

## Effekt des Bodenbakteriums *Pseudomonas veronii*-like PAZ1 auf das Wachstum des White-Nose Erregers *Geomyces destructans* in Antagonisten-Tests

Von MARCUS FRITZE, THI LAM HUONG PHAM, Berlin, und IRMTRAUD ZASPEL, Waldsiedersdorf

Mit 3 Abbildungen

### Abstract

**Effect of the soil bacterium *Pseudomonas veronii*-like PAZ1 on the growth of the White-Nose pathogen *Geomyces destructans* in antagonistic tests**

For the first time, the interaction between soil bacteria such as *Pseudomonas* and the in Germany isolated soil fungus *Geomyces destructans* (*Gd*) has been investigated. *In-vitro* antagonistic tests on several agar culture media and at different pH values (from 3.5 to 8.5) indicated clearly an inhibition of *Gd* growth caused by *Pseudomonas veronii*-like PAZ1. In antagonist tests on mPDA agar culture medium, the bacterium PAZ1 inhibits totally the growth of *G. destructans*.

### Zusammenfassung

Die Wechselwirkung zwischen einem Bodenbakterium aus der Gattung *Pseudomonas* und dem in Deutschland isolierten Bodenpilz *Geomyces destructans* (*Gd*) wurden zum ersten Mal *in-vitro* untersucht. Es wurde eine deutliche Hemmwirkung des Stammes *Pseudomonas veronii*-like PAZ1 auf das Wachstum des Pilzes *G. destructans* auf verschiedenen Agar-Medien und bei unterschiedlichen pH-Werten (3,5 bis 8,5) nachgewiesen. Auf modifizierten PDA-Medien unterbindet das Bakterium PAZ1 das Pilzwachstum vollständig.

### Keywords

White-Nose syndrome pathogen, *Geomyces destructans*, antagonistic bacterium, *Pseudomonas veronii*-like PAZ1.

### 1 Einleitung

Das White-Nose Syndrom (WNS) bei Fledermäusen ist eine epizootische Pilzkrankung, die seit 2006 in Nordamerika auftritt und unter Fledermauspopulationen sehr große Verluste ausgelöst hat. Erreger ist der kälteliebende Schlauchpilz *Geomyces destructans* (*Gd*) BLEHERT & GARGAS, sp. nov. (BLEHERT et al.

2009), der Fledermäuse während der Überwinterungsphase befällt und nach bisherigen Erkenntnissen wichtige Funktionen der Haut zerstört und zu einer dramatischen epidemischen Ausbreitung der Krankheit geführt hat (CRYAN et al. 2010, LORCH et al. 2011).

Einige in Europa überwinternde Fledermausarten werden offenbar regelmäßig mit *Geomyces destructans* befallen, wobei der Pilz vor allem beim (Großen) Mausohr (*Myotis myotis*) nachgewiesen wurde (WIBBELT et al. 2010). Bislang konnte jedoch in Europa kein vergleichbares Fledermaussterben mit *Gd* direkt in Verbindung gebracht werden (MARTINKOVA et al. 2010, WIBBELT et al. 2010, PUECHMAILLE et al. 2011), obwohl WARNECKE et al. (2012) bei europäischen *Gd*-Isolaten sogar eine höhere Pathogenität als seine amerikanische Variante nachgewiesen haben. Mikroorganismen sind in der Lage, ihre Gestalt und physiologischen Eigenschaften relativ schnell zu ändern und sich somit ihrer Umwelt entsprechend anzupassen. Damit ändern sich auch die Wechselwirkungen, die auf einzelne Vertreter wie *Gd* gerichtet sind. Durch das hohe Mutationsvermögen können auch relativ schnell neue pathogene Linien entstehen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch biotische oder abiotische Umweltveränderungen die europäische *Gd*-Population eine höhere Pathogenität erlangt, die bei den heimischen Fledermausarten eine ähnliche Krankheit auslösen kann. Die Untersuchung der mikrobiellen Begleitorganismen sowie ihre abiotischen Einflussfaktoren können helfen, den Krankheitsprozess der Infektion von Fledermäusen zu verstehen und durch gezielte Maßnahmen, z. B. den Einsatz von mi-

