

Diplomarbeit

**Untersuchungsmethoden für humanpathogene
Pilze der Scedosporium/Pseudallescheria-
Artengruppe**

eingereicht von

Anne Heinrich

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Ing. Mag. Dr.rer.nat. Walter Buzina

Graz, 28.04.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 28.04.2015

Anne Heinrich eh.

Danksagungen

Mein größter Dank gilt Prof. Walter Buzina für die Betreuung dieser Diplomarbeit. Mit seiner unermüdlichen Geduld motivierte er mich immer wieder aufs Neue, diese Arbeit voran zu treiben, auch wenn unerwartete Probleme auftauchten. Mein weiterer Dank gilt Bettina Kölli für die Einschulung in die Laborarbeit sowie für ihre Unterstützung während der Versuche im Labor.

Auch möchte ich mich bei den Instituten, welche diese Diplomarbeit unterstützen, bedanken. Zum einen danke ich dem Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz für die Bereitstellung der Pflanzenextrakte. Zum anderen möchte ich mich bei Prof. Erich Leitner vom Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Graz für die Durchführung der Gaschromatografie und die Einschulung in die Auswertung der Gaschromatogramme bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während meines Studiums bedanken. Meine Eltern hatten immer ein offenes Ohr für meine Probleme und halfen mir in schwierigen Zeiten mit ihren zielführenden Hinweisen.

Zusammenfassung

Einleitung: Die *Pseudallescheria/Scedosporium*-Artengruppe gehört zu den Schimmelpilzen bzw. Ascomyceta. Diese fakultativ pathogenen Umweltpilze verursachen ein breites Spektrum von Erkrankungen wie zum Beispiel den Madurafuß, Hirnabszesse bei Beinahe-Ertrunkenen, eine chronische Kolonisation bei CF-Patienten oder schwere invasive Systemmykosen. Aufgrund ihrer schweren Behandelbarkeit mit den zurzeit verfügbaren Antimykotika zählen sie zu den „emerging pathogens“.

Material und Methoden: Für dieses Projekt stellte das CBS folgende Pilzstämme und Pilzarten zur Verfügung: *Scedosporium aurantiacum* (4 Stämme), *S. apiospermum*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, *P. angusta* und *P. boydii* (2 Stämme). Auf der Suche nach neuen verbesserten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten wurden diese Schimmelpilze untersucht. Als erstes Experiment wurde die Identifikation des Metabolitenprofils bzw. eines Biomarkers mittels GC-MS erprobt. Des Weiteren wurde die Empfindlichkeit der Pilze gegenüber den Substanzen Resveratrol, Salizylsäure, Juglon, Emodin, Quercetin, 2-Methoxy-1,4-naphtochinon und Physcion getestet. Mit Hilfe des Modellorganismus *Galleria mellonella* wurde die Pathogenität der Pilzstämme bestimmt.

Ergebnisse: Als flüchtige Metaboliten der *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe wurden 25 Verbindungen identifiziert. Die Substanzen Salizylsäure, Juglon und 2-Methoxy-1,4-naphtochinon inhibierten das Wachstum bei Konzentrationen zwischen 1 und 0,001 mg/ml, bei allen anderen Substanzen konnte keine Inhibierung erreicht werden. Im Versuch zeigte sich, dass die Larven von *Galleria mellonella* nach einer artifiziellen Infektion mit *P. angusta* am schnellsten und durch *P. boydii* am langsamsten verstarben.

Diskussion: Das Metabolitenprofil konnte ermittelt werden und es deutete sich an, dass die Unterscheidung der Arten mittels Metabolitenprofil zielführender war als die Suche nach einem artspezifischen Biomarker. Die Extrakte aus den Neophyten konnten das Pilzwachstum nicht in einem befriedigend Ausmaß hemmen. Es empfiehlt sich, andere Substanzen auf ihre wachstumshemmende Wirkung zu untersuchen. Die unterschiedliche Pathogenität der Artengruppe wurde nachgewiesen, aber aufgrund der Diskrepanzen der Ergebnisse und der Unsicherheit, was die Todesursache der Raupen war, ist eine Wiederholung des Experimentes unter einem erweiterten Protokoll sinnvoll.

Abstract

Introduction: The *Pseudallescheria/Scedosporium* species complex belongs to the clade of ascomycete or sac fungi. These ubiquitous environmental microbes can cause a wide range of disease, e.g. the Madura foot, brain abscess after a near drowning event and disseminated mycotic infections of immunosuppressed patients. Patients with cystic fibrosis often show chronical colonization of *Scedosporium*. Treatment possibilities are very rare due to the therapy refractory character of this fungi. Therefore they are part of the so called “emerging pathogens”.

Material and Methods: The CBS provided the following species of the *Scedosporium*-complex for this research: *Pseudallescheria angusta*, *P. boydii* (2 strains), *Scedosporium apiospermum*, *P. ellipsoidea* and *S. aurantiacum* (4 strains). Those nine strains were analysed with three novel methods to find better ways for diagnosis and treatment of infections. First of all we tried to detect volatile metabolites using the means of gas chromatography in combination with a mass spectroscopy. The second method tested compounds (resveratrol, emodin, quercetin, physcion, 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, juglon, salicylic acid) of neophytes and other plants for their antimycotic activities. The last trail included the investigation of the virulence of the different strains using an animal model. We choose the larvae of the great wax moth *Galleria mellonella* as suitable model.

Results: It was possible to detect 25 potentially volatile metabolites of the *Scedosporium* species. Salicylic acid, Juglon and 2-methoxy-1,4-naphthoquinone showed a MIC which ranged from 1 to 0.001 mg/mL. All other tested compounds were not able to inhibit fungal growth at all concentrations tested. The data of the animal testing demonstrated that larvae with an infection of *P. angusta* died first and *P. boydii*. lived longest.

Conclusion: The metabolite profile was identified and it is very likely that the distinction of species by means of metabolite profile is more effective than the search for species-specific biomarkers. The fungicidal effects of the extracts from the neophytes tested were rather low and not convincing. We suggest to investigate other compounds. We have been able to prove the different virulence of the species group. Yet two other problems occurred: we had matters with the reproducibility of the results and the actual cause of death. The repetition of the trial with the animal model with an extended protocol seems absolutely essential.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN.....	II
ZUSAMMENFASSUNG.....	III
ABSTRACT.....	IV
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Pilze.....	1
1.1.1 Biologie der Pilze.....	1
1.1.2 Klassifikationen.....	2
1.1.3 Medizinische Bedeutung.....	3
1.2 <i>Scedosporium/Pseudallescheria</i>-Artengruppe.....	4
1.2.1 Die Artengruppe.....	4
1.2.2 Erkrankungen.....	5
1.2.3 Diagnostik und Therapie.....	5
1.3 Volatile Organic Compounds.....	6
1.4 Pflanzenextrakte von Neophyten.....	7
1.5 Der Modellorganismus <i>Galleria mellonella</i>.....	9
1.6 Anliegen der Studie.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 Pilze.....	12

2.1.1	Herkunft	12
2.1.2	Anzucht der Kulturen	13
2.2	Untersuchung der VOC von <i>Scedosporium/Pseudallescheria</i>-Artengruppe.....	13
2.2.1	Material	13
2.2.2	Methoden.....	13
2.3	Untersuchung von Extrakten aus Neophyten.....	16
2.3.1	Material	16
2.3.2	Methoden.....	16
2.4	<i>Galleria mellonella</i> Modell	17
2.4.1	Material	17
2.4.2	Methoden.....	18
3	ERGEBNISSE.....	21
3.1	Untersuchung der MVOC von <i>Scedosporium/Pseudallescheria</i>-Artengruppe	21
3.1.1	Allgemeine Ergebnisse	21
3.1.2	Auswertung der Chromatogramme der einzelnen Arten.....	23
3.1.3	Nachschlagen der MVOC in der Datenbank der Charité	26
3.2	Untersuchung der antimykotischen Eigenschaften von Extrakten aus Neophyten.....	26
3.2.1	Ergebnisse der Testsubstanzen	27
3.2.2	Ergebnisse der Etests	28
3.3	<i>Galleria mellonella</i> Modell	29
3.3.1	Allgemeine Beobachtungen	29
3.3.2	Überblick <i>Galleria mellonella</i> Modell	29
3.3.3	Auswertung der einzelnen Stämme	30
3.3.4	Ergebnisse der Kontrollgruppen.....	33
3.3.5	Kontaminationskontrolle.....	34
4	DISKUSSION	35
4.1	Diskussion der MVOC von <i>Scedosporium/Pseudallescheria</i>-Artengruppe.....	35
4.1.1	Interpretation des Versuches	35
4.1.2	Schwachpunkte des Versuches	37
4.1.3	Schlussfolgerung aus dem Versuch	38
4.2	Diskussion der antimykotischen Eigenschaften von Extrakten aus Neophyten	38

4.2.1	Interpretation des Versuches	38
4.2.2	Schwachpunkte des Versuches	41
4.2.3	Schlussfolgerung aus dem Versuch	42
4.3	Diskussion des Versuches mit <i>Galleria mellonella</i>	42
4.3.1	Interpretation des Versuches	42
4.3.2	Schwachpunkte des Versuches	44
4.3.3	Schlussfolgerungen aus dem Versuch	45
4.4	Zusammenfassende Schlussfolgerungen aus den drei Versuchen	46
	LITERATURVERZEICHNIS	47

Glossar und Abkürzungen

CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
C.	<i>Candida</i>
CF	Cystische Fibrose
DHS-Klassifikation	Dermatopyhten-Hefen-Schimmelpilz-Klassifikation
ECMM	Europoean Conferdertion of Medical Mycology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EUCAST	Europoan Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<i>F.</i>	<i>Fallopia</i>
<i>G.</i>	<i>Galleria</i>
GC-MS	Gaschromatografie-Massenspektroskopie
H ₂ O	Wasser
IPS-Puffer	Insect physiological Saline Puffer
ISHAM	International Society for Human and Animal Mycology
KCl	Kaliumchlorid
MEA	Malzextraktagar
MIC	Minimal Inhibition Concentration (dt. Minimale Hemmkonzentration)
MVOC	Microbial Volatile Organic Compounds (flüchtige organische Verbindungen von Mikroorganismen)
NaCl	Natriumchlorid
NCCLS	National Committee of Clinical Laboratory Standards
<i>P.</i>	<i>Pseudallescheria</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii/ Konzentration der Oxoniumionen
RPMI	Zellkulturmedium, welches am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
<i>S.</i>	<i>Scedosporium</i>

SAB	Sabouraud-Dextrose-Agar
SecSel II	Scedosporium selektiv Agar II
SecSel+	Scedosporium selektiv Agar
TRIS HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
VOC	Volatile organic compounds (dt. flüchtige organische Substanzen)
Wiley7Nist05 Bibliothek	Datenbank für Massenspektren erstellt durch das National Institutes of Standards and Technology

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schrägagarschraubflaschen	14
Abbildung 2: Hämozol einer <i>Galleria mellonella</i>	19
Abbildung 3: Injektion der Keimsuspension in den Modellorganismus	19
Abbildung 4: Chromatogramm von <i>S. apiospermum</i> CBS 117410.....	23
Abbildung 5: Chromatogramm von <i>S. aurantiacum</i> CBS 136046.....	23
Abbildung 6: Chromatogramm von <i>P. ellipsoidea</i> CBS 301.79	24
Abbildung 7: Chromatogramm von <i>P. boydii</i> CBS 117432.....	24
Abbildung 8: Chromatogramm von <i>P. angusta</i> CBS 254.72	25
Abbildung 9: Chromatogramm des Nährmediums mit SAB.....	25
Abbildung 10: Microtiterplatte von Salizylsäure	27
Abbildung 11: Sterbekurve der gesamten Versuchsreihe	30
Abbildung 13: Sterbekurve von <i>P. angusta</i> CBS 254.72	30
Abbildung 14: Sterbekurve von <i>P. boydii</i> CBS 120157 und CBS 120157	31
Abbildung 15: Sterbekurve von <i>P. ellipsoidea</i> CBS 301.79.....	31
Abbildung 16: Sterbekurve von <i>S. apiospermum</i> CBS 117410	32
Abbildung 17: Sterbekurve der gesamten <i>S. aurantiacum</i> Proben.....	33
Abbildung 18: Sterbekurve der zwei Kontrollgruppen.....	34
Abbildung 19: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herkunft und erstmalige Beschreibung der verwendeten Proben.....	12
Tabelle 2: Parameter der GC-MS.....	15
Tabelle 3: Übersicht aller gefundenen VOC im Experiment	22
Tabelle 4: Ergebnis der Recherche der gefunden MVOC	26
Tabelle 5: Ergebnisse der MIC der Testsubstanzen und Etests.....	28
Tabelle 6: Richtlinien zur Resistenzevaluation aus dem Atlas of Clinical Fungi ...	39
Tabelle 7: Zusammenfassung der Literaturrecherche	40
Tabelle 8: Vergleich der eigenen Daten mit der Literatur	41
Tabelle 9: Vergleich der eigenen Daten mit einer anderen Arbeitsgruppe	44

1 Einleitung

1.1 Pilze

Pilze bilden ein eigenständiges Reich der höheren Lebewesen (Eukaryoten) und sind phylogenetisch mit den Tieren näher verwandt als mit den Pflanzen. Derzeit sind über 600.000 Pilzarten bekannt. [Mora et al. 2011] Die Besonderheit der Pilze ist, dass sie eine große Varietät bezogen auf Form, Fortpflanzungsmodus und metabolische Prozesse zeigen. [Wöstemeyer 2009]

1.1.1 Biologie der Pilze

Pilzzellen sind gekennzeichnet durch einen Zellkern, Chromosomen, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Ribosomen. Im Gegensatz zu den autotrophen Pflanzen besitzen sie kein Chlorophyll für die Photosynthese und sind daher auf exogene Ernährungsquellen angewiesen. [Seebacher et al. 1990]

