-fache. *Fhk1* und *palC* sind um jeweils das 1,5-fache und FOX6549 um das 0,6-fache erhöht (siehe Abbildung 32). Wie bereits erwähnt, ist es offensichtlich, dass Mikroorganismen erhebliche Veränderungen während des Übergangs von planktonischem zum Biofilmwachstum durchleben. Die Entwicklung zu einem fertig ausgebildeten Biofilm benötigt Veränderungen in der Genexpression der Organismen (Kuchma & O'Toole, 2000). Es wurde vielfach gezeigt, dass Stressgene im Biofilm vermehrt exprimiert werden, jedoch wurden meist Gene gefunden, die auf oxidativen Stress oder auf osmotischen und thermischen Stress reagieren (Yeater *et al.* 2007). Von der veränderten Expression von pH-Stressgenen in Biofilmen ist bisher noch nichts bekannt. Oxidativer Stress in filamentösen Pilzen wurde zum Beispiel von Angelova *et al.* 2005 untersucht. Pilze, die oxidativem Stress durch H₂O₂ oder Paraquat, eine quaternäre Ammoniumverbindung, ausgesetzt sind, produzieren weniger Biomasse und die Keimung der Sporen wird gehemmt (Angelova *et al.* 2005). Osmotischer Stress, dem Pilze zum Beispiel bei hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt sind, wurde in *A. nidulans* von Han & Prade, 2002 untersucht. Sie fanden heraus, dass das Hyphenwachstum bei einer Konzentration von mehr als 60% Salz reduziert ist. Anhand mikroskopischer Untersuchungen fanden sie heraus, dass die Hyphen verzweigt waren, die Zellkerne sich unverhältnismäßig anreicherten und sich keine Septen mehr bildeten (Han & Prade, 2002). In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass bei Umweltstress wie Hitzeschock, osmotischem Schock, Hunger, DNA-Schäden

oder extreme pH-Werte, die Expression von ca. 300 Genen induziert und von ca. 600 Genen reprimiert wird (Gasch *et al.* 2000; Causton *et al.* 2001).

Da die pH-Response Transkriptionsfaktoren PacC und PalA im Biofilm verstärkt exprimiert werden, wurde die Expression der Gene im Biofilm unter verschiedenen pH-Bedingungen getestet. Auch die Expression des pH-Response Regulators PalC im Biofilm wurde getestet (siehe Abbildung 33). *PacC* wird im Biofilm nur bei einem pH-Wert von 6.5 exprimiert, im planktonischen Wachstum findet jedoch fast keine Expression statt. *PacC* scheint auf pH-Werte im neutralen Bereich zu reagieren, zumindest im Biofilm bei pH 6.5 ist *pacC* um das 30-fache exprimiert im Vergleich zum planktonischen Wachstum. Im sauren und alkalischen Milieu wird *pacC* kaum exprimiert, was auch am Schutz im Biofilm vor pH-Schwankungen liegen kann (Flemming & Wingender, 2001). Bisher weiß man über den pH-Response Transkriptionsfaktor PacC, dass er als Transkriptionsaktivator von alkalisch exprimierten Genen, sowie als Repressor von Säure-induzierten Genen dient (Tilburn *et al.* 1995; Espeso & Arst, 2000). In *A. nidulans* fungiert der Transkriptionsfaktor PacC ebenso wie in *F. oxysporum* als Aktivator von Genen, die unter alkalischen Bedingungen exprimiert werden und als Repressor von Genen, die unter sauren Bedingungen exprimiert werden (Penalva *et al.* 2008). *PalA* wird im Biofilm bei pH 5 und pH 8 ebenfalls kaum exprimiert, wohingegen er im planktonischen Wachstum bei pH 5 (14-fache) und pH 8 (20-fache) verstärkt exprimiert wird. Hier ist das Ergebnis gegensätzlich, da im Biofilm kaum eine Expression von *PalA* bei pH 5 und pH 8 stattfindet, was wahrscheinlich durch den Schutz durch die Matrix im Biofilm vor pH-Schwankungen zustande kommt. Im planktonischen Wachstum ist kein Schutz gegenüber pH-Schwankungen vorhanden, der pH-Response Transkriptionsfaktor reagiert auf die Änderung des pH-Werts und wird vermehrt exprimiert. In *F. oxysporum* ist nichts Näheres über die Funktion von *PalA* bekannt. In *A. nidulans* ist *PalA* Teil eines Signalübertragungsweges, der die pH-Regulation durch Genexpression vermittelt und an der umgebenden pH-Regulation beteiligt ist (siehe Abbildung 48) (Negrete-Urtasun *et al.* 1997). Umgekehrt ist es beim pH-Response Regulator PalC, er wird im Biofilm verstärkt bei pH 5 und pH 8 exprimiert, im planktonischen ist die Expression bei pH 5 um das 9-fache im Vergleich zum Biofilm erhöht. Bei pH 6.5 ist die Expression jeweils am niedrigsten, was bedeutet, dass PalC nicht auf ein neutrales Milieu reagiert, sondern nur auf ein saures und alkalisches Milieu. Das zu PalC homologe PalC in *A. nidulans* ist Teil

eines pH-Signal Transduktionssignalwegs, der in einer alkalischen Umgebung aktiv ist (Tilburn *et al.* 2005). Was auch auf *F. oxysporum* zu treffen würde, der jedoch zusätzlich noch in einer sauren Umgebung aktiv ist.

Das Wachstumsverhalten von *F. oxysporum* im Biofilm in Anwesenheit von *E. coli* und *P. putida* wurde ebenfalls bestimmt. Das Wachstum wurde mittels mikroskopischen Untersuchungen und der Messung der Fluoreszenz des fluoreszenzmarkierten Stammes SJZ03 bestimmt. Das Wachstum des Biofilms auf der Glasoberfläche unter Anwesenheit von *E. coli* verläuft langsamer als das ohnedie Anwesenheit von Bakterien (siehe Abbildung 34A). Das Biofilmwachstum in Anwesenheit von *P. putida* verläuft bis nach 48 Stunden nach der Inkubation vergleichbar wie das ohne Bakterium (siehe Abbildung 21 und 22), nach 72 Stunden jedoch weist der Pilz eine abnormale Form auf (siehe Abbildung 34B). Möglicherweise produziert *P. putida* Stoffe, die antimykotisch wirken.

LIM beschreibt die antimykotische Wirkung von *P. stutzeri* auf *F. solani* (Lim *et al.* 1991). Die Gruppe fand heraus, dass *P. stutzeri* extrazelluläre Chitinase und Laminarinase bei Wachstum auf Chitin, Laminarin oder Myzel von *F. solani* produziert. Diese lytischen Enzyme verhindern das Myzelwachstum und die Sporenkeimung und verursachen eine Lyse des Myzels. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen den Abbau des Myzels und eine abnorme Hyphenschwellung (siehe Abbildung 49), wie es auch beim Wachstum von *F. oxysporum* mit *P. putida* zu sehen ist (siehe Abbildung 34B). Ebenfalls zeigt *P. aureofaciens* eine antimykotische Wirkung (Vincent *et al.* 1991). Dieses Bakterium produziert das antibiotische 2,4-Diacetophloroglucinol, ein natürliches Phenol, welches das Wachstum von *Gaeumannomyces graminis*, einem pflanzenpathogenen Pilz und anderen Pilzen *in vitro* hemmt. Die Hemmung des Wachstums vom Pilz wurde auf Agarplatten gezeigt.

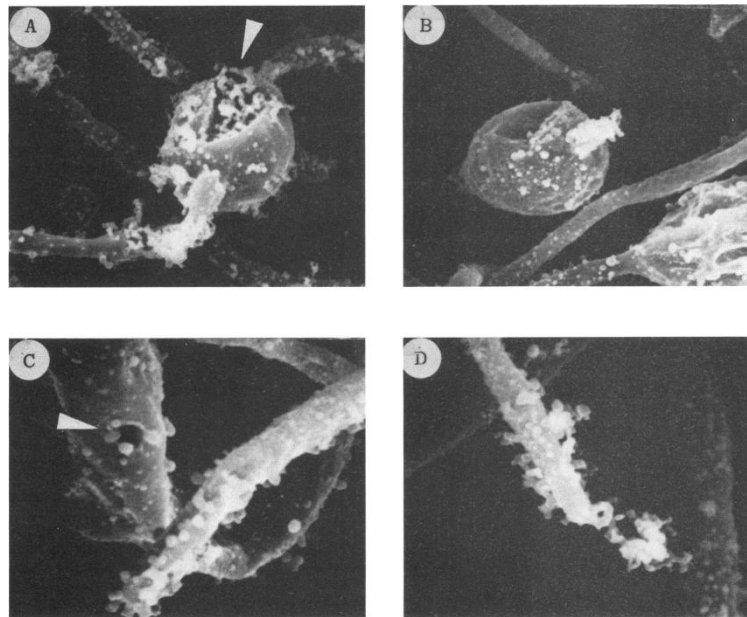


Abbildung 49: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *F. solani* Hypheninteraktionen mit *P. stutzeri* in einer Kultur. (A) Abnormale Hyphen mit Schwellungen und Ausfluss von Protoplasma (Pfeil) durch Zerfall der Hyphen verursacht. (B) Rückgang der Hyphen. (C) Lysiertes Loch auf einer Hyphemit dem Bakterium (Pfeil). (D) Unregelmäßige Wand einer "verkümmerten" Hyphe und Lyseder Hyphenspitze. (Lim *et al.* 1991)

Sechs verschiedene Mutanten, $\Delta fhk1$, $\Delta pacC$, $\Delta fmk1$, $\Delta fso1$, $\Delta msb2$ und $\Delta ste12$ wurden in dieser Arbeit auf ihre Biofilmbildung bei unterschiedlichen pH-Werten des Mediums untersucht (siehe Abbildung 46). Des Weiteren wurde die Sensitivität gegenüber den getesteten antimikrobiellen Substanzen im Biofilm bestimmt. Alle getesteten Mutanten können einen Biofilm ausbilden, wobei einige Mutanten besser im Biofilm wachsen können, als der Wildtyp. Der $\Delta msb2$ Stamm, dem ein glykosiliertes Mucin Membranprotein fehlt, kann um einiges besser im Biofilm wachsen als der Wildtyp. Hier war das Fluoreszenzsignal nach 48 Stunden Wachstum teilweise bis um das 35-fache erhöht (siehe Abbildung 46). In *C. albicans* wurde das Gegenteil festgestellt, dort bildet die $\Delta msb2$ Mutante drei Mal weniger Biofilmmasse innerhalb von 24 Stunden, als der Wildtyp. Nach 48 Stunden war die Biofilmbildung jedoch bei beiden Stämmen gleich stark (Puri *et al.* 2012). In *C. albicans* zeigt die *msb2* Mutante eine veränderte Sensitivität gegenüber Kongorot, Caspofungin, Zymolyase und Tunicamycin, was vermuten lässt, dass dieses Protein in die Zellwand-Biosynthese involviert ist (Román *et al.* 2009). Bei der Mutante fehlt dem Stamm diese Fähigkeit, was möglicherweise zur schlechteren und langsameren Bildung eines Biofilms führt. In *F. oxysporum* ist *Msb2* hingegen für die Stressantwort notwendig (Pérez-Nadales & Di Pietro, 2011).

Der $\Delta pacC$ Stamm kann ebenfalls mehr Biofilmmasse als der Wildtyp bilden. Über den Zusammenhang zwischen PacC und der Biofilmbildung in anderen Organismen ist noch nichts bekannt. PacC wird in *F. oxysporum* bei alkalischen Bedingungen exprimiert (Caracuel *et al.* 2003). Möglicherweise herrschen im Biofilm alkalische Bedingungen und PacC unterdrückt normalerweise die Expression von Genen im alkalischen Milieu. In der Mutante werden diese Gene nun nicht mehr gehemmt und es kommt zum normalen Biofilmwachstum.