krobiellen Antagonisten, die schädlichen Wirkungen von pathogenen Stämmen von *Gd* bei Fledermäusen zu begrenzen. Die Suche nach geeigneten Antagonisten sowie die Aufklärung ihrer Wirkung und der Anwendungsbedingungen können als präventive Maßnahmen zum Schutz der europäischen Fledermauspopulationen weiter entwickelt werden.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, natürliche Antagonisten gegen die europäische Population von *Gd* zu finden. Es ist bereits bekannt, dass unter Mikroorganismen viele Vertreter natürliche antagonistische Wirkungen besitzen und eine Rolle für den biologischen Pflanzenschutz spielen. Bekannt sind Mikroorganismen mit fungizider, insektizider oder herbizider Wirkung. In unseren bisherigen Forschungsvorhaben beschäftigten wir uns mit der Erforschung der Interaktion zwischen terrestrischen Mikroorganismen und Pflanzen, z. B. der Erforschung der kausalen Zusammenhänge zwischen den Bodenmikroorganismen und dem Wachstum von Spross und Wurzel, dem symbiotischen Einfluss pflanzlicher Endophyten und deren Sekundärmetaboliten auf das Pflanzenwachstum, bzw. die direkten antagonistischen Wirkungen auf Pflanzenpathogene (PHAM et al. 2008, 2010, PHAM & ZASPEL 2011). Das Bakterienisolat *Pseudomonas veronii*-like PAZ1 wurde aus dem Myzel des Erregers des Europäischen Erlensterbens *Phytophthora alni* isoliert und zeigte gegenüber Erlenkeimpflanzen eine wirksame wachstumsfördernde Wirkung. In-vitro konnte durch dieses Bakterium eine antagonistische Wirkung gegen verschiedene Isolate von *Phytophthora alni* nachgewiesen werden (KRÜGER 2008). *P. veronii*-like PAZ1 produziert ca. 50 bekannte und neue Cyclolipodepsipeptide (mit 9 Aminosäuren und 3-hydroxydecanoic acid als Fettsäureseitenkette) der Viscosin-Gruppe, die antimikrobiell, antibiologisch, antiviral, antifungal, oder zytotoxisch sein können (PHAM et al. 2008, 2009, 2010, PHAM & ZASPEL 2011). Wahrscheinlich spielen einige dieser Cyclolipodepsipeptiden auch bei der Interaktion zwischen *Phytophthora alni* und dem Wirt *Alnus glutinosa* eine wichtige Rolle. Eine Hemmwirkung des *P. veronii*-

like PAZ1 konnte auch gegenüber *Chalara fraxinea*, dem Erreger des Eschensterbens in Europa, nachgewiesen werden (PHAM & ZASPEL 2012, noch nicht veröffentlichte Ergebnisse). Aufgrund seiner breiten antagonistischen Wirkung wurde in der vorliegenden Arbeit der Bakterienstamm *P. veronii*-like PAZ1 für die *in-vitro* Antagonistentests gewählt, um zu überprüfen, ob auch gegenüber einem europäischen Isolat von *G. destructans* die inhibierende Wirkung gefunden werden kann.

## 2 Material und Methoden

Die Kultivierung von *G. destructans* und *P. veronii*-like PAZ1 für die Antagonistentests erfolgte bei 10 °C und auf drei Agar-Kulturmedien: PDA (2,6 % Kartoffelstärke; 0,4 % Glucose; 1,5 % Agar); mPDA (2,6 % Kartoffelstärke; 0,4 % Glucose; 0,15 % Hefeextrakt; 1,5 % Agar), MI (1 % Malzextrakt; 0,4 % Glucose; 0,4 % Hefeextrakt; 1,5 % Agar). Die Kulturmedien wurden vor der Sterilisation auf sechs verschiedene pH-Werte 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 und 8,5 eingestellt. Für Kontroll-Platten wurde ein Agar-Stück (1 x 1 cm) aus der *Gd*-Mutterplatte in die Mitte der angeimpften Agarplatten platziert. Für die Antagonistentests wurde ein gleich großes Agar-Stück in die rechte Plattenhälfte und ein Agar-Stück aus der Kulturplatte des Bakteriums in die linke Plattenhälfte platziert. Der *Geomyces destructans* Stamm wurde bereits 2010 von Frau Dr. WIBBELT (Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin) zur Verfügung gestellt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Tests auf den drei Agar-Kulturmedien (mPDA, MI und PDA) und bei sechs verschiedenen pH-Werten sind in Abb. 1 bis 3 dargestellt.