Pilze wachsen entweder in Form von Sprosspilzen (Hefepilze), in Form eines Pseudomyzels (lose Sprossenkette) oder als Hyphen (fadenartiges Gebilde mit oder ohne Kompartimente). Ihre Zellwände bestehen aus Polysacchariden, Glykosacchariden, Proteinen und Chitin. Es gibt dimorphe Pilze, welche sich je nach Temperatur als Hefe oder myzelbildende Pilze differenzieren. [Fuchs et al. 2014]

Pilze zählen zu den Aerobiern und ernähren sich heterotroph. Die Stoffwechselprozesse der Pilze sind sehr vielschichtig. Daraus erklärt sich ihre Anwendung in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie. [Buselmaier 2012]

Viele Pilze besitzen die Fähigkeit, Enzyme zu sezernieren. Sie spalten hochkomplexe Stoffe wie Cellulose oder Lignin. Damit tragen Pilze erheblich zur Umsetzung der Biomasse bei. [Munk und Dersch 2008]

Jahrzehntelang galt die Art der Fortpflanzung als Einteilungskriterium der Pilze, wobei diese in eine sexuelle sowie asexuelle Gruppe unterteilt wurden. Bei der sexuellen Fortpflanzung (Teleomorph) kommt es zur Fusion von zwei haploiden Zellkernen, wodurch eine diploide Zygote entsteht. Nach dem Ablaufen einer Meiose entsteht eine haploide sexuelle Spore, welche zur Ausbreitung dient. Die

asexuelle Vermehrung (Anamorph) kann auf zwei Wegen ablaufen. Bei Hefen kommt es zur Zellsprossung und Zellwandausstülpung, bis sich die Tochterzelle abschnürt. Bei Fadenpilzen entstehen rein klonale asexuelle Sporen. [Campbell und Reece 2011]

Je nach Pilzgattung unterscheidet sich die Morphologie in den zwei Fortpflanzungsstadien massiv voneinander. Deshalb war es bisher sehr häufig der Fall, dass die teleomorphe Form eines Pilzes nicht wie seine anamorphe Form benannt ist, sondern als eine andere eigenständige Art betrachtet wurde. Derzeit wird jedoch ein neues Nomenklatorsystem ausgearbeitet, welches unter der Maxime „One Fungus One Name“ steht. [Hawksworth et al. 2011]

Es gibt eine Reihe von Pilzen, bei denen kein sexuelles Stadium bekannt ist. Diese bezeichnet man als Anamorphen und auch als *fungi imperfecti*. [Hof et al. 2014]

1.1.2 Klassifikationen

Die Kriterien, anhand derer die Klassifikationen vorgenommen werden, sind die medizinischen Aspekte, der Fortpflanzungsmodus beziehungsweise die Erkenntnisse aus phylogenetischen DNA-basierten Untersuchungen.

Die DHS-Klassifikation gliedert die Pilze in vier Kategorien: Dermatophyten, Hefen, Schimmelpilze und dimorphe Pilze. Dermatophyten bilden Hyphen und manifestieren sich typischerweise an Haut und Hautanhangsgebilden. Hefen zeichnen sich durch die Vermehrung durch Sprossung aus. Die Gruppe der Schimmelpilze fasst alle Pilze zusammen, welche ein watteartiges koloriertes oder weißes Myzel aufweisen.

Früher zählte man die Pilze zu den Pflanzen. Deshalb orientierte sich die Klassifikation, wie allgemein in der Botanik üblich, an der Art der Reproduktion. Diese teilt die Pilze in Anamorphe (asexuelle) und Teleomorphe (sich sexuell fortpflanzende Pilze) ein. Diese Einteilung bestimmte auch die Nomenklatur der Pilze. [Seebacher et al. 1990]

Im Zuge der molekularbiologischen Entwicklungen zeigte sich jedoch, dass diese Einteilung nicht mehr korrekt ist, da Pilze mit Tieren näher verwandt sind als mit Pflanzen. Es wurde lange Zeit angenommen, dass *Trichophyton mentagrophytes*

und *Arthroderma benhamiae* zwei verschiedene Arten seien. PCR-Analysen zeigten aber, dass diese genetisch völlig identisch sind und es sich lediglich um die anamorphe und teleomorphe Form handelt. Dies ist nur einer von vielen Fällen, bei denen die teleomorphe Form der Pilzgattung einen anderen Namen trägt als ihre anamorphe. [Taylor 2011] Seit Jahren diskutieren führende Mykologen, welche Namen in der Nomenklatur zu verwenden seien. [Hawksworth et al. 2011]

Die biologische Einteilung auf Grundlage phylogenetischer Untersuchungen sieht folgende fünf Klassen vor: Basidiomyceta (Ständerpilze), Ascomyceta (Schlauchpilze), Zygomyceta (Jochpilze), Glomeromyceta (arbuskuläre Mykorrhizapilze) und Chytridiomyceta (Töpfchenpilze). [Fuchs et al. 2014]

1.1.3 Medizinische Bedeutung

Nur ein kleiner Teil der bekannten Pilzarten ist humanpathogen. Man spricht je nach Literaturquelle von 100 bis 300 Arten. [de Hoog 2011] Die Anzahl der Pilzinfektionen, insbesondere der invasiven Mykosen, ist aktuell zunehmend. Als Ursachen dafür werden unter anderem die steigende Anzahl der Immunsupprimierten, häufiger Antibiotikagebrauch, zytostatische Therapien bei Malignomen oder der Anstieg der Prothesenimplantation genannt. Deshalb werden viele Pilze auch als opportunistische Erreger bezeichnet. In den vergangenen Jahren änderte sich das Erregerspektrum bei invasiven Mykosen. Früher galt *Candida albicans* als Haupterreger, jetzt nehmen Infektion mit *Fusarien*, *Aspergillus*-Arten und *Zygomyceten* zu. [Lass-Flörl 2009]

Trotzdem findet man auch bei immunkompetenten Patienten Pilzinfektionen, welche aber meist lokal beschränkt sind. Dazu zählen viele Pilze der Dermatophyten-Gruppe (zum Beispiel *Trichophyton rubrum*), die Fuß- und Nagelpilz hervorrufen. Bekannt sind auch allergische und toxische Reaktionen auf eingeatmete oder verzehrte Pilzbestandteile. Gefürchtet werden Pilze, die Toxine produzieren wie beispielsweise das Aflatoxin des *Aspergillus flavus*. Seine gebildeten Toxine gelten als kanzerogen und verursachen hepato-zelluläre Karzinome. [Suerbaum und Hahn 2012, Kew 2013]

1.2 *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe

1.2.1 Die Artengruppe

Die Artengruppe *Scedosporium/Pseudallescheria* wird den Schlauchpilzen (Ascomyceta) beziehungsweise in der DHS-Klassifikation den Schimmelpilzen zugeordnet und kann eine Vielzahl von Erkrankungen verursachen. Allgemein gilt, dass *Scedosporium*-Arten das anamorphe Äquivalent zu *Pseudallescheria* darstellen. [Neumeister et al. 2009]

Die Artengruppe *Scedosporium/Pseudallescheria* hatte in der Vergangenheit bereits einige Namensänderungen erfahren. [Buzina et al. 2006] Gegenwärtig breit anerkannt sind die von Gilgado und Mitarbeitern publizierten Arten: *P. boydii*, *P. ellipsoidea*, *P. angusta*, *P. fusioidea*, *S. apiospermum*, *S. dehoogii*, *P. minutispora*, *S. aurantiacum* sowie *S. prolificans*. [Gilgado et al. 2008] Letztere Art hebt sich deutlich phylogenetisch als auch in ihrem Resistenzverhalten von den anderen ab. Aus diesem Grunde und auch als Konsequenz auf die Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature [Hawksworth et al. 2011] beziehungsweise auf den International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code) [McNeill 2012], wonach nach dem Prinzip „One Fungus One Name“ anamorphe und teleomorphe Formen nur mehr einen (gemeinsamen) Namen haben sollen, wird eine Abspaltung von *S. prolificans* als *Lomentospora prolificans* sowie der Ersatz von *Pseudallescheria* durch *Scedosporium* für alle Arten dieser Gruppe diskutiert. [Lackner et al. 2015]

Bei der In-vitro-Kultivierung zeigen die *Scedosporium*-Arten ein zuerst weißes watteartiges Myzel, welches sich nach einiger Zeit grau bis braun verfärbt. [Darai 2012]

Mikroskopische Charakteristika sind die hyalinen Hyphen mit einzelligen runden bis ovalen Konidien, die an der Spitze verlängerter Konidiophoren gebildet werden. [Neumeister et al. 2009]

Ein Reservoir für *Scedosporium*-Arten stellen stehende Gewässer, der Erdboden und Tierkot dar. Deshalb werden sie auch als Umweltpathogene bezeichnet. [de Hoog 2011]

1.2.2 Erkrankungen

Die Stämme *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* und *S. prolificans* werden als humanpathogen angesehen.

Wohl am längsten bekannt ist das Krankheitsbild des Madurafußes, welches nach einer traumatischen Inokulation mit *S. apiospermum* entsteht. *Scedosporium*-Arten können auch Auslöser von Augen-, Nasennebenhöhlen- und Lungeninfektionen sein [Cortez et al. 2008]. Bei immunsupprimierten Patienten kann sich durch eine disseminierte Infektion unter anderem eine septische Arthritis oder Osteomyelitis entwickeln. [Issakainen et al. 2010]

Bei Beinahe-Ertrunkenen manifestieren sich die neurotrophen Pilze nach einigen Wochen in Form von multiplen zerebralen Abszessen und führen zu einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf. [Buzina et al. 2006]

Patienten mit zystischer Fibrose neigen zur chronischen Besiedlung mit Pilzen, wobei *Scedosporium*-Arten dabei sehr häufig sind. [Masoud-Landgraf et al. 2014] Dies stellt ein Problem dar, wenn sich die Erkrankung im Endstadium befindet. Das Mittel der Wahl wäre eine Lungentransplantation, welche aber aufgrund der Pilzkolonisation kontraindiziert ist. [Cimon et al. 2000]

Es lässt sich zusammenfassen, dass *Scedosporium*-Arten zu den „emerging pathogens“ gezählt werden. Infektionen sind zwar nicht häufig, betreffen aber zum größten Teil immuninkompetente Patienten. Ist die Infektion erst einmal ausgebrochen, gibt es aufgrund der ausgeprägten Resistenzlage keine allzu großen therapeutischen Möglichkeiten. [Kaban 2008]

1.2.3 Diagnostik und Therapie

Um eine Diagnose zu stellen, wird zuerst geeignetes Material für die Untersuchung gewonnen. Bei Verdacht auf eine *Scedosporium*-Infektion bei einem Hirnabszess ist es notwendig, dass man geeignetes Probematerial direkt von der infizierten Stelle gewinnt. Anders als bei Bakterien kann man die Pilze nicht im Liquor diagnostizieren. Proben, welche durch eine Broncho-alveoläre Lavage gewonnen werden, oder die Untersuchung des Bronchial- oder Trachealsekrets und des Sputums eignen sich zur Identifikation von pulmonalen *Scedosporium*-Infektionen. Es soll darauf geachtet werden, dass es nicht zu einer

Kontamination mit Erregern der oberen Atemwege kommt. [Neumeister et al. 2009]

Für die Diagnostik ist es notwendig, dass man selektive Nährmedien wie SceSel+ oder SceSel II verwendet, um eine Kontamination durch z.B. *Aspergillus*-Arten zu vermeiden. Im Routinebetrieb findet die Diagnostik nur bis zur Identifikation der Artenebene statt. Für phylogenetische Untersuchungen verwendet man molekularbiologische Untersuchungsmethoden. [Horre et al. 2009]

Die Testung von antimykotischen Substanzen aus der Gruppe der Azole und Echinocandine zeigt, dass viele Antimykotika keine effektive Wirkung besitzen. Am besten inhibiert Voriconazol das Pilzwachstum. Micafungin und Posaconazol besitzen eine mäßige Wirksamkeit bei den meisten *Scedosporien*-Stämmen. Aktuell wird entweder eine Monotherapie mit Voriconazol oder eine Kombinationstherapie von Voriconazol mit Micafungin beziehungsweise Posaconazol mit Micafungin favorisiert. *S. prolificans* wird als multiresistenter Stamm eingestuft. [Lackner et al. 2012]

1.3 Volatile Organic Compounds

Jeder Organismus sondert bestimmte flüchtige organische Verbindungen aus Stoffwechselprozessen ab, welche man teilweise als charakteristischen Geruch wahrnehmen kann. Als Beispiele können Schimmelkäse aber auch der modrige Geruch von Kellern mit Schimmelpilzbefall genannt werden. [Kai et al. 2009] Der Geruch von Mikroorganismen wird aus einer komplexen Zusammenstellung von flüchtigen organischen Verbindungen gebildet. [Dunkel et al. 2009] Aus chemischer Sicht sind VOC flüchtige organische Substanzen mit einer geringen molekularen Masse (unter 300 g/mol), einem hohen Dampfdruck und niedrigem Siedepunkt. [Piechulla und Degenhardt 2014]

Forschungsarbeiten zeigen, dass VOC für eine Vielzahl von biologischen Prozessen verantwortlich sind, wie zum Beispiel für die Kommunikation von Pilzen und Bakterien.