Bei pH 6.5, 7.5 und 8 des Mediums kann der $\Delta fmk1$ Stamm deutlich besser als der Wildtyp Stamm wachsen. In *F. oxysporum* ist Fmk1 für die vegetative Hyphenfusion notwendig (Prados Rosales & Di Pietro, 2008). Ebenso sind Deletionsmutanten von *fmk1* fehlerhaft in mehreren Virulenz-Funktionen, wie beispielsweise der Anhaftung an Tomatenwurzeln und die Penetration (Di Pietro *et al.* 2001; Delgado-Jarana *et al.* 2005). In pathogenen Bakterien, wie *P. aeruginosa* hängt die Bildung von Biofilmen auf Wurzeloberflächen mit der Virulenz zusammen (Walker *et al.* 2004). Möglicherweise spielt dieser Aspekt auch hier eine Rolle und *F.oxysporum* kann besser einen Biofilm bilden, da er in mehreren Virulenzfunktionen fehlerhaft ist.

Der $\Delta ste12$ Stamm hingegen wächst mit steigenden pH-Wert des Mediums im Biofilm besser als der Wildtyp. Deletionsmutanten von *ste12* sind im Wachstum gehemmt und haben eine reduzierte Virulenz gegenüber Tomaten (Rispaill & Di Pietro, 2009). In *S. cerevisiae* bilden Stämme, die eine Mutation im *ste12* Gen haben einen Biofilm wesentlich langsamer als der Wildtyp aus und haben eine reduzierte Filamentbildung (Reynolds & Fink, 2001). Hier ist es jedoch umgekehrt, die Mutante bildet ab einem pH höher als 7.5 im Medium mehr Biofilmmasse als der Wildtyp.

Im Biofilmwachstum ähnlich wie der Wildtyp, bis auf pH 6.5 und 7.5, verhält sich die Mutante $\Delta fhk1$. Mutanten, denen dieses Gen fehlt, sind in vielen Virulenzfunktionen, wie der vegetativen Hyphenfusion beeinträchtigt (Di Pietro *et al.* 2001; Delgado-Jarana *et al.* 2005; Prados Rosales & Di Pietro, 2008), weshalb zu erwarten wäre, dass sie auf Grund der Beeinträchtigung in der vegetativen Hyphenfusion schlechter als der Wildtyp Biofilme ausbilden können. Die $\Delta fso1$ Mutante verhält sich in allen Fällen wie der Wildtyp und zeigt keinen Defekt in der Biofilmbildung.

4.5 Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf die Biofilmbildung

Ein Vorteil von Biofilmwachstum gegenüber planktonischen Wachstums, ist der erhöhte Schutz gegenüber antimikrobiellen Reagenzien. Bakterien und Pilze sind bis zu 1000-fach resistenter gegen Antimikrobiotika, als frei lebende Organismen (Ramage *et al.* 2001; Di Bonaventura *et al.* 2006). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf das Biofilmwachstum des Wildtyps im Vergleich zum planktonischen Wachstum getestet.

Es wurde die Auswirkung von fünf verschiedenen Substanzen auf das Wachstum von *F. oxysporum* getestet. Zum Vergleich der Resistenz im Biofilm gegenüber dem planktonischen Wachstum, wurde zuerst das Wachstum unter Zugabe der antimikrobiellen Substanzen von freilebenden Organismen getestet. Im planktonischen Wachstum ist der Pilz gegenüber Glucanex, Amphotericin B und Benomyl bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml resistent. Amphotericin B wird zur Behandlung von Aspergillose verwendet, weshalb die Gruppe um PFALLER die Wirkung auf *Aspergillus sp.* getestet hat. Sie testeten 198 Isolate von *Aspergillus sp.* und 89% davon wurden durch Amphotericin B gehemmt. Von *A. terreus* wurden nur 25% der Isolate durch eine Konzentration von ≤ 1 µg/ml im Wachstum gehemmt. Der Einfluss auf *F. oxysporum* wurde ebenfalls getestet, jedoch war Amphotericin B nicht aktiv gegen *F. oxysporum* (Pfaller *et al.* 2002). Die Tests auf das planktonische Wachstum zeigten das gleiche Ergebnis, jedoch konnte sich bei einer Konzentration höher als 25 µg/ml Amphotericin B kein Biofilm mehr ausbilden, da wahrscheinlich die Anhaftung an die Oberfläche nur bei einer niedrigeren Konzentration möglich ist. Die Wirkung von Benomyl auf das planktonische Wachstum von filamentösen Pilzen wurde bereits von ALKHAIL, 2005 untersucht. Benomyl hemmte das Wachstum von *F. oxysporum* um 94,4% bei einer Konzentration von 12,5; 25 und 50 µg (Alkhail, 2005). In dieser Arbeit war der Pilz bis zu einer gemessenen Konzentration von 100 µg/ml Benomyl resistent, im Biofilm hingegen, konnte *F. oxysporum* nur bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml Benomyl wachsen. Calcofluor White zeigte bereits in Untersuchungen in unserem Labor, dass es das Wachstum von *Aspergillus* hemmt (Beatrice Gutt, unveröffentlicht). Auch *F. oxysporum* konnte nur bis zu einer Konzentration von 6,3 µg/ml im planktonischen Wachstum wachsen. Im Biofilm hingegen findet auch ein Wachstum bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml statt. Calcofluor White scheint die Anheftung von *F. oxysporum* an eine Oberfläche

nicht zu verhindern. *S. cerevisiae* bildet multizelluläre Aggregate, da die Trennung der Mutter- und Tochterzellen unvollständig verläuft. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten abnormale, dicke Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle die durch die Anwesenheit von Calcofluor entstanden (Roncero & Duran, 1985).

Das antimikrobielle Peptid Sub5 wurde ebenfalls im Zusammenhang mit dem Wachstum von *A. nidulans* getestet (Mania *et al.* 2010). Bei *A. nidulans* konnte ein Wachstum bis zu einer Konzentration von 0,8 µg/ml beobachtet werden, was mit der Hemmkonzentration von getesteten Bakterien übereinstimmt. *F. oxysporum* hingegen, kann bis zur Zugabe von 6,3 µg/ml Sub5 im planktonischen Zustand wachsen. Im Biofilm findet jedoch auch bei der niedrigsten Konzentration von 1,6 µg/ml Sub5 kein Wachstum statt. Möglicherweise ist auch hier Sub5 der Grund, dass die Sporen nicht an der Oberfläche anheften können und somit beim Waschen des „Biofilms“ von der Oberfläche abgespült werden.

Das Wachstum im Biofilm bietet Mikroorganismen Schutz vor pH-Extremen, toxischen Metallionen durch deren Bindung an die EPS, Bioziden und Antibiotika sowie Immunabwehrmechanismen des Wirtsorganismus bei Infektionen (Flemming & Wingender, 2001). Mikroorganismen sind im Biofilm signifikant besser gegen Biozide geschützt, als im freien Wachstum. Dies wurde lange Zeit damit erklärt, dass die Biozidmoleküle die Biofilmmatrix nur schlecht durchdringen können, weil hier ein bedeutend größerer Diffusionswiderstand herrscht (Flemming & Wingender, 2001). Jedoch gibt es auch einen gewissen konvektiven Anteil am Stofftransport, weshalb nicht allein der Diffusionswiderstand für den Schutz verantwortlich ist (Lewandowski *et al.* 1994).

Die Sensitivität beziehungsweise Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde ebenfalls getestet (siehe Abbildung 47). Die Mutanten sind, ebenso wie der Wildtyp, alle resistent gegenüber Glucanex, Amphotericin B und Benomyl. Bei Calcofluor White hingegen sind die $\Delta pacC$ und $\Delta fso1$ Stämme sensitiver als der Wildtyp. Die $\Delta fhk1$, $\Delta fmk1$, $\Delta msb2$ und $\Delta ste12$ Mutanten sind resistenter gegenüber dem antimikrobiellen Peptid Sub5. Sie können im Vergleich zum Wildtyp noch bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml wachsen.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine *fhk1* Deletionsmutante resistenter gegenüber verschiedenen Fungiziden als der Wildtyp ist (Rispaill & Di Pietro, 2010), was mit dem Ergebnis aus dieser Arbeit übereinstimmt, da die Mutante bei der getesteten

Substanz resistenter als der Wildtyp ist. Wie im vorherigen Absatz bereits beschrieben zeigt die *msb2* Mutante in *C. albicans* eine veränderte Sensitivität gegenüber verschiedenen Substanzen, was vermuten lässt, dass dieses Protein in die Zellwand-Biosynthese involviert ist (Román *et al.* 2009). Diese Tatsache spricht für das Ergebnis der größeren Resistenz gegenüber Sub5 in *F. oxysporum*. Von den anderen Mutanten ist noch nichts über die Veränderung der Resistenz beschrieben.

Es wurden viele verschiedene Pilze und Bakterien in den untersuchten Biofilmen gefunden, darunter auch typische Biofilmorganismen anhand derer man das Wachstum im Biofilm untersuchen und verstehen kann. *F. oxysporum* eignet sich gut, um das Biofilmwachstum von filamentösen Pilzen näher zu untersuchen und auf Genomebene zu verstehen. Es wurde gezeigt, dass die Genexpression im Biofilm anders als im planktonischen Wachstum verläuft, da die Pilze sich an die veränderte Lebenssituation anpassen. Es sind viele verschiedene Gene in das Biofilmwachstum involviert, was das veränderte Biofilmwachstum der getesteten Mutanten zeigt.

Es sind noch viele Untersuchungen nötig, um das Biofilmwachstum zu untersuchen, dies war nur ein kleiner Teil, um mehr über das Vorhandensein und die Veränderungen von Pilzen in Biofilmen zu erfahren.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Serva (Heidelberg). Restriktionsenzyme und DNA- Marker stammten von New England Biolabs (Frankfurt).

5.2 Verwendete Stämme

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Stämmen von *Fusarium oxysporum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* und *Aspergillus nidulans* gearbeitet (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Verwendete Stämme, deren Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Fusarium oxysporum</i>		
4287	Wildtyp 4287	Fungal Genetics Stock Center, Kansas City
SJZ03	4287 transformiert mit pNRPK2GFP1 <i>gpd(p)::gfp::stuA</i> ; <i>gpd(p)::hph::trp(t)</i>	Diese Arbeit
SJZ04	Δ fso1 transformiert mit pNRPK2GFP1 und pAK10	Diese Arbeit
SJZ05	Δ pacC transformiert mit pNRPK2GFP1 und pAK10	Diese Arbeit
SJZ06	Δ fmk1 transformiert mit pNRPK2GFP1	Diese Arbeit
SJZ07	Δ fhk1 transformiert mit pNRPK2GFP1 und pAK10	Diese Arbeit

SJZ08	Δ msb2 transformiert mit pNRPK2GFP1 und pAK10	Diese Arbeit
SJZ09	Δ ste12 transformiert mit pNRPK2GFP1 und pAK10	Diese Arbeit
Δ fhk1	Δ fhk1::hyg	Rispail <i>et al.</i> 2010
Δ pacC	Δ pacC::hyg	Carcuel <i>et al.</i> 2003
Δ fmk1	Δ fmk1::nptII	Di Pietro <i>et al.</i> 2004
Δ ste12	Δ ste1::hyg	Rispail <i>et al.</i> 2009
Δ msb2	Δ msb2::hyg	Péret-Nadales <i>et al.</i> 2011
Δ fso1	Δ fso1::hyg	Di Pietro <i>et al.</i>

Escherichia coli

TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7679, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
-------	---	-----------------------

Pseudomonas putida

DSM 7152	Wildtyp	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
----------	---------	---

Aspergillus nidulans

SKV19	<i>yA2</i> ; <i>pyro A4</i> ; <i>veA1</i>	Kay Vienken
SKV20	<i>PabaA1</i> , <i>yA2</i> , <i>veA1</i>	Kay Vienken
SJZ01	SKV19 gekreuzt mit SKV20 <i>yA2</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SJZ02	FGSCA4 transformiert mit pJH	diese Arbeit

	19 (<i>gpd(p)::dsredT4::stuA</i> ; <i>argB</i>); <i>veA1</i>	
FGSCA4	Glasgow Wildtyp, <i>veA+</i>	Fungal Genetics Stock Center, Kansas City

5.3 Kultivierung der Organismen

Die *A. nidulans*- und *E. coli*-Kulturen wurden aerob bei 37° C inkubiert. *F. oxysporum* wurde aerob bei 28°C inkubiert. Flüssigkulturen von *A. nidulans* und *E. coli* wurden in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren bei 180 rpm gezüchtet und von *F. oxysporum* bei 150 rpm. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen.