*Gd* wächst auf MI-Medium am besten, weniger gut auf mPDA, und sehr schlecht auf PDA (Abb. 1-3). Der Zusatz von Hefeextrakt (0,15 %), wie es bei mPDA der Fall ist, wirkt sich positiv aus, im Vergleich zu dem reinen Medium PDA. Auf dem aminosäure- und proteinhaltigen Medium MI (mit 0,4 % Hefeextrakt)



Abb. 1. Antagonistentest (12 Wochen Kultivierungszeit) auf mPDA-Kulturmedium bei pH-Werten 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 und 8,5 (von links nach rechts): obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: Antagonistentest (links: Bakterium PAZ1; rechts: Pilz *Gd*).



Abb. 2. Antagonistentest (12 Wochen Kultivierungszeit) auf M1-Kulturmedium bei pH-Werten 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 und 8,5 (von links nach rechts): obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: Antagonistentest (links: Bakterium PAZ1; rechts: Pilz *Gd*).



Abb. 3. Antagonistentest (12 Wochen Kultivierungszeit) auf M1-Kulturmedium bei pH-Werten 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 und 8,5 (von links nach rechts): obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: Antagonistentest (links: Bakterium PAZ1; rechts: Pilz *Gd*).

wurde das beste *Gd*-Wachstum beobachtet. Die enthaltenen Mono- und Disaccharide wie Glucose und Maltose im M1-Medium förderten das *Gd*-Wachstum zusätzlich stark, wie die Ergebnisse zeigen. Auf reinem PDA-Medium (ohne Hefeextrakt- und Zuckerzusatz) wächst *Gd* sehr spärlich. Der Pilz wächst generell langsam auf den künstlichen Medien. Das Koloniewachstum auf PDA lag nach 12 Wochen bei etwa 1,5 cm. Auf M1-Medium betrug es 5 bis 6 cm und auf mPDA lagen die Koloniedurchmesser bei 3,5 bis 4,5 cm. Im Unterschied zu den Medien hatten die unterschiedlichen pH-Werte keinen großen Einfluss auf das *Gd*-Wachstum. Das sichtbar beste Pilzwachstum wurde in pH-Bereichen von 4,5 bis 6,5 beobachtet, d.h. im leicht sauren bis sauren Bereich, was für Pilze auch üblich ist.

Bei allen Platten, in denen neben *Gd* auch der Bakterienstamm PAZ1 kultiviert wurde, zeigten sich eindeutige Hemmzonen. Auf M1 (Abb. 2) sind die durch *P. veronii*-like PAZ1 gebildeten Hemmzonen sehr gut zu erkennen. Der Pilz konnte auf M1-Medium zwar noch gut wachsen, die Koloniegröße war aber durch das Bakterium eingeschränkt. Im Test auf mPDA (Abb. 1) wurde das Wachstum des *Gd* durch das Bakterium sehr stark bis vollständig gehemmt, so dass das Pilzmyzel keine Entwicklungsmöglichkeit hatte.

Es wird angenommen, dass die Sekundärmetaboliten (Cyclolipopeptid) des Bakteriums *P. veronii*-like PAZ1 die hemmende Wirkung auf das Wachstum des *Gd* verursachen. Daher ist für die weitere Untersuchung geplant, diese Cyclolipopeptid zu isolieren und mit Einzelkomponenten Tests gegen *Gd* durchzuführen.

Weiterhin soll untersucht werden, ob andere Bakteriengruppen oder generell andere Mikroorganismen, die z.B. aus den Winterquartieren isoliert werden können, antagonistisch auf den Pilz *Gd* wirken. Erste Untersuchungen aus den USA zeigen, dass dieser Weg erfolgreich sein kann. In Proben von getöteten, infizierten Fledermäusen in den USA wurden Bakterien in unmittelbarer Umgebung der *Gd*-Hyphen fest-

gestellt. Es wurden dabei aber bisher keine bekannten pathogenen Arten identifiziert (CHATURVEDI et al. 2010, AMELON & KNUDSEN 2010). Auch BARLOW et al. (2009) berichteten über Bakterien, die zusammen mit zwei Pilzarten (*Rhizopus sp.*, *Paecilomyces sp.*) aus der Nase und Flughaut zweier Großer Huftisennasen (*Rhinolophus ferrumequinum*) isoliert wurden. Es gibt bisher jedoch keine Erkenntnisse, welche Rolle diese Bakterien spielen (CRYAN et al. 2010). Derzeit laufen bereits Untersuchungen, ob es weitere Bakterienarten gibt, die als natürlicher Antagonist auch Wirkstoffe produzieren, die den Pilz hemmen (AMELON & KNUDSEN 2010).