Um das Metabolitenprofil eines Organismus zu untersuchen, wird entweder das Material eines kultivierten Organismus oder die von ihm produzierte Gasphase

verwendet. Der Goldstandard dafür ist die Gas-Chromatografie gekoppelt mit einer Massenspektroskopie (GC-MS). Die Probe wird zuerst gaschromatografisch aufgetrennt. Im Anschluss werden die sich in der Probe befindlichen Stoffe durch eine Massenspektroskopie analysiert. Das am Ende erhaltene Chromatogramm zeigt alle in der Probe detektierten Verbindungen. Weitere sehr häufig angewendeten Methoden sind die ion-flow tube mass spectrometry, ion-molecule reaction mass spectrometry und electronic nose. [Shestivska et al. 2002]

Aktuelle Forschungen befassen sich mit der Untersuchung mikrobieller VOC. Sowohl bei den Bakterien als auch bei den Pilzen gibt es vielversprechende Erkenntnisse. So zeigen Studien, dass es möglich ist, mit dieser Methode verdorbene Lebensmittel zu identifizieren [Sberveglieri et al. 2014] und den Schimmelpilzbefall in Trockenbauwänden [Betancourt et al. 2013] zu entdecken. Das Prinzip besteht darin, dass anhand des Metabolitenprofils ein Biomarker identifiziert wird, der eindeutig auf das Vorhandensein eines spezifischen Keimes hinweist. In der medizinischen Forschung wird aktuell versucht diese Methode zu verfeinern, sodass sie im klinischen Alltag Verwendung finden kann. Es ist möglich, VOC mit geeigneten Methoden in der Atemluft, im Urin oder im Stuhl zu bestimmen. Ziel dieser neuen Methode ist es, dass schneller und einfacher erkannt werden kann, ob ein Patient mit einem bestimmten Mikroorganismus infiziert ist und ob somit eine therapeutische Intervention erforderlich ist. [Sethi et al. 2013] Momentan dauert es zwei bis vier Tage, bis man bei einem Verdacht auf eine Pneumonie den Kulturnachweis und das Antibioogramm erhält. Eine Vision ist, dass mittels dieser Methode schon nach 24 Stunden der Keim identifiziert werden kann und so schneller eine optimale Target-Therapie eingeleitet werden kann. [Junger 2012]

Seit 2014 existiert eine kontinuierlich wachsende Datenbank für VOC. Doch aktuell gibt es noch keine Information zu VOC der *Scedosporium*-Arten. [Lemfack et al. 2014]

1.4 Pflanzenextrakte von Neophyten

Als Neophyten bezeichnet man Pflanzen, welche in den letzten Jahrhunderten nach Europa eingeschleppt wurden und hier zuvor nicht heimisch waren.

Diese können sich teilweise aufgrund von fehlenden Feinden enorm schnell verbreiten und die einheimischen Gewächse verdrängen. Häufig werden sie als Schädlinge bewertet, doch eventuell stellen sie eine potentielle Quelle für medizinisch wirksame Pflanzenextrakte dar. [Purves et al. 2011]

Zu den Neophyten zählt *Fallopia japonica*, welche auch unter dem Namen japanischer Staudenknöterich bekannt ist und bevorzugt in der Nähe von Flüssen wächst. Schon seit Jahrtausenden werden die getrockneten Wurzeln dieser Pflanze in der Traditionellen Chinesischen Medizin bei Erkältungen oder bei der Behandlung von Schlangenbissen verwendet. [Zhang 2013] Extrakte dieser Pflanze wurden auf ihre pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Es wurde gezeigt, dass *F. japonica*-Extrakte sowohl antivirale als auch antibakterielle Wirkung zeigen. [Peng et al. 2013] Pandit bewies in einer Studie, dass eine Mundspülung aus diesem Pflanzenextrakt vor dem kariesverursachenden *Streptococcus mutans* schützt. [Pandit et al. 2012] Die antimykotische Wirksamkeit besteht gegenüber *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Fonsecaea pedrosoi* und *Candida albicans*. [Peng et al. 2013]

Aus dieser Pflanze können eine Vielzahl von organischen Verbindungen wie Resveratrol, Quercetin, Emodin und Physcion gewonnen werden. Ihre wachstumshemmende Wirkung auf Mikroorganismen wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen untersucht.

In keiner Studie konnte bislang bestätigt werden, dass das Antioxidans Resveratrol das Wachstum von diversen *Candida*-Arten negativ beeinflusst. [Collado-Gonzales et al. 2012, Weber et al. 2011]

Über Emodin ist bekannt, dass es bei einer Infektion mit *Escherichia coli* [Ubbink-Kok et al. 1986], Enterovirus 71 und Japan-Enzephalitis-Virus positive Effekte besitzt. [Lin et al. 2008]

Physcion zeichnet sich dadurch aus, dass es wirksam gegen den Pflanzenschädling *Blumeria graminis* (echter Mehltau) ist. [Ma et al. 2010]

Auch über den Bestandteil Quercetin gibt es Erkenntnisse bezüglich seiner inhibitorischen Wirkung auf den Influenza-A-Virus [Fan et al. 2011] und den pflanzenpathogenen Pilz *Magnaporthe oryzae*. [Liu et al. 2010]

Das indische Springkraut (botanischer Name: *Impatiens glandulifera*) ist für seine harntreibende Wirkung und als Brechmittel aus der Naturheilkunde bekannt. Für

die pharmakologischen Eigenschaften wird 2-Methoxy-1,4-naphthochinon verantwortlich gemacht. Dieses wirkt antibakteriell auf *Helicobacter pylori*. [Wang und Lin 2012] Die antimykotischen Effekte konnten für *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum* und *Fusarium oxysporum* nachgewiesen werden. [Yang 2001] Zur Prävention von oralen *Candida*-Infektionen wurde ein Extrakt mit 2-Methoxy-1,4-naphthochinon mit einer Chlorhexidin-Mundspülung verglichen und als gleich effektiv eingestuft. [Sritrairat et al. 2011]

Salizylsäure wird aus der Rinde der Silberweide und aus den Blättern der Moosbeere gewonnen. Sie ist für ihre bakteriostatischen, fungiziden und keratolytischen Eigenschaften bekannt, was durch eine Vielzahl von Studien belegt ist. In einer Vergleichsstudie wurde gezeigt, dass Salizylsäure einen vergleichbaren Effekt wie Nystatin besitzt, wenn es um die Behandlung von oralen *Candida*-Infektionen geht. [Petruzzi et al. 2010] Eine Beschichtung von Harnkathetern mit Salizylsäure soll die Rate der Katheter-assoziierten Harnwegsinfekte reduzieren. [Farber und Wolff 1993]

Aus der unreifen Rinde der Walnuss wird der braune Naturfarbstoff Juglon gewonnen. Seine antikanzerogene, antimikrobielle und lebensmittelkonservierende Wirkung wurde beschrieben. Simonsen et al. fanden heraus, dass Juglon zwar das Wachstum bei *Candida albicans* hemmt, aber dagegen bei *Aspergillus fumigatus* und *Penicillium expansum* keine inhibierenden Wirkungen zu verzeichnen sind. [Simonsen et al. 2006] Gegen einen weiteren Pilz, *Pleurotus sajor-caju*, besteht eine antimykotische Wirksamkeit. [Curreli et al. 2001]

1.5 Der Modellorganismus *Galleria mellonella*

Das Insekt *Galleria mellonella* aus der Familie der Pyralidae wird auch als Große Wachsmotte oder als „honeycomb moth“ bezeichnet, da sie in Bienenstöcken als Parasit wohnt. Eine Wachsmotte lebt zwischen vier und 24 Wochen. [Robinson 2005] Während dieser Zeit durchläuft sie dabei eine Metamorphose mit den Stadien Ei, Larve, Raupe, Verpuppung und Falter. Die Raupe, welche zwischen 23 und 28 mm groß ist, besitzt ein weiß-gräuliches Colorit. [Lewbart 2012] Nach etwa 18 Tagen verpuppt diese sich zum Falter.

Die Larve der Wachsmotte kann verwendet werden, um die Pathogenese von mikrobiellen Infektionen zu erforschen und um pharmakologische Substanzen zu testen. Ausschlaggebende Gründe für die Verwendung dieses Minimodellorganismus sind die einfache Handhabung im Labor, der niedrige Einkaufspreis und auf Grund ihrer Größe eine einfachere Injektion von Sporenmaterial in die Haemozöle. Außerdem findet die Verwendung von Insekten als Versuchstiere mehr Akzeptanz als Versuche mit Wirbeltieren; sie ist zudem nicht genehmigungspflichtig. [Fuchs und Mylonakis 2006, Scully und Bidochka 2006] Speziell für diese Arbeit war es wichtig, dass sowohl die zu untersuchenden Pilze als auch das verwendete Versuchstier das gleiche Temperaturoptimum besitzen, um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen.

Mehrere Studien gelangten zu dem Ergebniss, dass das angeborene Immunsystem von *G. mellonella* eine große Ähnlichkeit mit dem der Säugetiere aufweist, weshalb diese gerne für Studienzwecke herangezogen wird. Die Haemolymph, welche die Haemozöle ausfüllt, übernimmt Aufgaben wie den Transport von Stoffwechselprodukten oder von Signalmolekülen. [Matha und Acek 1984] Das Immunsystem der Motte besteht aus folgenden Zellen: Granulozyten, Plasmazellen, Prohämözyten, Coagulozyten, Sphärozyten und Onozytoide. [Junqueira 2012] Die Hämatozyten werden bei dem Eindringen von Mikroorganismen aktiviert und versuchen, Keime unschädlich zu machen. [Lavine und Strand 2002] Features der humoralen Immunantwort des Insektes sind die Melaninproduktion, Wundheilung, Bildung von antimikrobiellen Peptiden und die Gerinnungsaktivierung durch Hämatozyten. [Kavanagh und Reeves, 2004] Die produzierten Peptide richten sich gegen Komponenten der Zellwände und Membranen der fremden Keime. Durch Versuche ist bekannt, dass eine Modulation des Immunsystems durch Wärme [Mowlds und Kavanagha 2008] oder Nahrungsreduktion [Banville et al. 2012] möglich ist.

Limitierende Faktoren für die Arbeit mit Wachsmotten sind, dass diese kein vollständig sequenziertes Genom aufweisen und dass es keine Möglichkeit gibt, mutierte Stämme zu generieren. Untersuchungen des *Galleria*-Genoms durch Vogel et al. brachten neue Erkenntnisse über stressinduzierte Gene und das grundlegende Verständnis über die Immunantwort von *G. mellonella*. [Vogel et al. 2011]

1.6 Anliegen der Studie

Im Rahmen der ISHAM und ECMM Working Group for *Scedosporium/Pseudallescheria* Infections und Barcoding of Medical Fungi wurden an ausgewählte Labore weltweit neun Pilzstämme aus der Artengruppe *Scedosporium/Pseudallescheria* versandt. Die Aufgabe bestand darin, diese mit unterschiedlichsten Methoden zu untersuchen, um neue Erkenntnisse für Diagnostik und Therapie zu erhalten.

Diese Studie untersucht die Pilzstämme mittels dreier Methoden:

1) Untersuchung der MVOC von *Scedosporium/Pseudallescheria*

Diese Methode verwendet die Detektion von VOC mittels einer Gaschromatografie gekoppelt mit einer Massenspektroskopie in Kooperation mit dem Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Graz. Die entstandenen Chromatogramme werden auf mögliche spezifische Verbindungen analysiert, da es aktuell noch keine Erkenntnisse über die VOC von *Scedosporium*-Arten gibt.

2) Untersuchung von Extrakten aus Neophyten

Aufgrund der aktuell nicht zufriedenstellenden Behandlungsmöglichkeit von *Scedosporium*-Infektionen soll in einem In-vitro-Versuch eine mögliche wachstumshemmende Wirkung der Substanzen Resveratrol, Salizylsäure, Juglon, Emodin, Quercetin, 2-Methoxy-1,4-naphtochinon und Phycion in verschiedenen Konzentrationsstufen geprüft werden. Dies wird im Anschluss mit der Sensitivität der Antimykotika Voriconazol und Posaconazol verglichen.

3) *Galleria mellonella* Modell

Der letzte Teil dieser Versuchsgruppe befasst sich mit einer Pathogenitätsbestimmung der *Scedosporium*-Artengruppe unter Verwendung des Modellorganismus *G. mellonella*. Es soll untersucht werden, ob es Unterschiede bezüglich der Pathogenität der einzelnen Arten gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Pilze

2.1.1 Herkunft

Die Pilzstämme wurden vom niederländischen Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) – Fungal Biodiversity Centre für die Versuche zur Verfügung gestellt (Tabelle 1).

Name der Pilze und Probennummer	Erstmalige Beschreibung	Herkunft der Probe
<i>S. aurantiacum</i> CBS 116910	Gilgado, Cano, Gené und Guarro 2005	Wundsekret eines Ulkus am Knöchel Spanien/ 2004
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136046		menschliche Lunge Australien/ kein Jahr bekannt
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136047		Erde Australien/ kein Jahr bekannt
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136049		Erde vom Spielplatz Österreich/ kein Jahr bekannt
<i>S. apiospermum</i> CBS 117410	Saccardo ex. Castellani und Chalmers 1919	Gartenerde Spanien/ kein Jahr bekannt
<i>P. ellipsoidea</i> CBS 301.79	McGinnis, Padhye und Ajello 1982	Kuhdung Niederlande/ 1979
<i>P. angusta</i> CBS 254.72	McGinnis, Padhye und Ajello 1972	Kläranlage USA/ 1972
<i>P. boydii</i> CBS 120157	McGinnis, Padhye und Ajello 1982	Lunge eines Leukämiepatienten Frankreich/ Jahr nicht bekannt
<i>P. boydii</i> CBS 117432		Sputum eines Patienten mit CF Frankreich/ 1998

Tabelle 1: Herkunft und erstmalige Beschreibung der verwendeten Proben

2.1.2 Anzucht der Kulturen

Die Pilze wurden als bewachsene Schrägagarröhrchen geliefert. Diese wurden auf SAB-Agar (Herkunft bzw. Zusammensetzung siehe unten) und SecSel+-Agar (ein Malzager mit den Zusätzen Ciprofloxacin, Streptomycin, Chloramphenicol, Dichloran und Benomy hergestellt von der Firma Mykon, Österreich) überimpft und im Brutschank bei 35°C inkubiert. Nach dem erfolgreichen Anwachsen wurden die Keime für die Versuche verwendet.