Hitzeempfindliche Lösungen, wie Antibiotika, Aminosäuren und die Kitalase wurden sterilfiltriert.

Tabelle 13: Medien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Luria Bertani (LB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,5
SOC	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,58 g NaCl 0,185 g KCl 2,03 g MgCl ₂ x 7 H ₂ O 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 3,6 g Glukose pH 7,0

Tabelle 14: Antibiotika für *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg /ml
Kanamycin	50 µg/ml

Tabelle 15: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung 20 g Glucose 2 g Pepton 1 g Hefeextrakt 1 ml Vitaminlösung 1 ml Spurenelementlösung mit 10 M NaOH auf pH ~6.5
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung 1 ml Spurenelementlösung 2 % Glucose, Glycerin, Threonin oder Ethanol mit 10 M NaOH auf pH 6.5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0.6 M KCl supplementiert

Lösung	Zusammensetzung pro Liter
Salzstammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ 10,4 g KCl 10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000-fach)	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O 11 g H ₃ BO ₃

	5 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
	5 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	1,6 g $\text{CoCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$
	1,6 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
	1,1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$
	mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8
Spurenelementlösung <i>F. oxysporum</i>	1 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	0,15 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
	1,61 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	0,1 g $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	0,1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mn}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$
Vitaminlösung (1000-fach)	0,1 g D-Biotin
	0,1 g Pyridoxin-HCl
	0,1 g Thiamin-HCl
	0,1 g Riboflavin
	0,1 g p-Aminobenzoessäure
	0,1 g Niacinsäure

Tabelle 16: Medien für *F. oxysporum*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung
	20 g Glucose
	2 g Pepton
	1 g Hefeextrakt
	1 ml Vitaminlösung
	1 ml Spurenelementlösung
	mit 10 M NaOH auf pH ~6.5

Darken-Vorkultur (DVK) nach Darken <i>et al.</i> 1959	15 g Corn Steep 30 g Saccharose 1 g NH ₄ SO ₄ 7 g CaCO ₃
10% ICI-Medium	10 g Fructose 0,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g KH ₂ PO ₄ 1 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 2 ml Spurenelementlösung
Regenerationsmedium	239,4 g Saccharose 0,5 g Hefeextrakt

Tabelle 17: Antibiotika für *F. oxysporum*

Antibiotika	Endkonzentration pro Liter
HygromycinB	100 mg/l
Geneticin	180 mg/l

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 18: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCR2.1	Klonierungsvektor mit 3' T Überhängen zur Klonierung von <i>taq</i> -amplifizierten PCR-Produkten, Bestandteil des TOPO TA Cloning Kits	Invitrogen, Karlsruhe
pJet1.2/blunt Cloning Vector	Klonierungsvektor, Bestandteil des CloneJET PCR Cloning Kits	Fermentas, St. Leon-Rot
pJH19	<i>gpd(p)::dsredT4::stuA; argB</i>	H. Wei, Marburg

pNRPK2GFP1	<i>gpd(p)::gfp::stuA;</i> <i>gpd(p)::hph::trp(t)</i> , Kanamycin- Resistenz	Requena <i>et al.</i>
pJP23	Expression von Genen mittels <i>gpd(p)</i> ; Fusion N-terminal mit <i>gfp</i> beim Einklonieren in die MCS, AmpR, <i>pyr4</i>	Janina Purschwitz
pAK10	pJet1.2 mit Geneticin- Resistenzkassette	Kristin Seither
pSS6	pCR2.1 mit Hygromycin- Resistenzkassette	Sonja Sand
pJZ01	FOX2222- Deletionskonstrukt Geneticin- Kassette umgeben von 1 kb der 5'-UTR und 1 kb der 3'-UTR von FOX2222 hergestellt durch Fusion-PCR in pJET	diese Arbeit
pJZ02	FOX1684- Deletionskonstrukt Geneticin- Kassette umgeben von 1 kb der 5'-UTR und 1 kb der 3'-UTR von FOX1684 hergestellt durch Fusion-PCR in pJET	diese Arbeit

5.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5.4.2.1 Plasmid-Minipräparation

Tabelle 19: Lösungen zur Plasmid-Minipräparation aus *E.coli*

Lösungen	Zusammensetzung
Zellsuspensionspuffer (100 ml)	5 ml Tris-HCl 1 M, pH 7,5 2 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0 10 mg RNase
Lysepuffer (100ml)	20 ml NaOH 1 M 10 ml SDS 10%
1,5 M KAc	1,5 M KAc pH 4,8

Für die Plasmid-Minipräparation wurde eine Übernachtskultur des *E. coli*- Stammes in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika hergestellt und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach ca. 16 h Wachstum wurden 1,5 ml *E. coli*-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt, drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Zellsuspensionspuffer. Nach Resuspension des Pellets wurden 200 µl Lysepuffer zugegeben, die Proben invertiert und mit 200 µl KAc versetzt. Anschließend wurde zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 600 µl Isopropanol pipettiert und das Eppendorfgefäß invertiert. Nun wurde für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei 68°C wurde das Pellet in 50 µl ddH₂O bei 68°C gelöst.

5.4.2.2 Plasmid-Midipräparation

Die Midipräparation des Plasmids wurde mit dem Nucleobond AX100 Kit von Macherey-Nagel, Düren, durchgeführt.

Dazu wurde bis zum Elutions-Schritt nach dem Protokoll gearbeitet. Das Eluat wurde in sechs 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend 600 µl Isopropanol zugegeben. Diese Flüssigkeit wurde mehrmals durch Invertieren gemischt und schließlich für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200

µl 70%igem EtOH gewaschen und für 10 min bei 68°C getrocknet. Jedes Pellet wurde in 20 µl ddH₂O für 10 min bei 68°C gelöst.

5.4.3 Isolierung genomischer DNA aus *F. oxysporum*

Tabelle 20: Lösungen zur Isolierung genomischer DNA

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
8M KAc	29,45 g Kalium-Acetat in 60 ml ddH ₂ O lösen, Zugabe von 11,5 ml EssigsäurepH mit HCl konz. auf 4,2 einstellen auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen

Um genomische DNA aus *F. oxysporum* zu isolieren, wurde mit einer Impföse Pilzmyzel von einer Agarplatte abgekratzt und zusammen mit 1 ml Extraktionspuffer und drei Metallkügelchen 3 min lang kräftig gevortext. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß für 10 min bei -80°C inkubiert und schließlich 1,5 h bei 68 °C inkubiert. Dazwischen wurde alle zehn Minuten kräftig gevortext.

Danach wurde 10 min bei 14600 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl Kaliumacetat versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde erneut 10 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 100% Isopropanol versetzt. Die DNA wurde 10 min auf Eis gefällt. Danach wurde 10 min bei 14600 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 68°C getrocknet und in 50 µl ddH₂O gelöst.

5.4.4 Restriktion von DNA

Analytische Restriktionsverdauere wurden im Allgemeinen in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0,3 µl Enzymlösung. Die jeweilige Zusammensetzung und Reaktionstemperatur entsprach den Empfehlungen der Hersteller. Der Ansatz wurde in der Regel eine Stunde, bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen eineinhalb bis zwei Stunden lang verdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

5.4.5 Gelelektrophorese, Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden je nach Größe auf 1-2%ige Agarosegele aufgetragen und in 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Als Größenvergleich diente der 1 kb bzw. 100 bp DNA Marker (NEB). Anschließend wurden die Gele im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Wenn benötigt, wurden DNA-Banden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research).

5.4.6 Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE)

Um die pilzliche und bakterielle Population auf Glasoberflächen in verschiedenen Habitaten zu untersuchen, wurde zuerst die DNA mit dem innuSPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Jena) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 95°C für 30 Minuten, anschließend wurden die Zellen für acht Minuten auf der maximalen Stufe im Homogenisator aufgeschlossen. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mit dem NanoDrop ND-100 Spektral Photometer (PeqLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

Mit der isolierten DNA als Template wurde eine PCR mit dem Primerpaar ITS 1/ITS 4 (White *et al.* 1990) (siehe Tabelle 21) ohne GC-Clamp durchgeführt. Dieses Amplifikat wurde dann in eine zweite PCR eingesetzt, bei der ein Primer eine 40 bp langen GC-Schwanz hat (Muyzer *et al.* 1993). Hierfür wurden das Primerpaar ITS 5-GC und ITS 4 verwendet. Dieses PCR-Produkt wurde dann auf einem DGGE-Gel analysiert. Die DGGE-Analyse der PCR Produkte wurde mit einem D-Code System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit denaturierenden Polyacrylamidgelen mit einem Harnstoffgradienten von 40-70% durchgeführt. 15-25 µl der PCR-Produkte wurden mit 6x Loading Dye auf das Gel aufgetragen. Die Gele liefen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,5) bei 56 °C und 70 V für 16 Stunden. Zur Visualisierung der Bandenmuster, die sich durch die sequenzspezifische Auftrennung der PCR-Produkte ausgebildet haben, wurden die Gele mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR® Gold (0,001%; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Die gefärbten Gele wurden bei 520 nm mit einer Lumilmager Working Station (LumilmagerT1™, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ausgewertet. Die DGGE Fingerabdrücke wurden manuell ausgezählt bezüglich der An- oder Abwesenheit von Banden, unabhängig von deren Intensität.

Die Anzahl der Banden entspricht (in etwa) der Anzahl der pilzlichen und bakteriellen Spezies in der untersuchten Probe.

Die DGGE Fingerabdrücke wurden manuell ausgezählt bezüglich der An- oder Abwesenheit von Banden, unabhängig von deren Intensität. Die Anzahl der Banden entspricht (in etwa) der Anzahl der pilzlichen und bakteriellen Spezies in der untersuchten Probe. Populationsähnlichkeiten wurden paarweise mit dem Dice Koeffizienten berechnet.

Dice Koeffizient: $C_s = 2j/(x + y)$

j = Anzahl der gemeinsamen Banden in Probe X und Y

x = Anzahl der Banden in Probe X

y = Anzahl der Banden in Probe Y

Ein C_s Wert von 0 bedeutet keine Ähnlichkeit zwischen den Proben und ein C_s Wert von 1 steht für 100%ige Übereinstimmung (Murray *et al.* 1996).

5.4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR); Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Programme wurden der zu amplifizierenden Fragmentlänge und der berechneten Annealingtemperatur der Primer angepasst. Denaturiert wurde bei 94 °C bei Verwendung der *taq*-Polymerase, 98 °C bei Verwendung der Phusion-Polymerase und 94°C bei Verwendung der Pfu-Polymerase. Die Elongation erfolgte bei 72 °C.

Wurden Sonden für einen Southern Blot hergestellt, wurde dem PCR-Ansatz 1 µl PCR DIG Probe Synthesis Mix aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) zugefügt.

PCR-Produkte wurden mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit (AnalytikJena) aufgereinigt, Banden mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo).