#### 4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse unserer *in-vitro* Antagonistentests haben einen Lösungsweg aufgezeigt, dass es tatsächlich möglich ist, natürliche Antagonisten zu finden, die das Wachstum des *Gd* und/oder die schädlichen Wirkungen von Pathogenen auf Fledermäusen limitieren. Inwieweit *P. veronii*-like PAZ1 für Maßnahmen gegen den *Gd*-Befall auf Fledermäusen genutzt werden kann, muss weiter untersucht werden.

#### Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Dr. GUDRUN WIBBELT (Leibniz-Institut für Zoo- & Wildtierforschung Berlin) für die Bereitstellung des Stammes *G. destructans* und die vielen hilfreichen Tipps und Hinweise. Weiterer Dank gilt Frau Dipl.-Ing. THANH DAM HUYNH für die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

#### Schrifttum

- AMELON, S., & KNUDSEN, G. (2010): Evaluation of nonpathogenic bat skin microbes for antagonistic activity to *Geomyces destructans*. Progress report 2010, U. S. Forest Service: 1-2. URL: [http://whitenoisesyndrome.org/sites/default/files/resource/amelon\\_knudsen\\_microprogressreport\\_0.pdf](http://whitenoisesyndrome.org/sites/default/files/resource/amelon_knudsen_microprogressreport_0.pdf) (letzter Abruf: 30.09. 2012).
- BARLOW, A., FORD, S., GREEN, R., MORRIS, C., & REANEY, S. (2009): Investigations into suspected white-nose syndrome in two bat species in Somerset. Veterinary Record (2009), Oktober 17, 481-482.
- BLEHERT, D. S., HICKS, A. C., BEHR, M., METEYER, C. U., BERLowski-ZIER, B. M., BUCKLES, E. L., COLE-