2.2 Untersuchung der VOC von *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe

2.2.1 Material

Reagenzien und Laborutensilien

- Sabouraud-Dextrose-Agar
bestehend aus Sabouraud-Dextrose-Agar (Merck, Deutschland) und den Antibiotika Gentamicin und Chloramphenicol (im Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin Graz hergestellt)
- Schraubflaschen mit 20 ml Fassungsvermögen mit passendem Silikondeckel (Supelco Analytical, USA)

Geräte

- Brutschrank (Binder, Deutschland)
- Agilent 6890 GC mit 5975 MSD (Agilent Technologies, USA)

Software

- GC/MSD ChemStation Software (Agilent Technologies, USA)

2.2.2 Methoden

Insgesamt wurden 50 Schrägagarschraubflaschen mit SAB hergestellt, um die neun Pilzstämme auf ihrer VOC zu untersuchen. Die zuvor autoklavierten Schraubflaschen wurden mit fünf ml des flüssigen Agars gefüllt und härteten in Schräglage bei Raumtemperatur aus. Danach wurden fünf Flaschen mit dem jeweiligen Keim beimpft und fünf als Negativkontrolle nur mit Medium belassen. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 35°C im Brutschrank wurden die

Schraubflaschen luftdicht verschlossen und mittels Gaschromatografie gekoppelt mit einer Massenspektroskopie auf VOC untersucht.



Abbildung 1: Schrägagarschraubflaschen, obere Reihe mit Pilzen bewachsen, untere Reihe mit SAB-Agar ohne Keim

Die GC-MS, welche am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Graz durchgeführt wurde, verwendete die in Tabelle 2 stehenden Parameter

Ofenprogramm	
-10°C für 1 min, dann 12°C/min auf 230°C für 3 min	
Injektionsart	Splitles
Heater	270° Grad
Druck	106,24 kPa
Totaler Flow	10,734 ml/min
Laufzeit	28,167 min
Säulenparameter	
Säule	HP-5MS-Säule
Säulenlänge	30 m
Säulendurchmesser	250 µm
Schichtdicke	0,25 µm
Trägergas	Helium
Detektor	
Detektorart	Massenspektrometer
Solvent Delay	2,7 min
Messbereich	20-300 Dalton

Tabelle 2: Parameter der GC-MS

Die entstandenen Chromatogramme wurden in zwei Schritten analysiert.

Im ersten Schritt wurden von jedem Stamm die gemeinsamen Peaks der fünf Proben notiert. Dazu in Bezug gesetzt wurden die Peaks des SAB-Nährmediums. Stellte sich heraus, dass der identifizierte Peak mit gleicher Höhe im Nährmedium und bei den Stämmen zu finden war, wurde dieser aus den Daten eliminiert.

Danach erfolgte die Identifikation der VOC durch einen Vergleich der Massenspektren mit der Wiley7Nist05 Bibliothek.

2.3 Untersuchung von Extrakten aus Neophyten

2.3.1 Material

Reagenzien und Laborutensilien

- Ettestreifen der Antimykotika Voriconazol und Posaconazol (BioMérieux, Frankreich)
- RPMI1640-Nährlösung (Sigma-Aldrich, USA)
- Aceton (Sigma-Aldrich, USA)
- 0,85% NaCl-Lösung (Sigma-Aldrich, USA)
- Microtiterplatten 96 Well F (Sarstedt, Deutschland)
- Eppendorfcups Fassungsvermögen 1,5 ml (Eppendorf, Deutschland)
- RPMI1640-Platten (Astellas, UK)

Testsubstanzen

- Resveratrol (Sigma-Aldrich, USA)
- Salizylsäure (Sigma-Aldrich, USA)
- Juglon
Pflanzenextrakt, zur Verfügung gestellt vom Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich
- Emodin (Sigma-Aldrich, USA)
- Quercetin (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-Methoxy-1,4-naphtochinon (Sigma-Aldrich, USA)
- Physcion (Sigma-Aldrich, USA)

Geräte

- Analysenwaage (Mettler Toledo, Schweiz)
- Vitex Denscheck (BioMérieux, Frankreich)
- Vortex Mixer (VWR, USA)

2.3.2 Methoden

Für die Ausgangslösungen wurden die Testsubstanzen abgewogen und in Aceton gelöst.

Bei Resveratrol und Salizylsäure war es möglich, eine Ausgangskonzentration von 20 mg/ml zu erreichen. Die anderen Stoffe gingen bei dieser Konzentration nicht in Lösung, weshalb bei Juglon, Emodin, Quercetin, 2-Methoxy-1,4-naphtochinon und

Physson eine Startkonzentration von 2 mg/ml verwendet wurde.

Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe beginnend bei 2 mg/ml bis zu 0,00002 mg/ml für Resveratrol und Salizylsäure hergestellt. Bei den anderen Substanzen begann die Verdünnungsreihe erst bei 0,2 mg/ml und endete bei 0,000002 mg/ml. Schlussendlich beinhalteten die Wells sechs Konzentrationsstufen, wobei die erste für Resveratrol und Salizylsäure bei 1 mg/ml lag und bei den anderen bei 0,1 mg/ml.

Von jedem Pilzstamm wurde eine Suspension mit einem McFarland von 0,5 in 0,85% NaCl hergestellt und mittels Vitex Densicheck überprüft. Diese wurden zuerst 1:50 mit NaCl verdünnt und danach 1:20 mit RPMI-Nährlösung.

In die Wells der Microtiterplatten wurden 100 µl Keimsuspension und 100 µl der Testsubstanz in der entsprechenden Verdünnung pipettiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit 200 µl RPMI und eine Positivkontrolle mit 100 µl Keimsuspension und 100 µl RPMI angefertigt. In einer feuchten Kammer wurden die Platten für 72 Stunden bei 35°C im Brutschrank inkubiert.

Am Ende des Versuches wurden die Platten optisch unter dem Gesichtspunkt Wachstum (ja/nein) beurteilt und die entsprechenden Daten dokumentiert.

Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt, und die Ergebnisse untereinander verglichen.

Zum Vergleich wurde für jeden Stamm eine Resistenztestung mittels Etest mit Voriconazol und Posaconazol auf RPMI1640-Platten durchgeführt, die MIC abgelesen und dokumentiert. [Arendrup et al. 2012]

2.4 *Galleria mellonella* Modell

2.4.1 Material

Versuchstiere

Die Versuchstiere der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* wurden über eine biologische Wurmzucht bezogen. Die Raupen, welche sich im sechsten Larvenstadium befanden, wurden in kleinen Plastikdosen mit Luftlöchern und Sägespänen bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 6°C gelagert. Drei

Stunden vor der Injektion wurden die Raupen aus dem Kühlschrank genommen.

Reagenzien und Laborutensilien

- IPS-Puffer bestehend aus 8,76 g NaCl, 0,36 g KCl, 15,76 g TRIS HCl, 3,72 g EDTA, 4,72 g Natriumcitrat mit destillierten H₂O auf einen pH-Wert von 6,9 adjustiert
hergestellt im Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin Graz
- Tween 80 (Polysorbitanum 80 oleinatum PHE 97) (ACM Handelsgesellschaft Apoka, Österreich)
- Malzextraktagarplatten
hergestellt im Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin Graz aus Malzextraktagar (Merck)
- Sabouraud-dextroseagarplatte
- leere Petrischalen (Greiner, Ungarn)
- 40 µm Zellsiebe (BiologixResearch, China)
- Eppendorfcups Fassungsvermögen 1,5 ml (Eppendorf, Deutschland)
- U-100 Insulinnadeln mit 0,3 ml Volumen (BD Medical, Frankreich)
- Türk Zählkammer (Preciss, Frankreich)

Geräte

- Vitex Denscheck (BioMérieux, Frankreich)
- Vortex Mixer (VWR, USA)
- Brutschrank (Binder, Deutschland)
- Klima-Brutschrank (Binder, Deutschland)
- Mikroskop (Zeiss, Deutschland)

2.4.2 Methoden

Um ausreichend Sporenmaterial für die Suspensionen zur Verfügung zu haben, wurden pro Stamm jeweils zehn MEA Platten beimpft und bei 35°C im Brutschrank für acht Tage bebrütet.

Für die Herstellung der Injektionssuspensionen wurden die Konidien mit IPS abgelöst, wobei der Puffer mit Tween 80 versetzt wurde, um dessen Oberflächenspannung zu reduzieren. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb filtriert und in Reagenzgläsern aufgefangen. Nach der Sedimentierung wurde der Überstand abpipettiert und das Sediment in Eppendorfcups gefüllt. Der Cup wurde

mit IPS auf 2 ml aufgefüllt. Mit dem Vortex Mixer wurden die Konidien gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt.

Unter Zuhilfenahme der Zählkammer wurde die Zellzahl in den Suspensionen ermittelt und so adaptiert, dass alle Suspensionen eine Konzentration von $5 \cdot 10^8$ Konidien pro ml aufweisen.

Pro Stamm wurden zehn gleich große lebendige Raupen ohne graue Stellen ausgewählt. Mit einer Subkutan-Spritze wurden 20 μ l Keimsuspension in das Hämozöl des Tieres injiziert (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3), welches somit $1 \cdot 10^7$ Konidien erhielt.



Abbildung 2: Hämozol einer *Galleria mellonella*



Abbildung 3: Injektion der Keimsuspension in den Modellorganismus

Zusätzlich wurden zwei Kontrollgruppen mit je zehn Versuchstieren verwendet. Eine Gruppe erhielt keine Injektion, bei der anderen wurde 20 μ l IPS injiziert. Die Raupen wurden in Petrischalen gelegt, welche zuvor mit Zellstoff und Sägespänen ausgelegt wurden. Alle Schalen wurden in den Klima-Brutschrank bei 30°C, 65 %

Luftfeuchtigkeit und Dunkelheit gestellt.

Alle 24 Stunden erfolgte eine Kontrolle. Es wurde ermittelt, wie viele Raupen noch am Leben sind, indem ihre Reaktion auf mechanische Reize getestet wurde. Regierte die Raupe nicht, so wurde diese aus der Petrischale entfernt und als verstorben dokumentiert. Der Versuch wurde nach dem Absterben aller Versuchstiere bzw. spätestens nach 14 Tagen beendet.

Es wurde eine Versuchswiederholung durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu überprüfen.

Die Daten wurden in Excel-Tabellen erfasst. Es wurde eine Sterbekurve für jeden Stamm ermittelt. Bei den Stämmen der Gattung *P. boydii* und *S. aurantiacum* wurde eine Durchschnittsgerade gebildet. Die Sterbekurven wurden untereinander verglichen.

Zur Überprüfung einer möglichen Kontamination der Keimsuspensionen wurde von jeder Suspension ein Ausstrich auf SAB-Platten angefertigt. Dieser wurde bei 35°C für 72 Stunden inkubiert. Beurteilt wurden die Platten nach alleinigem Scedosporien-Wachstum (rein), partieller Kontamination mit begrenztem Scedosporien-Wachstum und vollständige Kontamination.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der MVOC von *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe

3.1.1 Allgemeine Ergebnisse

Um die VOC der *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe zu untersuchen, wurden die mit den Pilzstämmen bewachsenen Schrägagarschraubflaschen mittels GC-MS analysiert. Die dadurch entstandenen Chromatogramme mit ihren detektierten Verbindungen werden hier beschrieben. Insgesamt wurden 25 verschiedene Verbindungen identifiziert, wobei es keine Substanz gab, welche in allen Proben zu finden war.

Bei der Datenauswertung fällt auf, dass die Verbindungen Ethanol, 1-Propanal, 2-Methyl-Propanal, 2-Methyl-1,3-Pentadien, 4-Methyl-1,3-Pentadien, 3-Methyl-Butanal, Styrol, Cyclohexanon und Farnesen aus dem Überstand des Nährmediums ohne Pilze isoliert wurden, aber nicht bei allen neun Stämmen im VOC-Profil wieder zu finden sind.

Mögliche Verbindung	PubChem ID	<i>S. apiospermum</i>					<i>S. aurantiacum</i>					<i>P. ellipsoidea</i>	<i>P. boydii</i>		<i>P. angusta</i>	<i>Medium</i>
		117410	116910	136046	136047	136049	301.79	120157	117432	254.72	SAB					
Ethanol	702	-	X	X	X	-	-	-	-	-	X	X				
Pentan	8003	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-				
Isobutanal	6561	-	X	X	X	X	-	-	-	X	-	-				
1-Propanol	1031	-	-	-	-	-	X	X	-	X	X	X				
2-Methyl-1-Propanol	6560	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
2-Methyl-1,3-Pentadien	638070	-	X	-	X	-	-	-	-	X	-	-				
4-Methyl-1,3-Pentadien	13555	-	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X				
3-Methyl-Butanal	11552	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X				
Butanal	261	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
3-Hydroxy-2-Butanon	179	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-				
3-Methyl-Butanol	31260	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X				
4-Methyl-3-Hexanon	86501	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-				
Styrol	7501	-	-	-	-	-	X	-	-	X	X	X				
Cyclohexanon	7967	X	X	X	X	X	-	X	X	-	X	X				
1-Octen-3-ol	18827	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-				
3-Octanon	246728	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-				
2-Octanol	20083	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-				
Octylacetat	8164	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
2-Phenylethanol	6054	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
α -Phellandren	7460	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
α -Gurjunen	16213731	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-				
AC1LJS3K	979031	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-				
β -Sesquiphellandren	12315492	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Farnesen	5281517	-	X	X	X	X	-	-	-	-	-	X				
α -Bisabolon	86597	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Tabelle 3: Übersicht aller gefundenen VOC im Experiment

3.1.2 Auswertung der Chromatogramme der einzelnen Arten

Bei dem Stamm *S. apiospermum* (CBS 117410) konnten Butanal, 3-Methyl-Butanol, Cyclohexanon, 2-Phenylethanol und β -Sesquiphellandren identifiziert werden (siehe Abbildung 4).