Tabelle 21: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') Restriktionsschnittstellen und Linker sind unterstrichen
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5-GC	<u>cgcccgccgcgcgcgcggcgggcggggcgggggcacgg</u> GGAAGTAAAAGT CGTAACAAGG
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
M13	CAGGAAACAGCTATGACC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pJet 1.2 fwd	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJet 1.2 rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
517R	ATTACCGCGGCTGCTGG
gpd fwd_NotI	GCATCG <u>gcgccgc</u> GATCTTTCGACACTGAAATACG
gpd rev_PacI	CTAGT <u>ttaattaa</u> GGTGATGTCTGCTCA AGC
dsRed fwd_PacI	CTAGC <u>ttaattaa</u> ATGGCCTCCTCCGAGGA
stuA rev_BglII	GCTGCA <u>agatct</u> TCATTGCTTCAGCCCAAGAG
gpd fwd_NarI	GCA <u>ggcgcc</u> GGCCATCTAGGCCGATCTTTCGAC
trp rev_NarI	ACGggcgccTCGAGTGGAGATGTGGAGTGGGC

Tabelle 22: Verwendete Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
BTubFox187RT fwd	CGA GCG CAT GAG TGT CTA CTT C
BTubFox187RT rev	TGG TAC CAG GCT CAA GAT CGA
FOX01684 RT fwd	TCT GCT CGC CGA AGA CAA CAC C
FOX01684 RT rev	AGC TTC CCA GCC GTT ACC AAC C

FOX02222 RT fwd	CCA GCC TCC TAT CAA CAA TGC CCG
FOX02222 RT rev	GCT GCC GAA GAA GTC GTC AAC C
FOX06549 RT fwd	GCC CTA CGG ACT TGA AGA CTG GAC
FOX06549 RT rev	GCC ATC AAC GAA CCA ACG CTC TC
FOX09279 RT fwd	CAG CAG GTT CTG GCT CGC ATA AG
FOX09279 RT rev	AAC CCA TCC AAT GCC ATC TGC AAC
FOX11003 RT fwd	GAT CCA CCA CAT GAG CGC CAA G
FOX11003 RT rev	CGT CGC ACA AGC AAC AGC ATC C

5.4.8 Colony-PCR

Zur Überprüfung der Transformation in *E.coli* und für die Erstellung einer Klonbibliothek wurde eine Colony-PCR durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 5-10 genannten Primer M13 und T7 für den TOPO- Vektor beziehungsweise pJet 1.2 fwd und rev für den pJet Vektor verwendet. Für die PCR wurde mit dem Zahnstocher eine Kolonie von der Platte gepickt und direkt als Template in der PCR eingesetzt.

5.4.9 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und möglichst frisch kloniert. Dazu wurde das TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) oder das CloneJET PCR Cloning Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) benutzt und nach beiliegenden Angaben verfahren. Der Vektor war pCR2.1 beziehungsweise pJet 1.2.

War das PCR-Produkt nicht mehr frisch oder wurde eingefroren, wurde es vor der Klonierung ca. 10 min mit 1 U taq und 0,5 µl PCR-Puffer bei 72 °C inkubiert.

5.4.10 Herstellung von Deletionskonstrukten

Zur Herstellung von Konstrukten für die Deletion von Genen wurde die Fusion-PCR Methode verwendet (Szewczyk *et al.* 2006). Bei dieser Methode werden mittels PCR zuerst drei Fragmente amplifiziert. Für die Herstellung von Konstrukten für die Deletion eines Gens wurden die Markerkassette, sowie je ein Fragment mit einer Länge von etwa 1 kb der 5'-UTR-Region (LB) und der 3'-UTR-Region (RB) des Gens amplifiziert. Durch Verwendung von Primern, welche zueinander komplementäre

Sequenzen besitzen, werden diese Linker (GA5) an die hergestellte LB-, RB-Region und die Markerkassette angehängt (siehe Abbildung 50). In einer zweiten PCR, der eigentlichen Fusion-PCR, werden die drei hergestellten Fragmente miteinander verbunden. Das hergestellte Fusion-PCR-Konstrukt wurde in den pJET-Vektor zwischenkloniert.

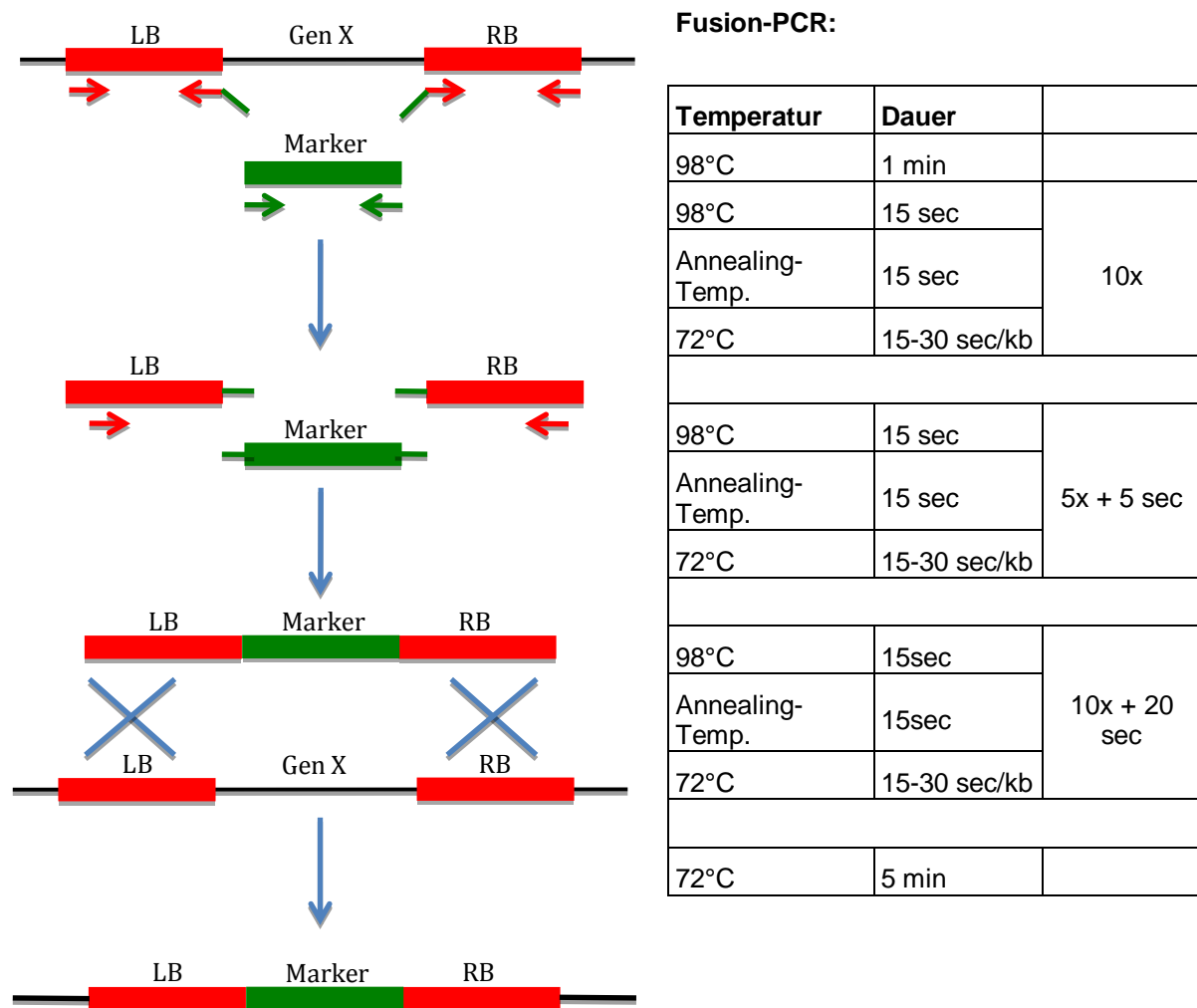


Abbildung 50: Schematische Darstellung für die Herstellung von Fusionsprodukten mittels PCR für die Deletion. Durch eine PCR mit Primern, welche einen Linker besitzen, auf die Markerkassette und die 5'-UTR oder 3'-UTR des zu deletierenden Gens, werden Fusion-Konstrukte für eine Transformation in *F. oxysporum* hergestellt.

5.4.11 Transformation von *E. coli*

TOP10- Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend das Ligationsprodukt zupipettiert. Nach 30 min auf Eis folgte ein 90 sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß noch mal eine Minute auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 400 µl SOC-Medium. Dann wurden die Bakterien eine Stunde lang bei 37 °C schüttelnd inkubiert und auf LB-Platten mit entsprechendem

Antibiotikum ausplattiert.

5.4.12 Protoplastentransformation von *F. oxysporum*

Tabelle 23: Lösungen für die *Fusarium*-Transformation:

Lösung	Zusammensetzung
KCl/CaCl ₂	50 mM KCl
	50 mM CaCl ₂
CaCl ₂	1 M CaCl ₂
50% PEG 8000	20,9 ml PEG 8000 (60%)
	0,25 ml Tris pH 7,5
	1,25 ml 1 M CaCl ₂
	2,7 ml ddH ₂ O
1x STC	24 ml 2 M Sorbitol
	0,4 ml Tris pH 7,5
	2,0 ml 1 M CaCl ₂
	13,6 ml ddH ₂ O
2x STC	10 ml 3 M Sorbitol
	0,25 ml Tris pH 7,5
	1,25 ml 1 M CaCl ₂
	1 ml ddH ₂ O

Aus einer bewachsenen Agarplatte wurden 3 Agarblöckchen ausgestochen und in 100 ml DVK-Medium bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Drei Tage später wurden aus der Vorkultur 1 ml in 100 ml 10% ICI-Medium überimpft und ca. 20 Stunden bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde über sterilem Miracloth filtriert und das Myzel zuerst mit ddH₂O und schließlich mit KCl/CaCl₂-Puffer gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Zum Verdauen der Zellwände wurden 20 mg Kitalase (Wako Chemicals GmbH, Neuss) oder 500 mg Glucanex in 10 ml KCl/CaCl₂-Puffer gelöst, sterilfiltriert und zusammen mit dem Myzel in einem sterilen 100 ml-Erlenmeyerkolben für zwei bis drei Stunden bei 28°C und 80 rpm inkubiert.

Qualität und Quantität der entstandenen Protoplasten wurden mikroskopisch überprüft. Die Protoplastensuspension wurde durch zwei Lagen steriles Miracloth filtriert, mit KCl/CaCl₂-Puffer gewaschen und in einem 50 ml-Falcon aufgefangen. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C für 10 Minuten, danach wurde das Pellet nochmals mit KCl/CaCl₂-Puffer auf dieselbe Weise gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Protoplasten-Pellet in je 50 µl 1x STC pro Ansatz vorsichtig resuspendiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Protoplastenlösung verwendet. Der Ansatz wurde in ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 4 bis 5 µg Plasmid-DNA bzw. lineares Fusionkonstrukt (in 50 µl ddH₂O gelöst), 50 µl 50%ige PEG-Lösung und 50 µl 2x STC zu den Protoplasten gegeben, vorsichtig gemischt und 25 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte eine Zugabe von 1,6 ml 50%iger PEG-Lösung in einem 15 ml Reaktionsgefäß. Die Probe wurde durch leichtes Schwenken homogenisiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3,2 ml 1x STC gestoppt.

Das gesamte Volumen der Reaktion wurde in 100 ml Regenerations-Medium mit Agar gegeben und auf 5 Petrischalen ausgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 28°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Platten mit Regenerationsmedium mit entweder 100 µg/ml HygromycinB (Roth) und/oder 180 µg/ml Geneticin (Roth) als Selektionsmarker überschichtet. Die Platten wurden bei 28°C für drei bis fünf Tage inkubiert.

5.4.13 Protoplastentransformation von *A. nidulans*

Die zur Herstellung von Protoplasten verwendeten Medien sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Lösungen für die *Aspergillus*-Transformation

Lösung	Zusammensetzung
Myzel-Waschlösung	0,6 M MgSO ₄
Osmotisches Medium	1,2 M MgSO ₄ 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 5.8
Trapping Puffer	0,6 M Sorbitol 0,1 M Tris-HCl pH 7.0
STC-Puffer	1,2 M Sorbitol

	10 mM CaCl ₂
	10 mM Tris-HCl pH 7,5
PEG-Lösung	60% Polyethylenglykol 4000
	10 mM CaCl ₂
	10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Für die Transformation von *A. nidulans* wurden 500 ml Minimalmedium (plus Wachstumsfaktoren) mit Konidiosporensuspension beimpft und bei 30° C, 180 rpm für etwa 12 h auf dem Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde durch steriles Miracloth abfiltriert und mit Myzel-Waschlösung gespült, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Das Myzel (1 g) wurde dann in 5 ml Osmotischem Medium resuspendiert. Zum Abbau der Zellwände wurde 1 ml Glucanex (140 mg/ml) zum Myzel gegeben, 5 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 0,5 ml BSA-Lösung (12 mg/ml) erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 30° C und 60 rpm auf dem Schüttler. Durch mikroskopische Kontrolle wurde die Bildung von Protoplasten überprüft. Die Protoplasten-Suspension wurde dann in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und mit 10 ml Trapping-Puffer langsam überschichtet. Die Protoplasten wurden danach durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 5.000 rpm vom restlichen Myzel getrennt. Die an der Phasengrenze gebildete Protoplastenbande wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, in ein 30 ml Corex-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Zur Protoplastensuspension wurden 10 ml STC-Lösung zugegeben und anschließend bei 7.000 rpm, 4° C für 8 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und das gewaschene Zentrifugat vorsichtig in 200 µl STC resuspendiert. Mit einer Helber-Zählkammer wurde die Anzahl der Protoplasten bestimmt und die Suspension auf 10⁶ /100 µl eingestellt.