- MAN, J. T. H., DARLING, S. R., GARGAS, A., NIVER, R., OKONIEWSKI, J. C., RUDD, R. J., & STONE, W. B. (2009): Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? *Science*, Vol. **323**, 227.
- CHATURVEDI, V., SPRINGER, D. J., BEHR, M. J., RAMANI, R., LI, X.-J., PECK, M. K., REN, P., BOPP, D. J., WOOD, B., SAMSONOFF, W. A., BUTCHKOSKI, C. M., HICKS, A. C., STONE, W. B., RUDD, R. J., & CHATURVEDI, S. (2010): Morphological and Molecular Characterizations of Psychrophilic Fungus *Geomyces destructans* from New York Bats with White Nose Syndrome (WNS). *PLoS ONE*, Vol. 5, Issue 5, 1-12.
- CRYAN, P. M., UPHOFF METEYER, C., BOYLES, J. G., & BLEHERT, D. S. (2010): Wing pathology of white-nose syndrome in bats suggests life-threatening disruption of physiology. *BMC Biology* (2010), Vol. **8**, Issue 135, 1-8.
- KRÜGER, L. (2008): Interaktion zwischen vergesellschafteten Bodenmikroorganismen *Pseudomonas* sp. PAZ1 und *Phytophthora alni* AL5 sowie Wirkung deren sekundären Metaboliten auf Erlenjungpflanzen. Dipl.-Arb., Inst. F. Ökologie, Techn. Univ. Berlin.
- LORCH, J. M., UPHOFF METEYER, C. U., BEHR, M. J., BOYLES, J. G., CRYAN, P. M., HICKS, A. C., BALLMANN, A. E., COLEMAN, J. T. H., REDELL, D. N., REEDER, D. M., & BLEHERT, D. S. (2011): Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature* **480**, 376-378.
- MARTINKOVÁ, N., BAČKOR, P., BARTONIČKA, T., BLAŽKOVA, P., ČERVENÝ, J., FALTEISEK, J., GAISLER, J., HANZAL, V., HORÁČEK, D., HUBÁLEK, Z., JAHELKOVÁ, H., KOLÁŘÍK, M., KORYTÁR, L., KUBÁTOVÁ, A., LEHOTSKÁ, B., LEHOTSKÝ, R., LUČAN, R. K., MÁJEK, O., MATĚJŮ, J., ŘEHÁK, Z., ŠAFÁR, J., TAJEK, P., TKADLEC, E., UHRIN, M., WAGNER, L., WEINFURTOVÁ, D., ZIMA, J., ZUKAL J., & HORÁČEK, I. (2010): Increasing Incidence of *Geomyces destructans* Fungus in Bats from the Czech Republic and Slovakia. *PLoS ONE*, Vol. **5**, Issue 11, 1-7. URL: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013853> (letzter Abruf: 25.08.2012).
- PHAM, T. L. H., KRÜGER, L., HUYNH, T. D., ZASPEL, I., HENTSCHEL, S., & WEISSHOFF, H. (2008): Metabolites produced by *Pseudomonas veronii*-like bacteria associated with pathogenic *Phytophthora* species, Tagungsband zur VAAM-/GBM-Jahrestagung (2008), Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM, Hrsg.), Biospektrum (2008), 154.
- , KRÜGER, L., ZASPEL, I., KRAUSE, K., HENTSCHEL, S., WEISSHOFF, H. & MÜGGE, C. (2009): Identification of novel cyclic lipopeptideptides from *Pseudomonas* bacteria associated with pathogenic *Phytophthora alni* species". Proceedings of the **18th** International Mass Spectrometry Conference, 80.
- , WEISSHOFF, H., MÜGGE, C., KRAUSE, E., ROTARD, W., PREISS, A. & ZASPEL, I. (2010): Non-Target-Analytik in der Ökologie. Mitt. Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jhrg. 16/2010/Nr.1, Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der Ges. Dt. Chemiker (Hrsg.), 2-8.
- , & ZASPEL, I. (2011): Effect of associated *Pseudomonas* bacteria and their secondary metabolites on the resistance of black alder against pathogenic *Phytophthora alni*. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung (2011), Vereinigung f. Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM, Hrsg.), Biospektrum (2011), 249.
- WARNECKE, L., TURNER, J.M., BOLLINGER, T. K., LORCH, J. M., MISRA, V., CRYAN, P. M., WIBBELT, G., BLEHERT, D. S., & WILLIS, C. K. R. (2012): Inoculation of bats with European *Geomyces destructans* supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sciences* (2012), 1-5.
- WIBBELT, G., KURTH, A., HELLMANN, D., WEISHAAR, M., BARLOW, A., VEITH, M., PRÜGER, J., GÖRFÖL, T., GROSCHE, L., BONTADINA, F., ZÖPHEL, U., SEIDL, H.-P., CRYAN, P. M., & BLEHERT, D. S. (2010): White-Nose Syndrome Fungus (*Geomyces destructans*) in Bats, Europe. *Emerging Infectious Diseases* (2010), Vol. **16**, Nr. 8, 1237-1242. ULR: <http://edoc.rki.de/oa/articeles/reOrlQ7Rr93E/PDF/28obBIBxh7bhxu7bE.pdf> (letzter Abruf: 25.08.2012).
- PUECHMAILLE, S. J., WIBBELT, G., KORN, V., FULLER, H., FORGET, F., MÜHLDOERFER, K., KURTH, A., BOGDANOWICZ, W., BOREL, C., BOSCH, T., CHEREZY, T., DREBET, M., GÖRFÖL, T., HAARMSMA, A.-J., HERHAUS, F., HALLART, G., HAMMER, M., JUNGMANN, C., LE BRIS, Y., LUTSAR, L., MASING, M., MULKENS, B., PASSIOR, K., STARRACH, M., WOJTAZIEWSKI, A., ZÖPHEL, U., & TEELING, E. C. (2011): Pan-European Distribution of White-Nose Syndrome Fungus (*Geomyces destructans*) Not Associated with Mass Mortality. *PLoS ONE* (2011), Vol. **6**, Issue 4, 1-11. URL:<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0019167> (letzter Abruf: 25.09.2012).

MARKUS FRITZE, Sekr. BH 9-2, Institut für Ökologie, Technische Universität Berlin, Ernst-Reuter-Platz 1, D-10587 Berlin; E-Mail: [marcus\\_fritze@gmx.de](mailto:marcus_fritze@gmx.de)

THI LAM HUONG PHAM, Sekr. BH 9-2, Institut für Ökologie, Technische Universität Berlin, Ernst-Reuter-Platz 1, D-10587 Berlin; E-Mail: [lamhuong.pham@tu-berlin.de](mailto:lamhuong.pham@tu-berlin.de)

IRMTRAUT ZASPEL, Thünen-Institut für Forstgenetik, Eberswalder Chaussee 3A, D-15377 Waldsiedersdorf; E-Mail: [irmtraut.zaspel@ti.bund.de](mailto:irmtraut.zaspel@ti.bund.de)