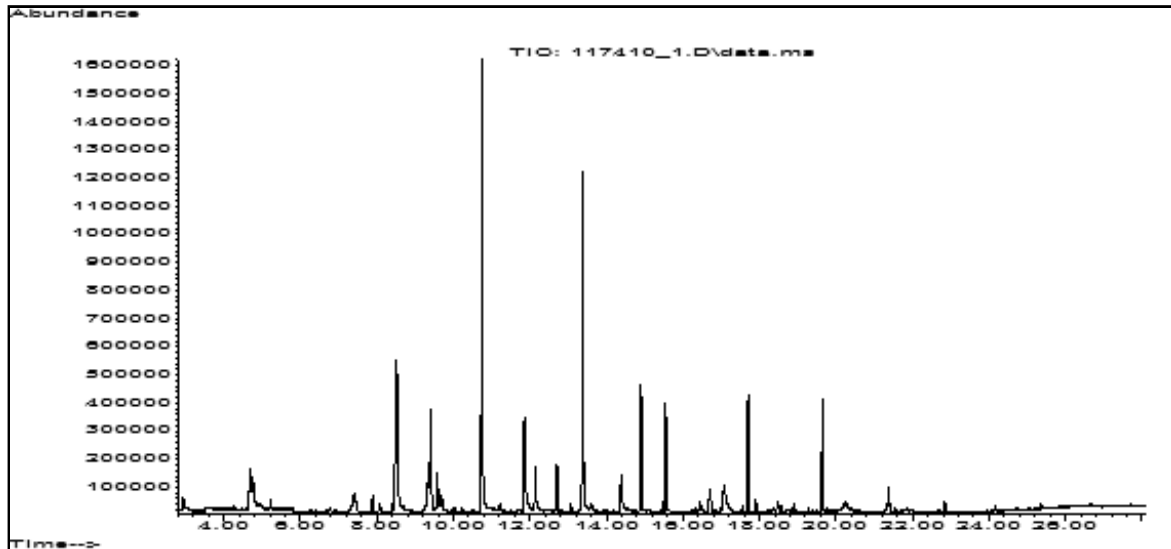


Abbildung 4: Chromatogramm von *S. apiospermum* CBS 117410

Das Metabolitenprofil für *S. aurantiacum* zeigte je nach Stamm ein unterschiedliches Metabolitenprofil. Die Verbindungen, die bei allen Stämmen dieser Art zu finden waren, sind Isobutanal, 2-Methyl-1-Propanol, 3-Methyl-Butanol, Cyclohexanon, 2-Octanol und Farnesen. Weitere Verbindungen, welche nicht bei allen Stämmen zu finden waren, stehen in Tabelle 3.

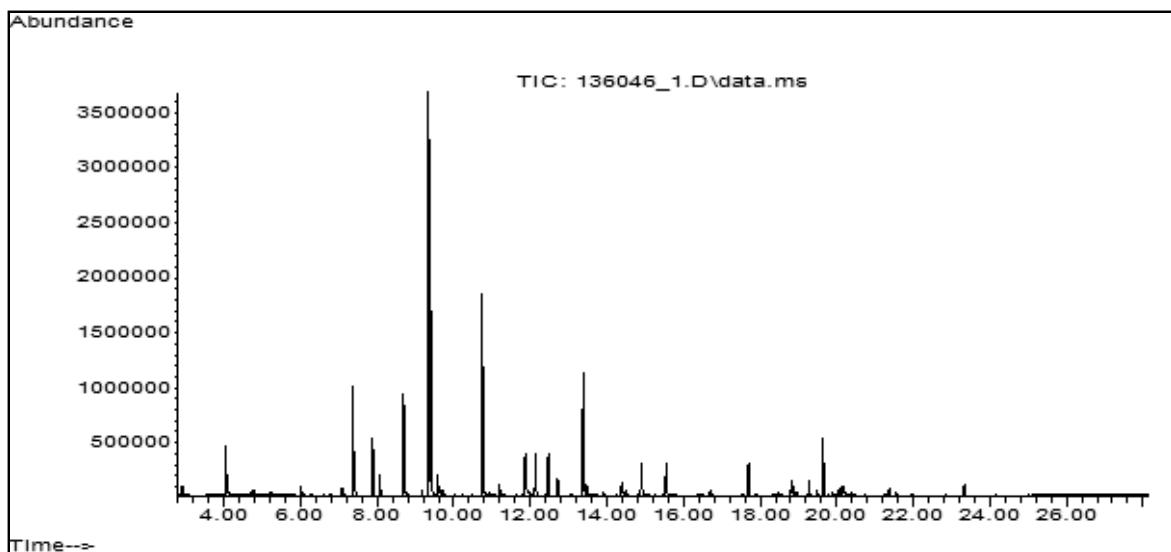


Abbildung 5: Chromatogramm von *S. aurantiacum* CBS 136046

Die Auswertung des Chromatogrammes von *P. ellipsoidea* (CBS 301.79) zeigt die Substanzen Pentan, 1-Propanol, 2-Methyl-1-Propanol, 3-Methyl-Butanol, Styrol und 2-Octanol (siehe Abbildung 6).

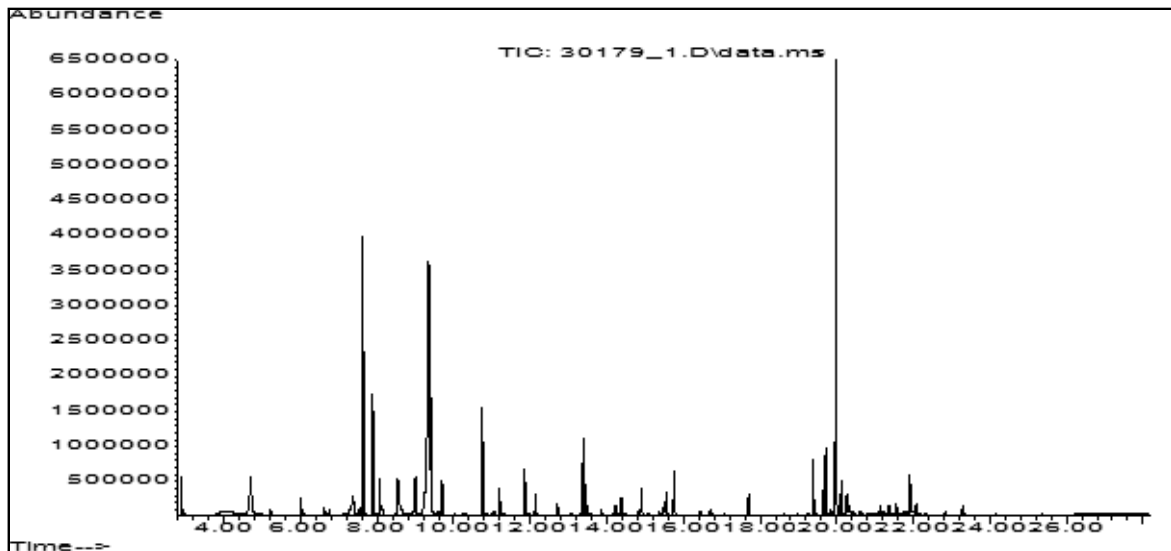


Abbildung 6: Chromatogramm von *P. ellipsoidea* CBS 301.79

Die VOC der beiden *P. boydii* Stämme wichen nur bei zwei Stoffen voneinander ab. In beiden Proben wurden folgende Verbindungen gefunden: Pentan, 2-Methyl-1-Propanol, 3-Methyl-Butanol, Cyclohexanon und 2-Octanol. Bei der Probe CBS 120157 wurde zusätzlich 1-Propanol nachgewiesen. Diese Verbindungen gab es bei der Probe CBS 117432 nicht, dafür aber 4-Methyl-3-Hexanon (siehe Abbildung 7).

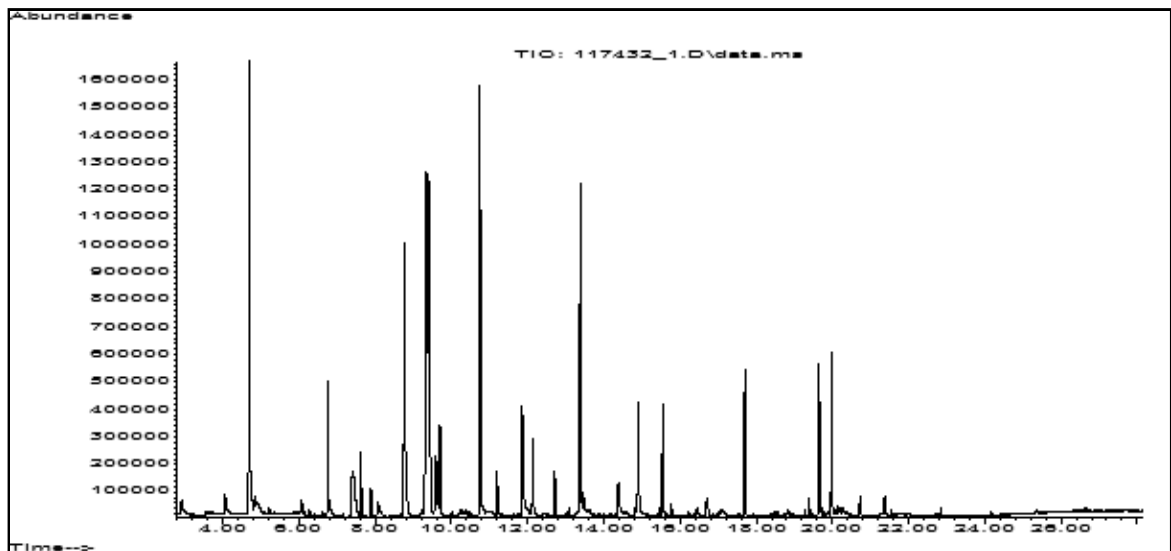


Abbildung 7: Chromatogramm von *P. boydii* CBS 117432

Bei *P. angusta* mit der Nummer CBS 254.72 wurden in der Auswertung des Chromatogrammes (siehe Abbildung 8) die VOC Ethanol, Isobutanal, 2-Methyl-1-Propanol, 2-Methyl-1,3-Pentadien, 4-Methyl-1,3-Pentadien, 3-Methyl-Butanal, 3-Hydroxy-2-Butanon, Styrol, 3-Octanon, 2-Octanol, α -Gurjunen, AC1LJS3K, 1-Propanol und 2-Methyl-1-Propanal identifiziert.

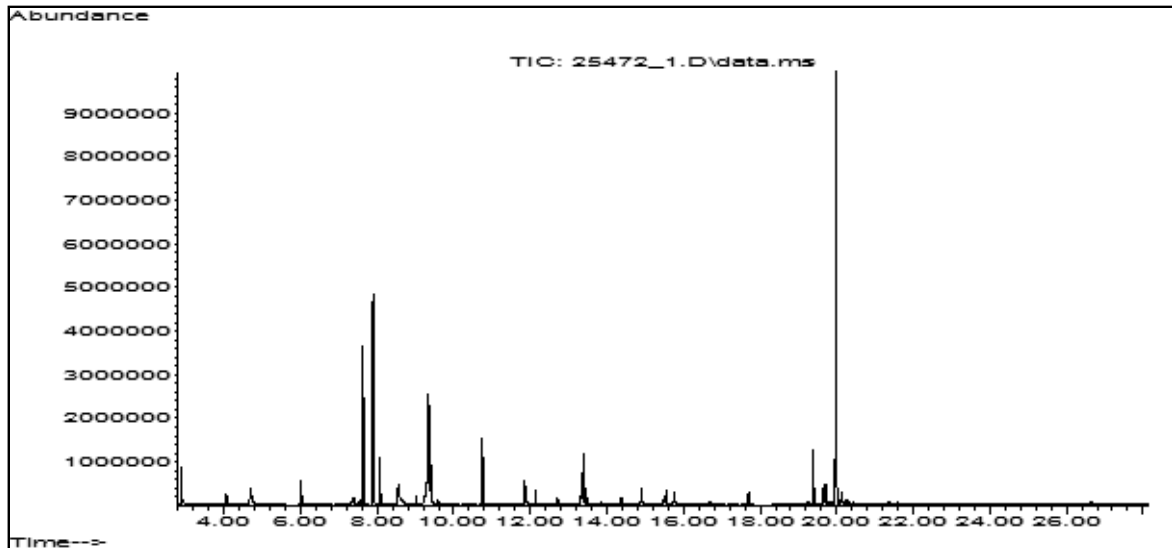


Abbildung 8: Chromatogramm von *P. angusta* CBS 254.72

In den Schraubflaschen, welche nur das SAB-Nährmedium enthielten, wurden folgende Verbindungen identifiziert: Ethanol, 1-Propanol, 2-Methyl-1-Propanol, 4-Methyl-1,3-Pentadien, 3-Methyl-Butanal, 3-Methyl-Butanol, Styrol, Cyclohexan und Farnesen (siehe Abbildung 9).