Zur Transformation wurden 100 µl der Protoplasten-Suspension (10⁶ Protoplasten) mit 100 µl DNA-Lösung (1 x Selektions-Plasmid und 3 x Plasmid-DNA mit STC auf das Volumen eingestellt) in einem Falcon-Röhrchen gemischt und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PEG-Lösung zugegeben und das Falcon-Röhrchen bis zur Homogenisierung der Lösung gerollt. Der Transformationsansatz wurde dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, nachfolgend wurden 8 ml STC-Lösung zugegeben und durch Rollen eine Durchmischung erreicht. Diese Protoplastensuspension wurde auf Minimalmedium-

Platten (mit 44,4 g/L KCl und 0,01% Pyriithiamin-Hydrobromid zur Selektion) ausplattiert und für drei Tage bei 30° C inkubiert.

5.4.14 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Tabelle 25: Lösungen für die DNA-DNA-Hybridisierung.

Lösung	Zusammensetzung
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat pH 7,0
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
10 x Blockinglösung	10% (w/v) Blocking Reagenz (Roche) In Maleinsäure-Puffer
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M TrisHCl, pH 7,5 1,5 M NaCl pH 7,5
DIG Standard HYB Puffer	5 x SSC 0,02% (w/v) SDS 0,1% (w/v) N-Laurylsarcoson 1% Blocking Solution frisch dazu geben
2 x Waschlösung	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS
0,5 x Waschlösung	0,5 x SSC 0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer	100 mM Maleinsäurepuffer 0,3% Tween20
Blockingpuffer	1% Blockinglösung in Maleinsäurepuffer
AP-Puffer	0,1 M TrisHCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂

Die Southern Blot-Analysen wurden mit DIG-markierten Sonden durchgeführt, die mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers generiert wurden. Die über Nacht mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaute genomische DNA wurde in einem 1%igen Agarosegel bei 100 V ein bis zwei Stunden aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 20 Minuten in 250 mM HCl geschwenkt und durch zweimalige Inkubation für je 15 Minuten in Denaturierungspuffer denaturiert. Nach kurzem Spülen mit ddH₂O wurde das Gel 2 x 15 Minuten in Neutralisierungspuffer schwenkend inkubiert und anschließend zehn Minuten in 20 x SSC für das Blotting äquilibriert.

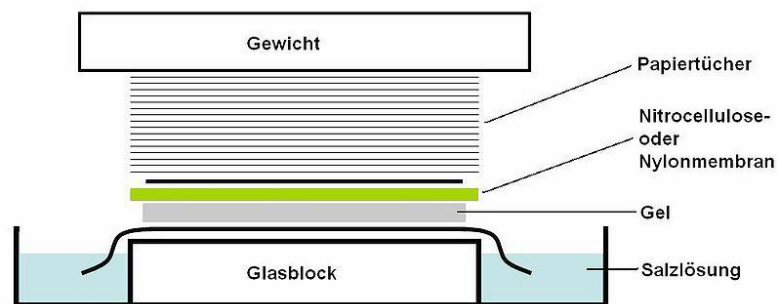


Abbildung 51: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern-Blots.(Quelle: www.commonswikimedia.org)

Hierbei wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche) für drei Stunden bei Raumtemperatur transferiert. Dazu wurde ein Upward-Transfer auf einer Brücke von in 20 x SSC angefeuchtetem Whatman Papier, mit Kontakt zu einem mit 20 x SSC gefülltem Reservoir, in der folgenden Reihenfolge aufgebaut: Gel mit der Oberseite nach unten weisend, angefeuchtete Nylon-Membran, 3 Lagen trockenes Whatman Papier, mehrere Lagen saugfähiges Papier, leichtes Gewicht zur Fixierung. Nach Beenden des Blottings wurde der Marker auf der Membran markiert

und die DNA auf der Nylon-Membran durch UV-Crosslinking (254 nm, 1.200 x 102 µJ pro Seite) fixiert. Durch die anschließende mindestens einstündige Prähybridisierung mit DIG-Standard-Hybridisierungspuffer (1 % Blocking Reagenz der Firma Roche frisch dazu geben) bei 68°C im Hybridisierungssofen wurde die Membran für die nachfolgende Inkubation mit der DNA-Sonde vorbereitet. Für die Sonde wurden 10 µl des DIG-markierten aufgereinigten PCR-Produktes durch fünfminütiges Kochen denaturiert und anschließend zu 50 ml DIG-Standard-Hybridisierungspuffer gegeben, der auf 68°C vorgewärmt war. Die prähybridisierte Membran wurde zusammen mit der Sonde über Nacht bei 68°C inkubiert. Für die Detektion wurde die Membran 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 x Waschlösung und 2 x 15 Minuten bei 68°C mit 0,5 x Waschlösung gespült. Nach einer Behandlung für 5 Minuten mit Waschpuffer wurde die Membran für mindestens 1 Stunde in Blockingpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem α-DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Roche, Mannheim) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Überschüssige, nicht-gebundene Antikörper wurde durch 2 x 15 Minuten waschen mit Waschpuffer entfernt. Nach kurzer Äquilibrierung mit AP-Puffer wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und auf die Oberseite 500 µl Farbreagenz aufgetragen (CDP-Star der Firma Roche 1:100 in AP-Puffer). Nach fünf Minuten wurde die Membran zwischen zwei frische Plastikfolien transferiert und die Chemilumineszenz mit dem ChemiCapt-Detektor (PeproLab, Erlangen) nachgewiesen.

5.4.15 Isolierung von RNA aus *F. oxysporum*

Die Ernte des Myzels erfolgte aus einer statischen 10% ICI-Flüssigkultur oder aus einem Biofilm, der zuvor mit *F. oxysporum* Sporen beimpft wurde. Das Myzel aus der Flüssigkultur wurde zwischen Miracloth und Papiertüchern trockengepresst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht lyophilisiert, um es anschließend mit einem Zahnstocher zu zerstoßen. Das Material aus dem Biofilm wurde direkt in ein Reaktionsgefäß überführt. Das pulverisierte Myzel wurde in 1 ml TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und durch Vortexen gut durchmischt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für zehn Minuten bei 4°C und 11600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reagenzgefäß überführt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl Chloroform dazugegeben, 15 Sekunden gevortext und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 11600 rpm. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 200 µl Phenol-Chloroform-

Isomylalkohol (25:24:1) zugegeben, kräftigt gevortext und wieder zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol für 20 Minuten die RNA gefällt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4°C und 11600 rpm. Das entstandene Pellet wurde in 70% DEPC-Ethanol gewaschen, für fünf Minuten bei 4°C und 9000 rpm zentrifugiert und schließlich luftgetrocknet. Die RNA wurde in 30 µl DEPC-ddH₂O aufgenommen und 0,5 µl RNase OUT (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und anschließend für 15 Minuten bei 68°C gelöst. Anschließend wurde noch ein DNase Verdau (Ambion, DNase Turbo Kit, Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

Konzentration und Reinheit der RNA wurden mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) gemessen und die Proben anschließend bei -80°C gelagert.

5.4.16 Quantitative *Real Time* PCR

Für jede Bedingung wurde RNA aus drei unabhängigen biologischen Replikaten und aus diesen wiederum zwei technische Replikate eingesetzt. Als Kontrollgen diente das zu *A. nidulans* homologe Gen für Tubulin *tubB*. Die RNA-Konzentration wurde mit DEPC-H₂O auf 50 ng/µl eingestellt. Die verwendeten Primer wurden ebenfalls mit DEPC-H₂O auf eine 5 µM Konzentration verdünnt und die Primer paarweise vereinigt. Pro Reaktion wurden 2 µl des Primer-Mix, 3,4 µl Nuklease-freies Wasser (Bioline), 10 µl 2x SensiFAST SYBR & Fluorescein One-Step Mix (Bioline), 0,2 µl Reverse Transkriptase (Bioline), 0,4 µl RiboSafe RNase Inhibitor (Bioline) und 4 µl RNA der 50 ng/µl-Verdünnung eingesetzt. Die Reaktionen im BioRad iCycler iQ waren wie folgt: 10 Minuten Reverse Transkription bei 45°C, 2 Minuten Polymerase-Inaktivierung bei 95°C, 40 Zyklen mit je 5 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 20 Sekunden Annealing/Extension bei 60°C. Für die Dissoziationskurven wurde 1 Minute bei 95°C und 1 Minute bei 55°C angewandt, für die Schmelzkurven 80 Zyklen mit je 10 Sekunden bei 55°C, wobei pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C gesenkt wurde.

Für die Analyse der Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet.

5.5 Biofilme und Abwasser

5.5.1 Native Biofilme – Nährstoffreich

Die verwendeten nativen Biofilme stammen aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Es wurden Biofilme aus zwei verschiedenen Bereichen verwendet. Ein Biofilm wurde direkt nach dem Feinrechen an der Wand des Beckens abgenommen, der Andere stammt von der Beckenwand nach dem biologischen Reinigungsverfahren. In Abbildung 52 sind die Stellen der Probenahme gezeigt. Das verwendete Abwasser stammt vom Zulauf, also mechanisch gereinigtes Abwasser direkt aus der Kanalisation, und Ablauf, das schon gereinigte Wasser, das direkt in den Fluss eingeleitet wird. Des Weiteren wurden Glasobjektträger direkt im Habitat für drei Monate ausgebracht.

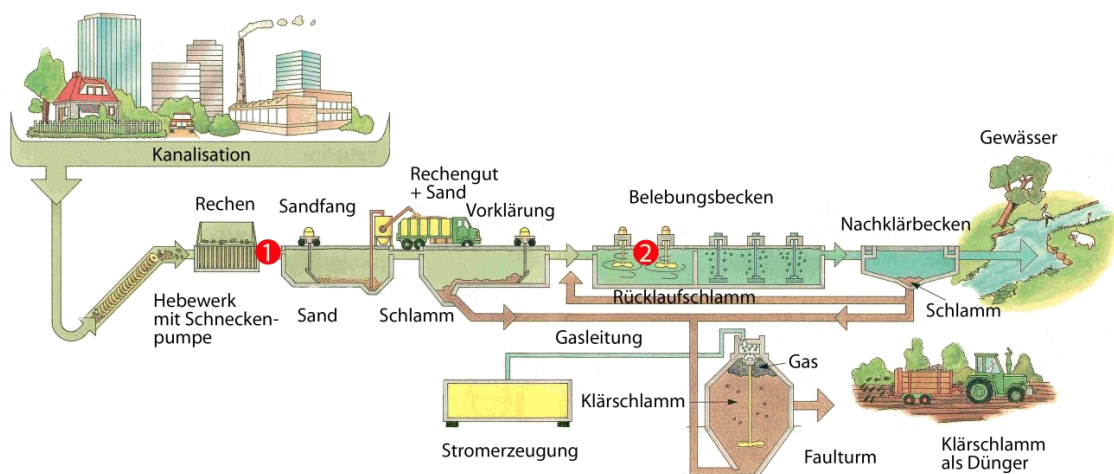


Abbildung 52: Probenahmestellen in der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Probenahmestelle 1 befindet sich direkt hinter dem Rechen, am Anfang der Reinigung. Probenahmestelle 2 befindet sich in der biologischen Reinigungsstufe. (Quelle: Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.)