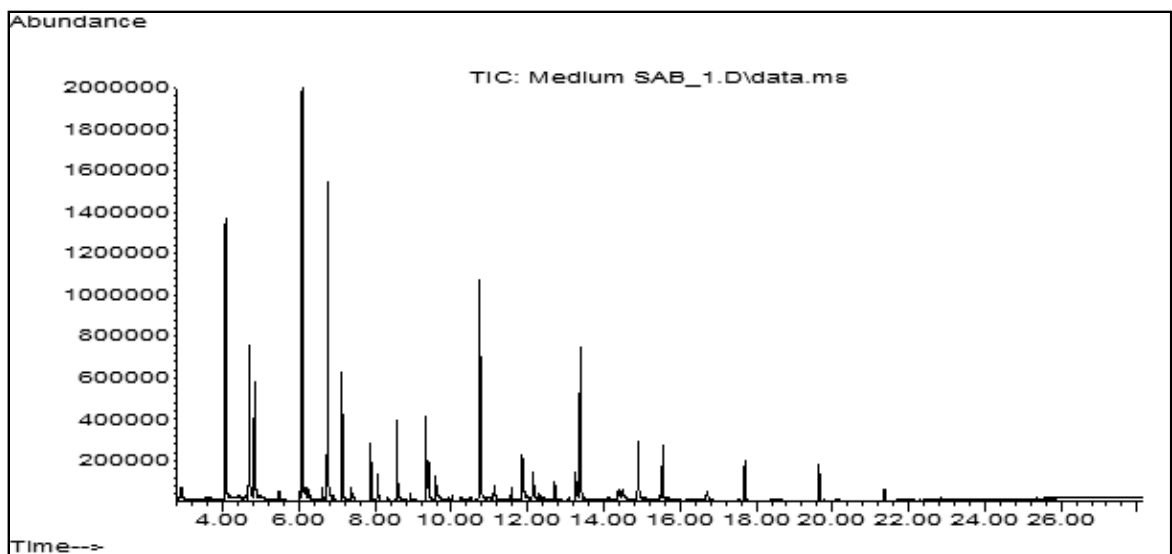


Abbildung 9: Chromatogramm des Nährmediums mit SAB

3.1.3 Nachschlagen der MVOC in der Datenbank der Charité

In der 2014 angelegten Datenbank zur Sammlung aller bekannten MVOC mit dazugehörigen Mikroorganismen wurden die in dieser Arbeit ermittelten MVOC nachgeschlagen. [Lemfack et al. 2014] Es wurde untersucht, bei wie vielen anderen Mikroorganismen diese schon nachweisbar waren beziehungsweise ob es Verbindungen gab, die noch nicht als MVOC identifiziert wurden. Die Stoffe 2-Methyl-1,3-Pentadien, 4-Methyl-1,3-Pentadien und AC1LJS3K sind in der Datenbank noch nicht enthalten. In Tabelle 4 sind die ausführlichen Ergebnisse aller nachgeschlagenen Verbindungen des Experimentes aufgeführt. Die ermittelten Verbindungen sind bei folgenden Proben zu finden: 2-Methyl-1,3-Pentadien ist bei zwei *S. aurantiacum* Stämmen und bei *P. angusta* zu finden. 4-Methyl-1,3-Pentadien wurde bei drei *S. aurantiacum* Proben, bei *P. angusta* und im Nährmedium gefunden. Bei *P. angusta* konnte nur AC1LJS3K nachgewiesen werden.

VOC, welche bei mehr als zehn anderen Mikroorganismen vorkamen	VOC, welche bei zwei bis zehn anderen Mikroorganismen vorkamen	VOC, welche nicht in der Datenbank zu finden waren
Ethanol 1-Propanol 2-Methyl-1-Propanol 3-Methyl-Butanal 3-Methyl-Butanol Styrol 1-Octen-3-ol 3-Octanon 2-Octanol 2-Phenylethanol Farnesen	Isobutanal Pentan Butanal Octylacetat β-Sesquiphellandrene α-Phellandren α-Gurjunen α-Bisabolen 3-Hydroxy-2-Butanon	2-Methyl-1,3-Pentadien 4-Methyl-1,3-Pentadien AC1LJS3K

Tabelle 4: Ergebnis der Recherche der gefunden MVOC in der Datenbank der Charité

3.2 Untersuchung der antimykotischen Eigenschaften von Extrakten aus Neophyten

Um die mögliche pilzwachstumshemmende Wirkung der Extrakte aus Neophyten zu untersuchen, wurden von den Pflanzenstoffen Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationsstufen angefertigt. Die Lösung wurde mit den Keimsuspensionen in Microtiterplatten zusammengebracht und nach 72 h auf Wachstum überprüft, um die MIC zu bestimmen. Zusätzlich wurden zum Vergleich dieselben Stämme noch mittels Etest mit Voriconazol und Posaconazol untersucht.

3.2.1 Ergebnisse der Testsubstanzen

Den weiteren Beobachtungen ist voraus zu stellen, dass *P. boydii* (CBS 117432) weder in den Wells der Positivkontrolle noch in den Lösungen der sieben Testsubstanzen wuchs und daher nicht ausgewertet werden konnte. Die Negativkontrollen (nur Medium ohne Keimsuspension) zeigten kein Pilzwachstum. Abbildung 10 zeigt exemplarisch eine Microtiterplatte.

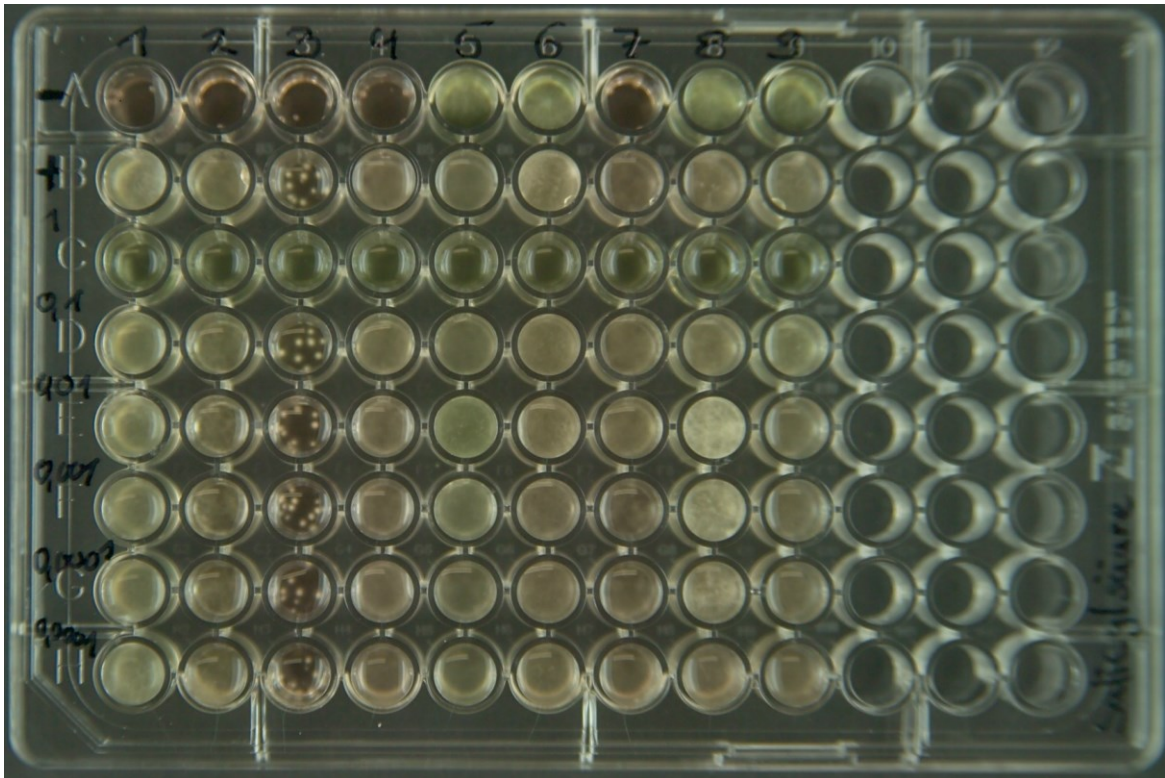


Abbildung 10: Microtiterplatte von Salizylsäure

Die Stoffe Resveratrol, Quercetin, Phycion und Emodin konnten, unabhängig vom Pilzstamm und der Konzentrationsstufe, keine Wachstumsinhibierung erreichen.

Bei Salizylsäure begann das Pilzwachstum in den Wells erst ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml.

Die Ergebnisse von Juglon teilen sich in zwei Gruppen. Für die Pilze *P. boydii* (CBS 120157), *P. ellipsoidea* (CBS 301.79) und *S. apiospermum* (CBS 117410) lag die MIC bei 0,01 mg/ml. Bei den anderen Pilzen war diese mit 0,1 mg/ml um eine Konzentrationsstufe höher.

Die Microtiterplatte von 2-Methoxy-1,4-naphthochinon zeigte, dass bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml kein Wachstum zu sehen war. Zusätzlich wurde bei *S. apiospermum* (CBS 117410), *P. boydii* (CBS 120157), *P. ellipsoidea* (CBS 301.79) und *S. aurantiacum* (CBS 116910) das Wachstum zusätzlich bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml unterdrückt.

Die Ergebnisse des zweiten Parallelversuches waren identisch mit jenen des ersten.

3.2.2 Ergebnisse der Etests

Der Etest mit den Antimykotika ergab eine MIC von 0,047 bis 0,25 µg/ml für Voriconazol. Bei Posaconazol schwankte die MIC zwischen 0,75 und >32 µg/ml. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 ausführlich dargestellt.

MIC	Voriconazol [µg/ml]	Posaconazol [µg/ml]	2-Methoxy-1,4- naphthoquinone [mg/ml]	Juglon [mg/ml]	Salizylsäure [mg/ml]	Resveratrol Quercetin Physcion Emodin
<i>S. aurantiacum</i> CBS116910	0,19	6	0,01	0,1	1	keine Wachstums- inhibierung
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136046	0,125	3	0,1	0,1		
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136047	0,25	> 32	0,1	0,1		
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136049	0,19	16	0,1	0,1		
<i>S. apiospermum</i> CBS 117410	0,064	2	0,01	0,01		
<i>P. ellipsoidea</i> CBS 301.79	0,094	0,75	0,01	0,01		
<i>P. angusta</i> CBS 254.72	0,125	4	0,1	0,1		
<i>P. boydii</i> CBS 120157	0,047	1,5	0,01	0,01		
<i>P. boydii</i> CBS 117432	0,023	0,74	keine MIC bestimmbar			

Tabelle 5: Ergebnisse der MIC der Testsubstanzen und Etests

3.3 *Galleria mellonella* Modell

In diesem Experiment wurde die Pathogenität der neun Stämme von *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe untersucht und miteinander verglichen. Dazu wurden für alle zu untersuchenden Stämmen je zehn Larven der Wachsmotte *Galleria mellonella* mit einer Keimsuspension geimpft. Der Beobachtungszeitraum betrug zwei Wochen. Die Beurteilung erfolgte danach. Es wurde eruiert in welchem Zeitintervall nach der Injektion die Raupen verstarben und welche Charakteristika die Sterbekurve aufwies. Dafür wurden Daten von zwei Kontrollgruppen inkludiert (unbehandelt bzw. Injektion mit IPS), um daraus eine Durchschnittsgerade zu ermitteln. Bei mehreren Stämmen einer Art wurden die Daten in einer Sterbekurve durch eine Mittelwertbildung zusammengefasst. Ein weiterer Aspekt der Auswertung war, ob die Daten reproduzierbar sind. Als identisch galten zwei Versuche, wenn der Tag, an dem alle Tiere tot waren, derselbe war.

3.3.1 Allgemeine Beobachtungen

Allgemein wurde beobachtet, dass die mit Konidien beimpften Raupen weniger mobil waren als die Tiere der Kontrollgruppen. Verstorbene Raupen fielen zusätzlich durch eine dunkelbraune bis schwarze Verfärbung ihres Körpers auf. Die Raupen der Kontrollgruppen setzten im Experiment ihre natürliche Entwicklung fort. Einige von ihnen fingen an, sich zu verpuppen. Am 14. Tag schlüpfen sie und man fand sie als Falter in der Petrischale vor. Diese Tiere wurden als lebend bewertet.

3.3.2 Überblick *Galleria mellonella* Modell

Das Gesamtergebnis (siehe Abbildung 11) dieses Experiments gliedert sich in vier Gruppen:

Die Raupen, welche mit *P. angusta* beziehungsweise *S. aurantiacum* infiziert waren, starben am schnellsten. Zwischen dem 11. und 13. Tag verstarben die Larven der *P. ellipsoidea*- und *S. apiospermum*-Gruppe. Die Tiere, welche mit *P. boydii* beimpft wurden, überlebten teilweise die gesamte Versuchsdauer von 14 Tagen. In den zwei Kontrollgruppen reduzierte sich die Zahl der vitalen Tiere auf

neun beziehungsweise sieben. Teilweise zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Daten der ersten und zweiten Versuchsreihe.

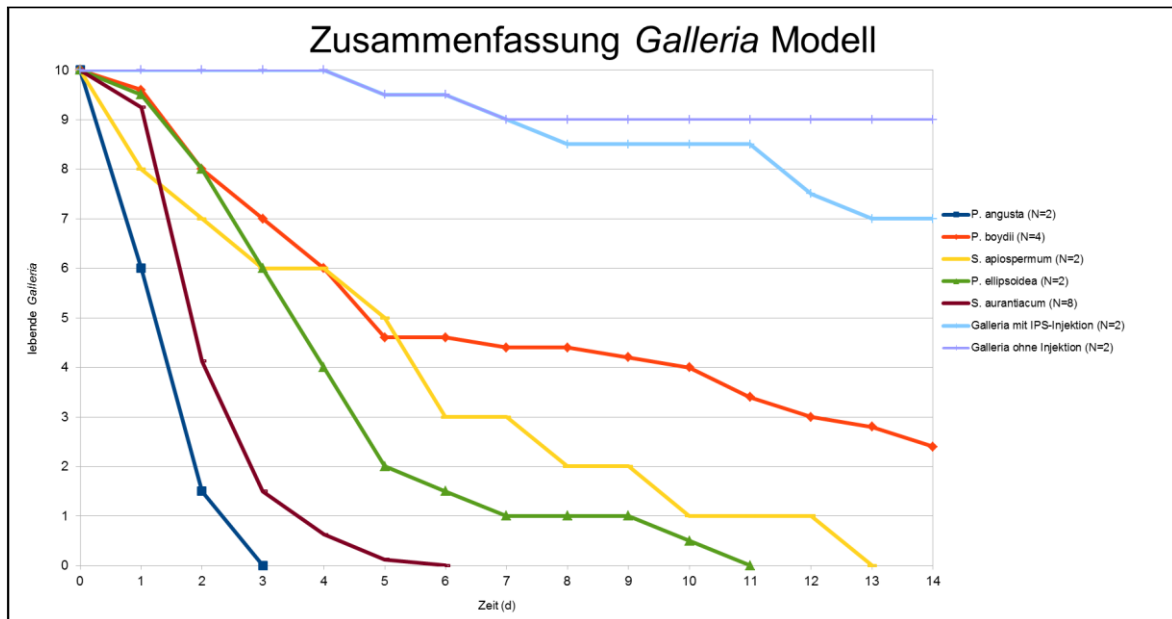


Abbildung 11: Sterbekurve der gesamten Versuchsreihe

3.3.3 Auswertung der einzelnen Stämme

Die Sterbekurve von *P. angusta* CBS 254.72 (Abbildung 12) zeigte den steilsten Abfall. Nach drei Tagen waren bereits alle Versuchstiere verstorben. Die Ergebnisse der beiden Versuche stimmten überein.

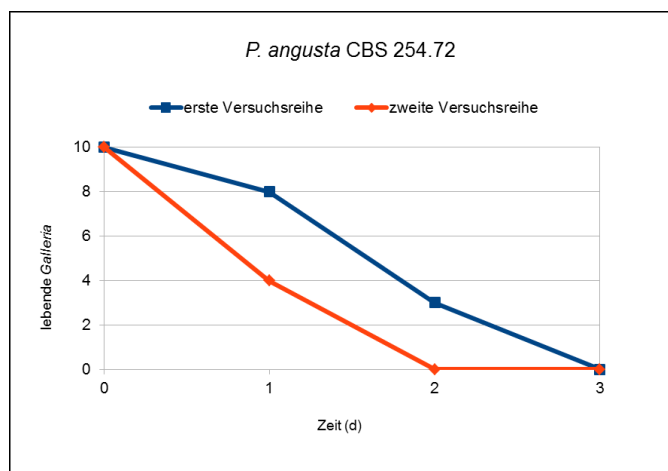


Abbildung 12: Sterbekurve von *P. angusta* CBS 254.72

Die Kurve von *P. boydii* fasst die Daten von *P. boydii* CBS 117432 und *P. boydii* CBS 120157 zusammen (siehe Abbildung 13). Charakteristisch war ein steiler Abfall der überlebenden Raupen bis zum fünften Tag auf fünf Tiere. Im weiteren Verlauf flachte die Kurve nur noch leicht ab und am 14. Tag waren durchschnittlich

noch drei Tiere am Leben. Die detaillierte Analyse der Daten der zwei Stämme zeigt den Unterschied sowohl bei der Sterbekurve als auch bei der Reproduzierbarkeit der Versuchsreihen deutlich. Durch *P. boydii* CBS 117432 starben die Raupen vier Tage früher als durch *P. boydii* CBS 120157. Zwischen den zwei Versuchsreihen zeigte sich folgende Diskrepanz: Bei der Probe von *P. boydii* CBS 120157 unterschied sich die Anzahl der lebenden Raupen am 14. Tag um zwei lebende Raupen. Beim ersten Versuch mit *P. boydii* CBS 117432 verstarb innerhalb von 14. Tagen die Hälfte der Population, beim zweiten Versuch waren alle Versuchstiere bereits nach sieben Tagen tot.

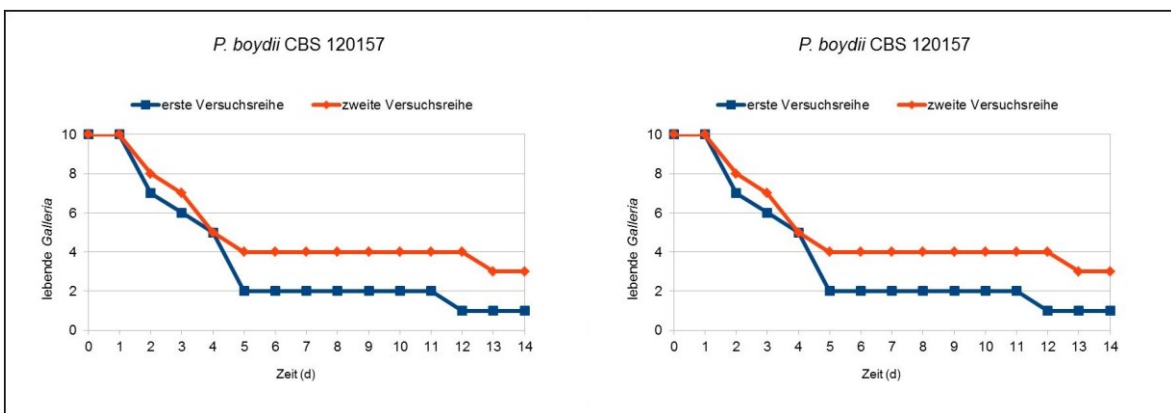


Abbildung 13: Sterbekurve von *P. boydii* CBS 120157 und CBS 120157

Bei dem Keim *P. ellipsoidea* CBS 301.79 war zu beobachten, dass bis zum fünften Tag die Sterbekurve (siehe Abbildung 14) sehr steil abfiel und bis zum elften Tag, wo sie bei null angelangte, nicht mehr viele Tiere verstarben. Die Differenz der Daten aus beiden Versuchen war minimal. Im zweiten Versuch dauerte es bis zum Versterben aller Versuchstiere nur zehn anstelle von elf Tagen wie im ersten.

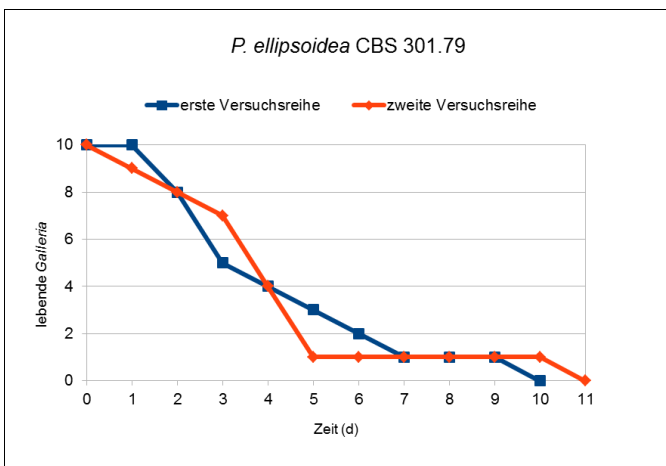


Abbildung 14: Sterbekurve von *P. ellipsoidea* CBS 301.79

Bei *S. apiospermum* CBS 117410 ist der Kurvenverlauf gleichmäßig abfallend. Es dauerte 13 Tage, bis die gesamte Population tot war (siehe Abbildung 15). Die erhobenen Daten aus den zwei Versuchsreihen zeigten geringfügige Unterschiede. Im ersten Versuch lebten zum Ende des Experimentes noch drei Raupen, beim zweiten waren bereits am 13. Tag alle Raupen tot.

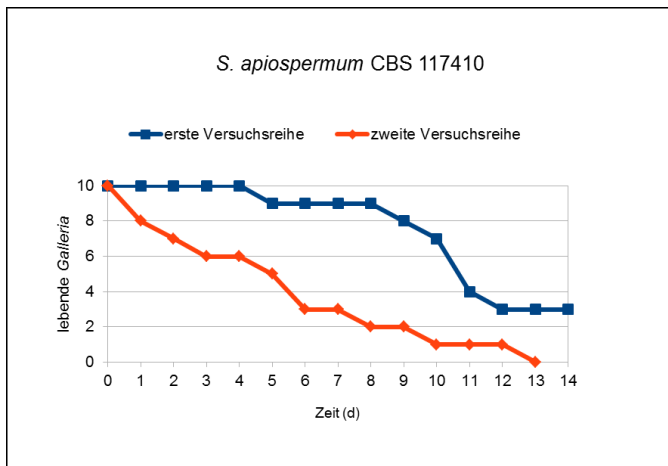


Abbildung 15: Sterbekurve von *S. apiospermum* CBS 117410

Die Sterbekurve von *S. aurantiacum* setzt sich aus den erhobenen Daten von *S. aurantiacum* CBS116910, *S. aurantiacum* CBS 136046, *S. aurantiacum* CBS 136047 und *S. aurantiacum* CBS 136049 zusammen (siehe Abbildung 16). Im Durchschnitt dauerte es sechs Tage, bis die zehn Versuchstiere verstorben waren. Bei genauer Betrachtung aller erstellten Diagramme für diese Art zeigt sich, dass die Sterbekurven voneinander abweichen. Die Dauer bis zum Versterben aller Tiere betrug minimal drei Tage bei *S. aurantiacum* CBS116046 und maximal fünf bei *S. aurantiacum* CBS116910. Beim Vergleichen der Daten des ersten und zweiten Versuches zeigt sich folgendes Bild: Beim ersten Versuch mit *S. aurantiacum* CBS 136049 dauerte es doppelt so lange, bis alle Versuchstiere verstorben waren. Die Daten der anderen drei Proben von *S. aurantiacum* waren in beiden Versuchen identisch.

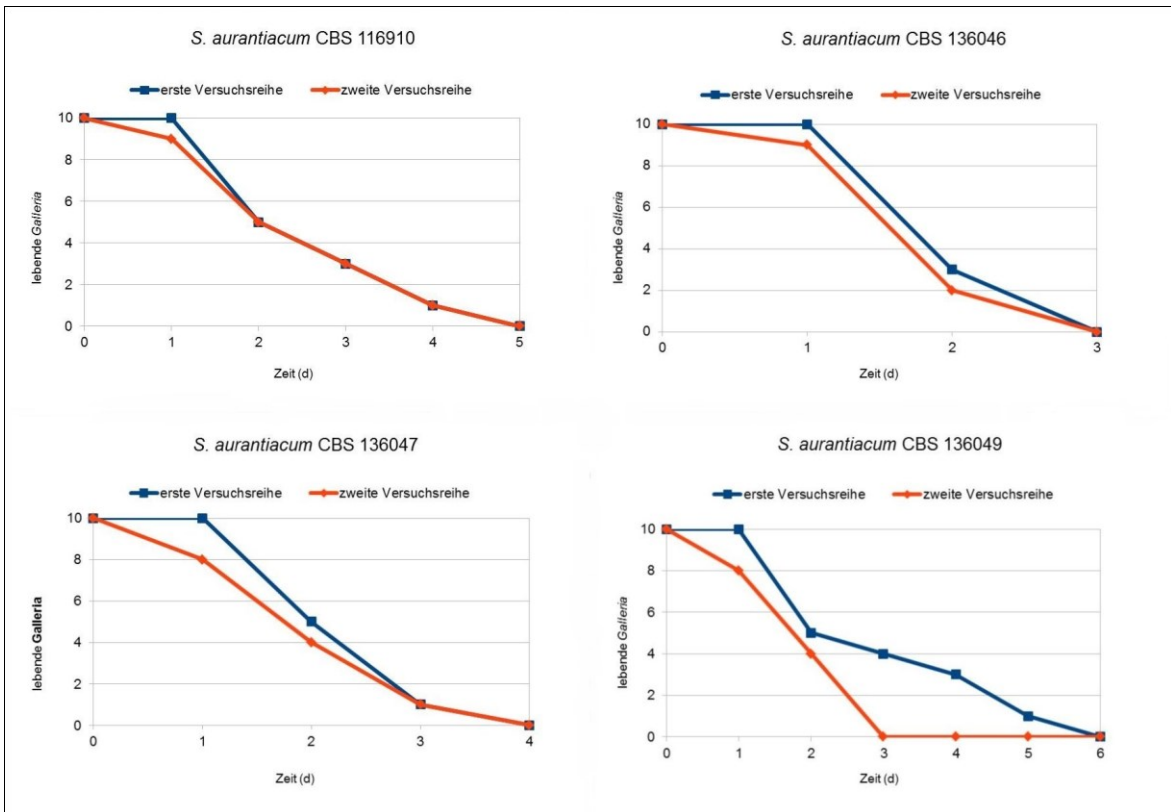


Abbildung 16: Sterbekurve der gesamten *S. aurantiacum* Proben

3.3.4 Ergebnisse der Kontrollgruppen

Die Kurven der zwei Kontrollgruppen (unbehandelt bzw. Injektion mit IPS) waren bis zum siebten Tag identisch (siehe Abbildung 17). Bis dahin fiel die Populationsmenge auf neun ab. Danach starben in der Gruppe ohne Injektion keine weiteren Raupen mehr. Im Gegensatz dazu verstarben von den Raupen, welche IPS-Puffer injiziert bekamen, weitere zwei bis zum Ende des Experimentes.

Wesentliche Unterschiede zeigten sich zwischen den beiden Versuchsreihen. Im ersten Versuch überlebten alle Versuchstiere die Dauer des Experimentes. Diese Ergebnisse bestätigten sich nicht im zweiten Versuch. Von den Raupen, welche eine IPS-Injektion erhalten hatten, verstarben innerhalb der 14 Tage sechs Stück. Bei der nativen Kontrollgruppe waren es nur zwei.