5.5.2 Native Biofilme – Nährstoffarm

Es wurden auch Biofilme von eher Nährstoffarmen Habitaten, Alb, Baggersee bei Eggenstein-Leopoldshafen und der Pfinz verwendet. Es wurden vorhandene Biofilme steril abgekratzt oder Glasobjektträger für drei Monate an den entsprechenden Stellen ausgebracht.

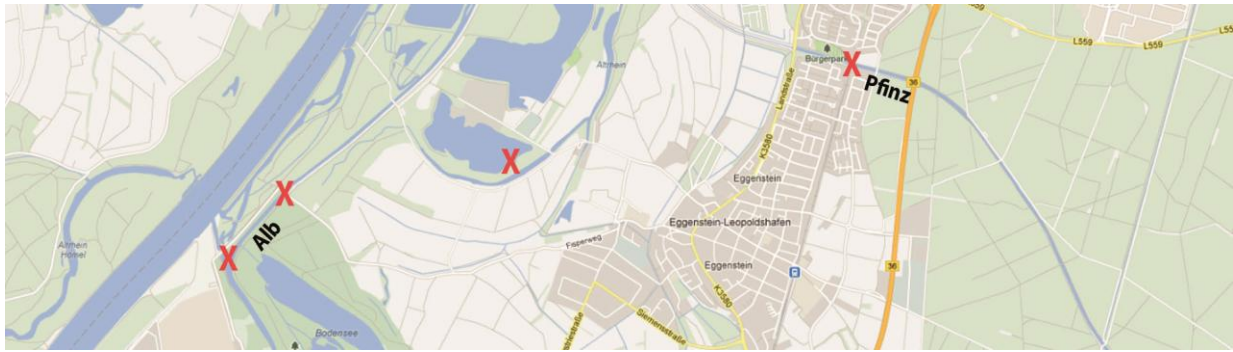


Abbildung 53: Probenahmestelle von nährstoffarmen Habitaten. Es wurden Proben an der Alb, im Baggersee bei Eggenstein-Leopoldshafen und aus der Pfinz entnommen. Zusätzlich wurden Glasobjektträger für drei Monate in den jeweiligen Habitaten ausgebracht. (Quelle: maps.google.de, abgerufen am 03.03.2013)

5.5.3 Biofilmmzuchtung

Um Biofilme von *Fusarium oxysporum* und *Aspergillus nidulans* alleine anzuziehen, wurden Glasboxen mit Halterungen für Glasobjektträger verwendet. Dazu wurde mit CM oder synthetischem Abwasser inkubiert und mit $\sim 10^7$ Sporen angeimpft. *F. oxysporum* wurde bei 28°C und *A. nidulans* bei 37°C inkubiert. Um sicherzustellen, dass auch nur die Biofilmorganismen analysiert werden, wurden die Objektträger noch mit 0,85% NaCl zweimal gewaschen. Wurden Biofilme mit Inokulum angeimpft, wurde die unten gezeigte Röhren-Apparatur verwendet. Die Röhren sind eine Eigenkonstruktion und wurden anhand einer Anleitung von der AG Schwartz (KIT), die diese ebenso für die Biofilmmzuchtung benutzt, gebaut. Die Röhren bestehen aus hitzebeständigem Material und haben eine Länge von 32 cm und einen Innendurchmesser von 5 cm. Die Biofilme wurden mit einer konstanten Flussrate von 10 ml/min bei Raumtemperatur kultiviert.



Abbildung 54: Abbildung des Röhrenreaktors. Das Medium wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe durch die Auffangflasche und die Röhre mit den Glasoberflächen gepumpt.

Innerhalb der Röhre befindet sich eine Halterung, in die man Glasobjektträger schieben kann.

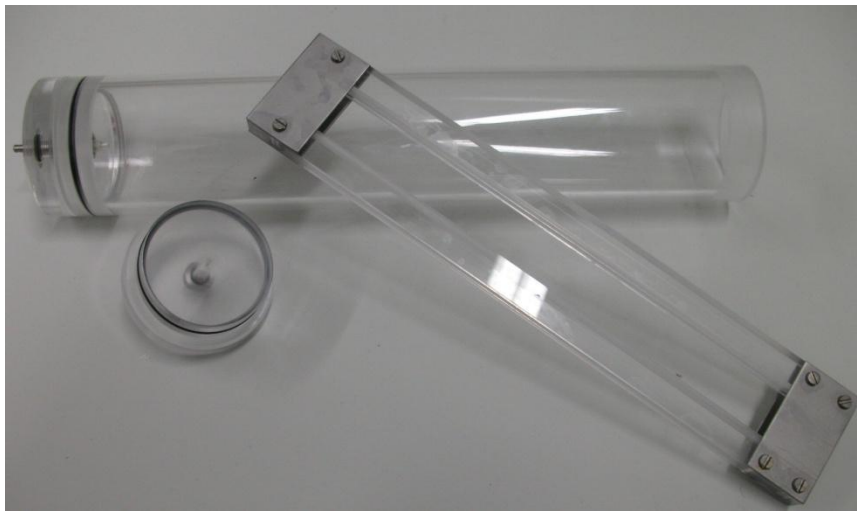


Abbildung 55: Reaktorröhre mit Halterung für Glasobjektträger

5.5.4 Quantifizierung eines Biofilms anhand des Fluoreszenzsignals

Die Mikrotiterplatten (BD Falcon 96 Flat transparent/black) wurden mit dem Infinite M200 pro *Platereader* und dem Programm Tecan-i-control ausgewertet. Pro Nöpfchen wurden 200 μl CM-Medium mit verschiedenen pH-Werten und $2 \cdot 10^4$ Sporen eingesetzt. Für die verschiedenen Konzentrationen der getesteten Lösungen wurde eine Verdünnungsreihe in den Nöpfchen hergestellt. Zusätzlich zu den 200 μl Medium im ersten Nöpfchen wurden 200 μl CM mit einer 2,05-fach höheren

Konzentration der zu testenden Lösung gegeben, durch resuspendieren gemischt und wiederum 200µl in das Nöpfchen mit der nächst niedrigeren Konzentration gegeben. Zuletzt wurden dann noch $2 \cdot 10^4$ Sporen des fluoreszenzmarkierten Stammes zugegeben. Die letzten 200 µl bei 0,8 µg/ml wurden verworfen. Nach der Inkubationszeit von 48h wurden die Nöpfchen zwei Mal mit sterilen 0,85% NaCl gewaschen. Für die Messung der Fluoreszenz wurden 10 Blitze und eine Exzitationswellenlänge von 395 nm bzw. eine Emissionswellenlänge von 509 nm für GFP verwendet.

Tabelle 26: Verwendete Lösungen

Lösung	Konzentration der Stammlösung
Glucanex	20 mg/ml in KCl/CaCl ₂
Amphotericin B	5 mg/ml in 50% DMSO
Benomyl	200 mg/ml in ddH ₂ O
Calcofluor	20 mg/ml in ddH ₂ O

Tabelle 27: Verwendete Peptide

Peptid	Aminosäuren-Sequenz	Referenz
Sub5	RRWKIVVIRWRR	KIT, Campus Nord, Karlsruhe

5.5.5 Mikrotiterscreening-Assay mit Resazurin

Der Mikrotiterscreening-Assay wurde nach Mania *et al.* 2010 durchgeführt. Für den Mikrotiterscreening-Assay wurde zuerst die Sporenlösung auf 10^4 Sporen pro 10 µl verdünnt. Anschließend wurde Resazurin als Indikator zum Medium gegeben, sodass eine 100 µM Lösung entsteht. Dieser Farbstoff schlägt bei der Atmung von lebenden Mikroorganismen von blau nach pink um, da das Resazurin von normal arbeitenden Zellen allmählich zu Resorufin reduziert wird. Je 200 µl dieses Mediums wurden in jede Mulde der Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde die zu testende Substanz (siehe Tabelle 26 und Tabelle 27) in die erste Mulde in einer 2,05-fach erhöhten Konzentration dazu pipettiert. Durch resuspendieren wurde die Lösung gemischt und wiederum 200 µl in das Nöpfchen mit der nächsten niedrigeren

Konzentration gegeben. Zuletzt wurde noch pro Well 10 µl der Sporensuspension zugegeben. Also Kontrolle wurde CM ohne Resazurin mit Sporen und CM mit Resazurin ohne Sporen verwendet. Die Platte wurde für 16-20 Stunden bei 28°C inkubiert.

5.5.6 Biofilmmedien

Tabelle 28: Medien für die Biofilmbildung

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Synthetisches Abwasser	16,0 g Pepton aus Casein 11,0 g Fleischextrakt 3,0 g Harnstoff 0,7 g NaCl 0,4 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 2,8 g K ₂ HPO ₄ 1 ml Spurenelemente pH ~ 7,5
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung 20 g Glucose 2 g Pepton 1 g Hefeextrakt 1 ml Vitaminlösung 1 ml Spurenelementlösung mit 10 M NaOH auf pH ~6.5

5.6 Mikroskopische Methoden

5.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Zeiss Mikroskop AxioImagerZ.1 (Software: AxioVision V4.5) und mit einem 63-er Objektiv durchgeführt. Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (*Differential Interference Contrast*) angewendet. Zur Bildaufnahme diente die Zeiss AxioCamMR und als Quelle für Fluoreszenzlicht eine HBO100 Quecksilberdampfampe (*Osram*).

5.6.2 Calcofluor-Färbung

Um die mit einem Biofilm bewachsenen Objektträger zu mikroskopieren, wurde zuerst der Biofilm mit 3 x 1 ml sterilem 0,85% NaCl gewaschen. Anschließend wurde der Biofilm mit 10 µl 0,1% Calcofluor und 10 µl 15% KOH-Lösung gefärbt. Für die Fixierung wurde der Objektträger mit 70 %igem EtOH und anschließend mit sterilem ddH₂O gewaschen.

5.6.3 Hoechst-Färbung

Es wurde das Hoechst von Sigma-Aldrich verwendet (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride). Der Biofilm wurde wie in 5.6.2 beschrieben gewaschen und anschließend mit einem Tropfen einer 100 µg/ml konzentrierten Lösung für 15 Minuten gefärbt. Die Fluoreszenz wurde mit dem DAPI-Filter mikroskopiert.

5.6.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die FISH wurde nach Baschien *et al.* 2008 durchgeführt. Jedoch wurde die Fixierung etwas verändert.

In Tabelle 29 sind die für die FISH verwendeten Sonden aufgeführt und in Tabelle 30 die benötigten Lösungen.

Tabelle 29: Lösungen für die FISH

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Wirkung
EuUni	ACCAGACTTGCCCTCC 5' markiert mit FAM	bindet an 18S rRNA von Eukaryoten
EuB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT 5' markiert mit Cy3	bindet an 16S rRNA von Prokaryoten

Tabelle 30: Lösungen für die FISH

Lösung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Lagerpuffer	1:1 (vol/vol) PBS und 96% Ethanol
Permeabilisierungs-Puffer	1x PBS 1% SDS, pH 5,5
Hybridisierungs-Puffer	0,9 M NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,2 0,03% SDS 20% Formamid
Wasch-Puffer	250 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 0,01% SDS

Um ein Biofilm auf einem Objektträger direkt zu färben, wurde er zuerst für ein bis zwei Stunden in 3,7%igem Paraformaldehyd in 1x PBS bei 4°C im Dunkeln dehydriert. Anschließend wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und über Nacht (kann bis zu drei Monate gelagert werden) bei -20°C in Lager-Puffer fixiert. Schließlich wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und die Probe anschließend luftgetrocknet. Für die Hybridisierung wurde die Probe zweimal mit dH₂O gewaschen und luftgetrocknet. Zum permeabilisieren der Zellwände wurde der Objektträger mit Permeabilisierungs-Puffer und Glucanex (10 mg/ml) bei 30°C für zehn Minuten behandelt. Schließlich wurde wieder mit dH₂O gewaschen und luftgetrocknet. Die Proben wurden mit 50, 80 und 96% Ethanol für jeweils drei Minuten beschichtet. Es erfolgte die Behandlung mit dem Hybridisierungs-Puffer der zuvor mit der Sonde vermischt wurde (200 pmol auf 1 ml). Es wurde eineinhalb Stunden bei 46°C im Dunkeln hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde mit waschen mit vorgewärmten Wasch-Puffer für 20 Minuten bei 46°C entfernt. Die Wasch-Lösung wurde mit sterilem dH₂O entfernt.

6 Literaturverzeichnis

Agrios, G. N. (1988). "Plant Pathology, 3rd. ed. ." *Academic Press*: 803.

AlKhail, A. A. A. (2005). "Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi." *Pak. J. Biol. Sci.***8**(3): 413-417.

Angelova, M. B., S. B. Pashova, et al. (2005). "Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat." *Mycological research* **109**(Pt 2): 150-158.

Angst, E. (1923). "The Fouling of Ships Bottoms by Bacteria. ." *Rep Bur Constr Repair* US Navy Dep., Washington, DC.

Arst, H. N. and M. A. Penalva (2003). "pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems." *Trends in genetics : TIG***19**(4): 224-231.

Baillie, G. S. and L. J. Douglas (1998). "Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents." *Antimicrob Agents Chemother***42**(8): 1900-1905.

Baillie, G. S. and L. J. Douglas (2000). "Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents." *J Antimicrob Chemother***46**(3): 397-403.

Baschien, C., W. Manz, et al. (2008). "In situ detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence in situ hybridization probes." *Appl Environ Microbiol***74**(20): 6427-6436.

Bilwes, A. M., L. A. Alex, et al. (1999). "Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase." *Cell***96**(1): 131-141.

Bixler, G. D. and B. Bhushan (2012). "Biofouling: lessons from nature." *Philos Transact A Math Phys Eng Sci***370**(1967): 2381-2417.

Bizerra, F. C., C. V. Nakamura, et al. (2008). "Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance." *FEMS Yeast Res***8**(3): 442-450.

Buck, J. D. and P. M. Bubucis (1978). "Membrane filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters." *Appl Environ Microbiol***35**(2): 237-242.

Burmolle, M., L. H. Hansen, et al. (2007). "Establishment and early succession of a multispecies biofilm composed of soil bacteria." *Microb Eco***54**(2): 352-362.

Callow, M. E. (1986). "A world-wide survey of slime formation on anto-fouling paints." *Algal biofouling. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers*: 1-20.

Camper, A. K. M., G. A. (2000). "Problems of biofouling in drinking water systems." *Industrial biofouling detection, prevention and control. New York, NY: Wiley***15-38**.

Caracuel, Z., M. I. Roncero, et al. (2003). "The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*." *Mol Microbiol***48**(3): 765-779.

Carpentier, B. and O. Cerf (1993). "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry." *J Appl Bacteriol***75**(6): 499-511.

Causton, H. C., B. Ren, et al. (2001). "Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes." *Molecular biology of the cell* **12**(2): 323-337.

Chan, J. W., S. (2010). "Biofouling typed, impact and antifouling." *New York, NY: Nova Science Publishers*.

Chandra, J., D. M. Kuhn, et al. (2001). "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance." *J Bacteriol***183**(18): 5385-5394.

Christensen, B. E. (1989). "The role of extracellular polysaccharides in biofilms." *J Biotechnol***19**: 181-202.

Clutterbuck, A. J. (1969). "A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*." *Genetics***63**(2): 317-327.

Costerton, J. W., K. J. Cheng, et al. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." *Annu Rev Microbiol***41**: 435-464.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, et al. (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol***49**: 711-745.

Costerton, J. W., P. S. Stewart, et al. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science***284**(5418): 1318-1322.

Davies, D. (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." *Nat Rev Drug Discov***2**(2): 114-122.

Delgado-Jarana, J., A. L. Martinez-Rocha, et al. (2005). "Fusarium oxysporum G-protein beta subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways." *Fungal Genet Biol***42**(1): 61-72.

Di Bonaventura, G., A. Pompilio, et al. (2006). "Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance." *Antimicrob Agents Chemother***50**(10): 3269-3276.

Di Pietro, A., F. I. Garcia-MacEira, et al. (2001). "A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis." *Mol Microbiol***39**(5): 1140-1152.

Di Pietro, A., M. P. Madrid, et al. (2003). "Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus." *Mol Plant Pathol***4**(5): 315-325.

Doggett, M. S. (2000). "Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system." *Appl Environ Microbiol***66**(3): 1249-1251.

Donlan, R. M. (2001). "Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process." *Clin Infect Dis***33**(8): 1387-1392.

Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin Microbiol Rev***15**(2): 167-193.

Elion, E. A., P. L. Grisafi, et al. (1990). "FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation." *Cell***60**(4): 649-664.

Elvers, K. T., K. Leeming, et al. (2001). "Binary culture biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Fusarium oxysporum*." *J Ind Microbiol Biotechnol***26**(3): 178-183.

Elvers, K. T., K. Leeming, et al. (2002). "Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides." *J Ind Microbiol Biotechnol***29**(6): 331-338.

Emtiazi, F., T. Schwartz, et al. (2004). "Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration." *Water Res***38**(5): 1197-1206.

Espeso, E. A. and H. N. Arst, Jr. (2000). "On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene." *Mol Cell Biol***20**(10): 3355-3363.

Ferris, F. G., S. Schultze, et al. (1989). "Metal Interactions with Microbial Biofilms in Acidic and Neutral pH Environments." *Appl Environ Microbiol***55**(5): 1249-1257.

Fiedurek, J. and I. Z. (1991). "Glucose oxidase biosynthesis using immobilised mycelium of *Aspergillus niger*." *World J Microbiol Biotechnol***7**: 379-384.

Fingerman, M., Nagabhushanam, R. & Thompson, M. F. (1999). "Recent advances in marine biotechnology." *Enfield, NH: Science Publishers, Inc.*

Fleissner, A., S. Sarkar, et al. (2005). "The so locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*." *Eukaryot Cell***4**(5): 920-930.

Flemming, H. C. (1991). "Biofilme und Wassertechnologie Teil 1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen." *GWF Wasser-Abwasser***132**: 197-207.

Flemming, H. C. W., J. (2002). "Was Biofilme zusammenhält." *Chemie in unserer Zeit***36**: 30-42.

Flemming, H. C. W. J. (2001). "Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme." *Biologie in unserer Zeit***3 (31)**: 169-180.

Galagan, J. E., S. E. Calvo, et al. (2005). "Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*." *Nature***438**(7071): 1105-1115.

Gamarra, N. N., G. K. Villena, et al. (2010). "Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations." *Appl Microbiol Biotechnol***87**(2): 545-551.

Gasch, A. P., P. T. Spellman, et al. (2000). "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes." *Molecular biology of the cell***11**(12): 4241-4257.

Gjermansen, M., P. Ragas, et al. (2005). "Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms." *Environ Microbiol***7**(6): 894-906.

Goncalves, A. B., I. M. Santos, et al. (2006). "FISH and Calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water." *Rev Iberoam Micol* **23**(3): 194-198.

Gordon, D. P. M., S. F. (1992). "Atlas of marine-fouling Bryozoa of New Zealand ports and harbours." *New Zealand: Miscellaneous Publishers, New Zealand Oceanographic Institute*.

Gordon, T. R. and R. D. Martyn (1997). "The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*." *Annu Rev Phytopathol* **35**: 111-128.

Grabinska-Loniewska, A., T. Konillowicz-Kowalska, et al. (2007). "Occurrence of Fungi in Water Distribution System." *Polish J. of Environ. Stud.* **16**(No. 4): 539-547.

Gutierrez-Correa, M., Y. Ludena, et al. (2012). "Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses." *Appl Biochem Biotechnol* **167**(5): 1235-1253.

Han, K. H. and R. A. Prade (2002). "Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*." *Molecular microbiology* **43**(5): 1065-1078.

Harding, M. W., L. L. Marques, et al. (2009). "Can filamentous fungi form biofilms?" *Trends Microbiol* **17**(11): 475-480.

Harrison, J. J., M. Rabiei, et al. (2006). "Metal resistance in *Candida* biofilms." *FEMS Microbiol Eco* **55**(3): 479-491.

Harrison, J. J., R. J. Turner, et al. (2007). "A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents." *FEMS Microbiol Lett* **272**(2): 172-181.

Hellio, C. Y., D. (2009). "Advances in marine antifouling coatings and technologies." *Boca Raton, FL: CRC Press*.

Hendrickx, L., M. Hausner, et al. (2003). "Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms." *Appl Environ Microbiol* **69**(3): 1721-1727.

Henrici, A. T. (1933). "Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique." *J Bacteriol* **25**(3): 277-287.

Hiremath, A., P. Nimbargi, et al. (1985). "Fungi of wastewaters and stabilisation pond." *Proc. Indian Acad. Sci.* **95**(4): 263-269.

Hogan, D. A. (2006). "Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi." *Eukaryot Cell* **5**(4): 613-619.

Imamura, Y., J. Chandra, et al. (2008). "Fusarium and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(1): 171-182.

Iyer, S. A., S. S. Tuli, et al. (2006). "Fungal keratitis: emerging trends and treatment outcomes." *Eye Contact Lens* **32**(6): 267-271.

James, G. A., D. R. Korber, et al. (1995). "Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp." *J Bacteriol* **177**(4): 907-915.

Jones, G. (2009). "The battle against marine biofouling: a historical review." *Advances in marine antifouling coatings and technologies*. Boca Raton, FL: CRC Press: 19-45.

Kitagawa, M., Y. Matsumura, et al. (2000). "Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* **184**(2): 165-171.

Kuchma, S. L. and G. A. O'Toole (2000). "Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression." *Curr Opin Biotechnol***11**(5): 429-433.

Kulp, T. R., S. E. Hoefft, et al. (2008). "Arsenic(III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California." *Science***321**(5891): 967-970.

Kultz, D. (1998). "Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases." *J Mol Evo***46**(5): 571-588.

Lebret, K., Thabard, M. & Hellio, C. (2009). "Algae as marine fouling organisms: adhesion damage and prevention." *Advances in marine antifouling coatings and technologies*. Boca Raton, FL: CRC Press: 80-112.

Lewandowski, Z., J. M. Martinko, et al. (1994). "Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems - recent advances and new problems." *Wat. Sci. Technol.* **29**: 223-229.

Lim, H. S., Y. S. Kim, et al. (1991). "Pseudomonas stutzeri YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against Fusarium solani, an Agent of Plant Root Rot." *Appl Environ Microbiol***57**(2): 510-516.

Liu, Z. D., Z. W. Du, et al. (2007). "Improving energy accumulation of microbial fuel cells by metabolism regulation using Rhodospirillum rubrum as biocatalyst." *Letts Appl Microbiol***44**(4): 393-398.

Macias, M. J., S. Wiesner, et al. (2002). "WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands." *FEBS Lett***513**(1): 30-37.

Madhani, H. D. and G. R. Fink (1997). "Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling." *Science***275**(5304): 1314-1317.

Madhani, H. D., C. A. Styles, et al. (1997). "MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation." *Cell***91**(5): 673-684.

Mania, D., K. Hilpert, et al. (2010). "Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*." *Appl Environ Microbiol* **76**(21): 7102-7108.

Margolis, T. P. and J. P. Whitcher (2006). "Fusarium--A new culprit in the contact lens case." *JAMA* **296**(8): 985-987.

Martienssen, M. (2001). "Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen." *Habilitationsschrift*.

Michielse, C. B. and M. Rep (2009). "Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*." *Mol Plant Pathol* **10**(3): 311-324.

Monroe, D. (2007). "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms." *PLoS Biol* **5**(11): e307.

Morris, N. R., S. A. Osmani, et al. (1989). "The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*." *Bioessays* **10**(6): 196-201.

Mowat, E., J. Butcher, et al. (2007). "Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*." *J Med Microbiol* **56**(Pt 9): 1205-1212.

Mozaffari, F. (2011). "Identifikation von erdölabbauenden Bakterien: Auf der Suche nach der Turbobakterie." *Diplomarbeit*.

Murado, M. A. S. I. G. G., P.; Montemayor, I. (1994). "A simple form of immobilization and its effect on morphologic trends and metabolic activity of pellet forming microfungi." *Bioresour Technol* **48**: 237-243.

Murray, A. E., J. T. Hollibaugh, et al. (1996). "Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments." *Appl Environ Microbiol* **62**(7): 2676-2680.

Muyzer, G., E. C. de Waal, et al. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Appl Environ Microbiol***59**(3): 695-700.

r

Negrete-Urtasun, S., S. H. Denison, et al. (1997). "Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs." *J Bacteriol***179**(5): 1832-1835.

Nübel, U., B. Engelen, et al. (1996). "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis." *J Bacteriol***178**(19): 5636-5643.

Nucci, M. and E. Anaissie (2007). "Fusarium infections in immunocompromised patients." *Clin Microbiol Rev***20**(4): 695-704.

O'Toole, G., H. B. Kaplan, et al. (2000). "Biofilm formation as microbial development." *Annu Rev Microbiol***54**: 49-79.

Pannanusorn, S., V. Fernandez, et al. (2012). "Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection." *Mycoses*.

Penalva, M. A., J. Tilburn, et al. (2008). "Ambient pH gene regulation in fungi: making connections." *Trends Microbiol***16**(6): 291-300.

Perez-Nadales, E. and A. Di Pietro (2011). "The membrane mucin *Msb2* regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*." *Plant Cell***23**(3): 1171-1185.

Perumal, P., S. Mekala, et al. (2007). "Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms." *Antimicrob Agents Chemother***51**(7): 2454-2463.

Pfaller, M. A., S. A. Messer, et al. (2002). "Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin

B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000." *Antimicrobial agents and chemotherapy***46**(4): 1032-1037.

Pontecorvo, G., J. A. Roper, et al. (1953). "The genetics of *Aspergillus nidulans*." *Adv Genet***5**: 141-238.

Prados Rosales, R. C. and A. Di Pietro (2008). "Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*." *Eukaryot Cell***7**(1): 162-171.

Pratt, L. A. and R. Kolter (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." *Mol Microbiol***30**(2): 285-293.

Puri, S., R. Kumar, et al. (2012). "Secreted aspartic protease cleavage of *Candida albicans* Msb2 activates Cek1 MAPK signaling affecting biofilm formation and oropharyngeal candidiasis." *PLoS One***7**(11): e46020.

Qi, M. and E. A. Elion (2005). "MAP kinase pathways." *J Cell Sci***118**(Pt 16): 3569-3572.

Raad, I. and R. Hachem (1995). "Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*." *Clin Infect Dis***20**(3): 709-711.

Railkin, A. I. (2004). "Marine biofouling colonization processes and defenses." *Boca Raton, FL: CRC Press*.

Ramage, G., S. Bachmann, et al. (2002). "Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms." *J Antimicrob Chemother***49**(6): 973-980.

Ramage, G., E. Mowat, et al. (2009). "Our current understanding of fungal biofilms." *Crit Rev Microbiol***35**(4): 340-355.

Ramage, G., R. Rajendran, et al. (2011). "Aspergillus biofilms: clinical and industrial significance." *FEMS Microbiol Lett***324**(2): 89-97.

Ramage, G., K. Vandewalle, et al. (2001). "Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*." *Rev Iberoam Mico***18**(4): 163-170.

Ramani, R. and V. Chaturvedi (2011). "Evaluations of shorter exposures of contact lens cleaning solutions against *Fusarium oxysporum* species complex and *Fusarium solani* species complex to simulate inappropriate usage." *Antimicrob Agents Chemother***55**(5): 2265-2275.

Ren, D., L. A. Bedzyk, et al. (2004). "Gene expression in *Escherichia coli* biofilms." *Appl Microbiol Biotechnol***64**(4): 515-524.

Rensing, L., C. Monnerjahn, et al. (1998). "Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi." *FEMS Microbiol Lett***168**(2): 159-166.

Reynolds, T. B. and G. R. Fink (2001). "Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation." *Science***291**(5505): 878-881.

Rispail, N. and A. Di Pietro (2009). "Fusarium oxysporum Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade." *Mol Plant Microbe Interact***22**(7): 830-839.

Rispail, N. and A. Di Pietro (2010). "The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*." *Mol Plant Pathol***11**(3): 395-407.

Rodgers, M. Z., X.; O'Reilly, E. (2006). "Small-scale domestic wastewater treatment using an alternating pumped sequencing batch biofilm reactor system." *Bioprocess Biosyst Eng***28**: 323-330.

Roman, E., F. Cottier, et al. (2009). "Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*." *Eukaryotic cell***8**(8): 1235-1249.

Roncero, C., Duran A. (1985). "Effect of Calcofluor White and Congo Red on Fungal Cell Wall Morphogenesis: In Vivo Activation of Chitin Polymerization" *J Bacteriol* **163**(3): 1180-1185.

Rusznyak, A., G. Szabo, et al. (2007). "Diversity of reed (*Phragmites australis*) stem biofilm bacterial communities in two Hungarian soda lakes." *Acta Microbiol Immunol Hung***54**(4): 339-352.

Sauer, K. (2003). "The genomics and proteomics of biofilm formation." *Genome Biol***4**(6): 219.

Schembri, M. A., K. Kjaergaard, et al. (2003). "Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms." *Mol Microbiol***48**(1): 253-267.

Schmeisser, C., C. Stockigt, et al. (2003). "Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks." *Appl Environ Microbiol***69**(12): 7298-7309.

Schopf, J. W., Hayes, J.M., Walter, M.R. (1983). "Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems." *In: J.W.Schopf: Earth's earliest biosphere, Princeton Univ. Press, New Jersey: 361-384.*

Schubert, K., J. Z. Groenewald, et al. (2007). "Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics." *Stud Mycol***58**: 105-156.

Seidler, M. J., S. Salvenmoser, et al. (2008). "*Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells." *Antimicrob Agents Chemother***52**(11): 4130-4136.

- Shirtliff, M. L., J. G. (2009). "The role of biofilms in device-related infections." *Berlin, Germany: Springer-Verlag.*
- Sievers, N., Krüger, M., Fischer R. (1997). "Kreuzung von *Aspergillus nidulans*." *Biol unserer Zeit***6**.
- Skowronek, M. F., J. (2006). "Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*." *Enzyme Microb Technol***38**: 162-167.
- Spormann, A. M. (2008). "Physiology of microbes in biofilms." *Curr Top Microbiol Immunol***322**: 17-36.
- Stoodley, P., K. Sauer, et al. (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." *Annu Rev Microbiol***56**: 187-209.
- Szewczyk, E., T. Nayak, et al. (2006). "Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*." *Nat Protoc***1**(6): 3111-3120.
- Thomas, P. A. (2003). "Current perspectives on ophthalmic mycoses." *Clin Microbiol Rev***16**(4): 730-797.
- Tilburn, J., J. C. Sanchez-Ferrero, et al. (2005). "Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members." *Genetics***171**(1): 393-401.
- Tilburn, J., S. Sarkar, et al. (1995). "The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH." *EMBO J***14**(4): 779-790.
- Van der Wende, E. C., W.G. (1990). "Biofilms in potable water distribution systems " *Drinking Water Microbiology. Springer-Verlag, New York.*

Villena, G. K., T. Fujikawa, et al. (2010). "Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy." *Bioresour Technol* **101**(6): 1920-1926.

Villena, G. K. and M. Gutierrez-Correa (2006). "Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth." *Lett Appl Microbiol* **43**(3): 262-268.

Vincent, M. N., Harrison, L. A. et al. (1991). "Genetic Analysis of the Antifungal Activity of a Soilborne *Pseudomonas aureofaciens* Strain." *Appl Environ Microbiol* **57**(10): 2928.

Walker J. , S. S., Jass J. (2000). "Industrial biofouling detection, prevention and control." *New York, NY: Wiley*.

Ward, D. M., Weller, R., Cohen, Y. (1989). "Hot spring microbial mats: anoxygenic and oxygenic mats of possible evolutionary significance." *Cohen, Y., Rosenberg, E.: Microbial Mats. American Society for Microbiology, Washington.:* 3-15.

Waters, C. M. and B. L. Bassler (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.

Whiteley, M., M. G. Banger, et al. (2001). "Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Nature* **413**(6858): 860-864.

Wingender, J., T. R. Neu, et al. (1999). "What are bacterial extracellular polymeric substances?" *In: Wingender, J.; Neu, T.R.; Flemming, H.C. (Hrsg.): Microbial extracellular polymeric substances, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York:* 1-19.

Xiao, Y., G. M. Zeng, et al. (2009). "Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE." *J Appl Microbiol* **106**(2): 496-505.

Yamada-Okabe, T., T. Mio, et al. (1999). "Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*." *J Bacteriol***181**(23): 7243-7247.

Yeater, K. M., J. Chandra, et al. (2007). "Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development." *Microbiology***153**(Pt 8): 2373-2385.

Yu, J., D. Kim, et al. (2010). "Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials." *Water Sci Technol***61**(1): 163-171.

Zijngel, V., M. B. van Leeuwen, et al. (2010). "Oral biofilm architecture on natural teeth." *PLoS One***5**(2): e9321.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<i>gpd(p)</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promotor
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
<i>RFU</i>	relative fluorescence unit
<i>trp(t)</i>	Tryptophan Terminator

7.2 Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Rieder A, Schwartz T, Obst U, Bollschweiler C, Gutt B, Zoller J, Fischer R. (2010). Hydrophobins - using hydrophobins to prevent microbial biofilm growth on mineral surfaces. *Geotechnologien Science Report*. 16:3-18.

Zoller J & Fischer R.

Impact of the histidine kinase Fhk1 and the pH signaling transcription factor PacC on *Fusarium oxysporum* biofilms. (in Vorbereitung)

Konferenzbeiträge

- | | |
|---------|---|
| 03/2010 | Vortrag: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Hannover |
| 12/2010 | Poster: Soil Metagenomics 2010, Braunschweig |
| 04/2011 | Poster: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe |

7.3 Lebenslauf

Name Julia Zoller
Adresse Hauptstraße 1, 76776 Neuburg am Rhein
Geburtsdatum 11.01.1985
Geburtsort Karlsruhe
E-Mail Julia-Zoller@web.de

Schulbildung und Studium

06/2004 Elisabeth-Selbert-Schule, Karlsruhe
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/2004 bis 12/2008 Universität Karlsruhe (TH)
Studium der Biologie mit Abschluss Diplom

01/2009 bis 09/2009 Universität Karlsruhe (TH)
Diplomarbeit am Institut für Angewandte Biowissenschaften-
Abteilung Mikrobiologie
Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung von Pilzen in
Biofilmen

10/2009 bis 12/2012 Karlsruher Institut für Technologie
Promotion am Institut für Angewandte Biowissenschaften-
Abteilung Mikrobiologie
Thema der Dissertation: Charakterisierung von Biofilmen
und Untersuchung des pilzlichen Wachstums am Beispiel
von *Fusarium oxysporum*

7.4 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanken, der mir die Möglichkeit zurAnfertigung dieser Arbeit gab und immer Ratschläge zur Lösung von auftretenden Problemen hatte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Rolf Geisen für seine Bereitschaft die Aufgabe des Koreferenten zu übernehmen.

Besonderen Dank gilt Prof. Dr. Antonio Di Pietro für die Bereitstellung der Deletionsmutanten.

Besonderen Dank gilt auch Prof. Dr. Bettina Tudzynski und Kathleen Huß, von denen ich den *Fusarium* Stamm bekommen habe und mir bei einem Besuch in Münster die Transformation gezeigt haben.

Bei der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, besonders bei Herrn Milz und Herrn Zoller, möchte ich mich für ihre Mühen bei der Probeentnahme bedanken.

Bei der AG Gescher, besonders Gunnar, für die Benutzung des *Platereaders*.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus dem „Kompetenzlabor“, die mir immer hilfreich zur Seite standen und die mit ihrer guten Laune für eine schöneArbeitsatmosphäre gesorgt haben. Vor allem Bea, die mich die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit begleitet hat.

Ebenfalls danken will ich den Kollegen der anderen Labors. Insbesondere bei Claudia, Maren und Kristin, die mich während der letzten Jahre begleitet haben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinem Freund für die Unterstützung während der letzten Jahre bedanken. Ohne Euch hätte ich das Alles nicht geschafft.