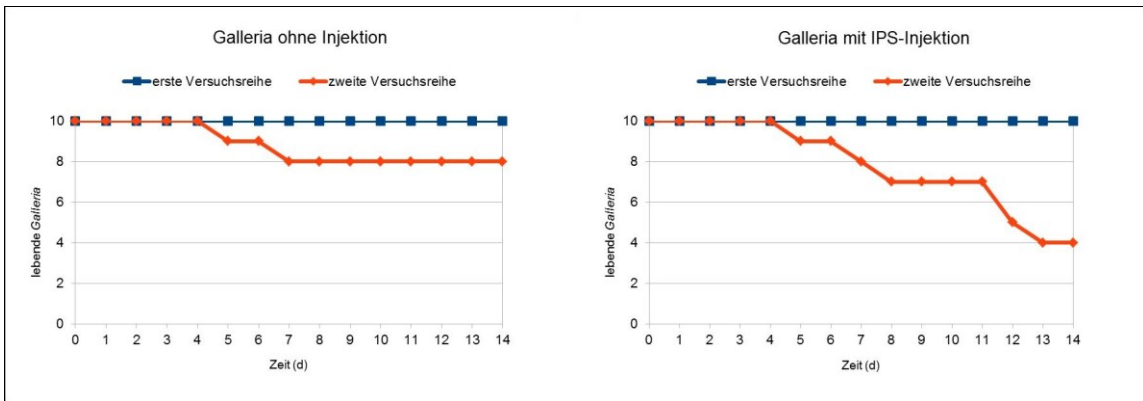


Abbildung 17: Sterbekurve der zwei Kontrollgruppen

3.3.5 Kontaminationskontrolle

Bei der Überprüfung der Stämme auf Kontaminationen durch Kultivieren der Keimsuspensionen auf SAB-Platten zeigte sich, dass die Keime *P. boydii* CBS 120.157, *P. ellipsoidea* CBS 301.79, *S. aurantiacum* CBS 116910, *S. aurantiacum* CBS 136047 und *S. aurantiacum* CBS 136049 frei von anderen Keimen waren.

Bei den Stämmen *P. angusta* CBS 254.72 und *S. apiospermum* CBS 117410 wuchs, trotz einer leichten Kontamination mit *A. fumigatus*, der zu erwartende Keim der Suspension im ausreichenden Umfang.

Die Verunreinigung der Probe *S. aurantiacum* CBS 136046 und *P. boydii* CBS 117432 mit *A. fumigatus* war so fulminant, dass kein *Scedosporium* wachsen konnte.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der MVOC von *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe

4.1.1 Interpretation des Versuches

Ziel der GC-MS war es, dass Metabolitenprofil der *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe zu identifizieren, da bis jetzt keine Forschungsarbeiten darüber publiziert wurden. Bei diesem Versuch wurden 25 Verbindungen gefunden (siehe Tabelle 3). Es gab keine einzige Substanz, die bei allen Proben zu finden war. Die Auswertung ergab, dass neun Stoffe (zum Beispiel Ethanol oder Cylohexanon), welche im Nährmedium vorkamen, nicht bei allen Stämmen nachweisbar waren. Zudem zeigte sich, dass das Metabolitenprofil auch innerhalb einer Art von Stamm zu Stamm schwankte. Als potenzielle Biomarker wurden die Stoffe 2-Methyl-1,3-Pentadien, 4-Methyl-1,3-Pentadien und AC1LJS3K ermittelt.

Aufgrund des Fehlens spezifischer Daten über die VOC von *Scedosporium* mussten Erkenntnisse von anderen erforschten Pilz- oder Bakterienarten wie *Aspergillus fumigatus* für die kritische Auseinandersetzung der Ergebnisse dieser Diplomarbeit herangezogen werden.

So fanden Chambers et al. heraus, dass 2-Pentylfuran als Indikator für einen Befall mit *Aspergillus fumigatus* erfolgversprechend sei, da es sowohl in vitro als auch in der Atemluft von Patienten mit zystischer Fibrose mittels GC-MS nachweisbar war. [Chambers et al. 2009] Im Zuge dieser Diplomarbeit konnte kein solcher Biomarker gefunden werden.

Die Arbeitsgruppe von Bos et al. untersuchte das Metabolitenprofil der am häufigsten Sepsis verursachenden Bakterien und gelangte zu der Erkenntnis, dass der Subtyp der Bakterien bereits die VOC-Produktion beeinflussen kann. [Bos et al. 2013] Diese Variabilität konnte auch in den Ergebnissen dieser Diplomarbeit belegt werden. Ein aussagekräftiger Beweis dafür sind die Proben von *S. aurantiacum*. Dort gibt es sieben VOC, welche nicht bei allen Stämmen zu finden sind. So liegt die Vermutung nahe, dass beispielsweise Ethanol, welches

vom Nährmedium abgesondert wurde, von drei *S. aurantiacum*-Stämmen nicht verstoffwechselt werden konnte. Bei allen weiteren untersuchten *Scedosporium*-Arten (Ausnahme: *P. angusta*) gab es keine Hinweise auf das Vorhandensein von Ethanol. Des Weiteren wies die Arbeitsgruppe auf die Problematik der Reproduzierbarkeit und der Vergleichbarkeit von Daten hin. Das VOC-Profil wird, wie schon aus den oben erwähnten Arbeiten bekannt, vom Stamm des jeweiligen Mikroorganismus, von der Art des verwendeten Nährmediums und zusätzlich durch den Zeitpunkt der GC-MS beeinflusst. Daher ist es schwierig, gefundene VOC mit anderen Versuchen zu vergleichen. Zudem variieren die verwendeten Methoden zur Analyse der VOC. In der Arbeit von Bos et al. wurden Ethanol und Isopren als potenzielle Biomarker in Erwägung gezogen. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass diese zwei Stoffe sehr häufig auch in der Atemluft von Säugetieren gefunden wurden, sodass diese als Biomarker wieder verworfen wurden. Auch bei *Scedosporien* wurde Ethanol nachgewiesen. Als Biomarker eignet es sich aber nicht, weil Ethanol nicht bei jedem Stamm vorkam und es zudem Überschneidungen mit anderen Organismen gab. Diese Erkenntnis erschwert das Finden eines spezifischen Biomarkes erheblich. [Bos et al. 2013]

Bei der Prüfung von 2-Methyl-1,3-Pentadien, 4-Methyl-1,3-Pentadien und AC1LJS3K als potenzielle Biomarker sind aktuell (Stand April 2015) keine beschriebenen Zusammenhänge mit VOC beziehungsweise Mikroorganismen zu finden. Es ist nicht geklärt, was die Identifikation dieser Stoffe für eine Relevanz in weiteren Arbeiten zu diesem Thema haben könnte.

Thorn et al. standen bei ihren Experimenten ebenfalls vor dem Problem, einen einzelnen Biomarker zu finden. In ihrer Arbeit untersuchten sie die VOC unter anderem von *Pseudomonas* ssp., *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*. In ihrer Datenanalyse fokussierten sie sich nicht auf das Finden eines einzelnen Biomarkers, sondern wendeten die Methode der Multidimensionalen Skalierung an, um VOC-Profile zu ermitteln. Diese Auswertung basierte auf der Art und der Konzentration der verschiedenen VOC der Mikroorganismen. Somit war es in ihrem Versuch möglich, die untersuchten Keime zu identifizieren und deutlich gegeneinander abzugrenzen. [Thorn et al. 2011]

Die Forschungsergebnisse von Thorn et al. wurden zum Anlass genommen, die gemessenen Daten der GC-MS nachträglich mit einer Hauptkomponentenanalyse, welche der Multidimensionalen Skalierung ähnlich ist, auszuwerten. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 in Form eines Scores Plot zu sehen. Um die Ergebnisse zu vereinfachen und eine strukturierte Darstellung zu erreichen, wurden bei der Hauptkomponentenanalyse die Daten von *P. ellipsoidea* CBS 301.79, *P. angusta* CBS 254.72 und *S. aurantiacum* CBS 116910 nicht berücksichtigt. So gruppieren sich die Proben der zwei *P. boydii* Stämme (in Abbildung 18 lila Kreis) im II. Quadranten. Deutlich zu sehen ist, dass die Proben von *S. apiospermum* (in Abbildung 18 dunkelgrau) eine zusammenhängende Einheit bilden. Die Daten von *S. aurantiacum* (in Abbildung 18 grüner Kreis) verteilen sich in der Hauptkomponentenanalyse auf zwei Bereiche. Die Probe CBS 136049 (in Abbildung 18 hellblauer Kreis) bildet eine eigenständige Einheit an der Grenze zwischen dem III. und IV. Quadranten. Die zwei anderen Proben (in Abbildung 18 roter Kreis) von *S. aurantiacum* gruppierten sich zusammen an einer anderen Stelle. Es bestätigt sich, wie in den Versuchen von Thorn et al., dass mittels der hier durchgeführten Hauptkomponentenanalyse eine Unterscheidung auf Artenebene möglich scheint.

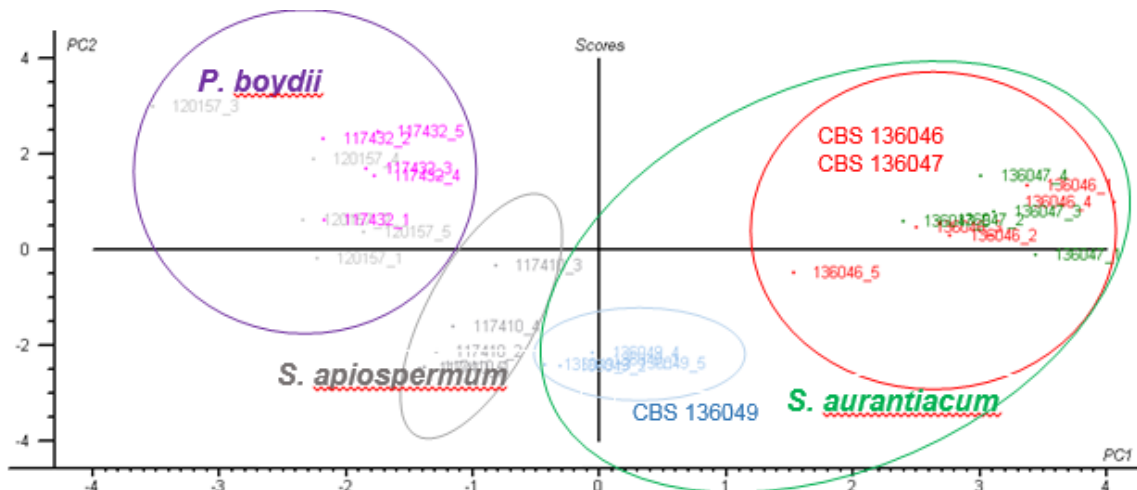


Abbildung 18: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse

4.1.2 Schwachpunkte des Versuches

Um genauere Aussagen über das Metabolitenprofil treffen zu können, müsste der Versuch mit einer größeren Anzahl an Proben und mehr Stämmen pro Art wiederholt werden. In dieser Diplomarbeit wurde nur eine Versuchsreihe mit fünf

Proben pro Stamm durchgeführt. Wahrscheinlich würde sich auch hier das aus anderen Forschungsarbeiten bekannte Problem der Reproduzierbarkeit ergeben, welches es zu überwinden gilt. Vielleicht wäre es auch denkbar, mit einem genaueren Wissen über die Enzymaktivität der *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe anhand von abgebauten VOC eine Identifizierung mit GC-MS zu prüfen. Weiterhin müsste die hier nachträglich durchgeführte Hauptkomponentenanalyse um die noch fehlenden Proben erweitert werden, um deutlichere Aussagen zum Metabolitenprofil ableiten zu können.

4.1.3 Schlussfolgerung aus dem Versuch

Mit dieser Diplomarbeit ist es gelungen, das Metabolitenprofil der *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe zu untersuchen. Es wurde deutlich, dass die noch offenen Fragen zu dieser neuen Untersuchungsmethode hauptsächlich im Bereich der Datenauswertung liegen. Eine Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse sollte favorisiert werden, da diese die einzelnen Arten dieser Artengruppe voneinander unterscheiden kann.

4.2 Diskussion der antimykotischen Eigenschaften von Extrakten aus Neophyten

4.2.1 Interpretation des Versuches

Die Forschungshypothese dieses Experimentes war, dass die Substanzen Resveratrol, Quercetin, Phycion, Salizylsäure, Juglon, 2-Methoxy-1,4-naphtochinon und Emodin eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber den Pilzstämmen besitzen und die Ergebnisse der Tests identisch mit der Literatur sind.

Für die Stoffe aller getesteten Substanzen ist die Forschungshypothese abzulehnen.

Dies wird wie folgt begründet: Für Resveratrol, Quercetin, Phycion und Emodin ist das die logische Konsequenz, da es keine Unterdrückung des Pilzwachstums

gab. Für Juglon, Salizylsäure und 2-Methoxy-1,4-naphtochinon konnte zwar in höheren Konzentrationen eine Inhibierung erzielt werden, aber diese Konzentrationen sind um das Hundertfache bis Tausendfache höher als die MIC der Antimykotika. Deshalb kann für diese Stoffe die Hypothese nicht bestätigt werden.

Auffällig war, dass der Stamm *P. boydii* CBS 117432 bei keinem Versuch ein Wachstum zeigte.

Für die Evaluierung des Resistenzverhaltens von Pilzen aus der Artengruppe *Scedosporium/Pseudallescheria* gibt es derzeit weder vom US-amerikanischen National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) noch vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) verbindliche Interpretationsrichtlinien. Als Hilfestellung für die antimykotische Therapie empfiehlt der Atlas of Clinical Fungi [de Hoog 2011] die in Tabelle 6 angeführten Richtwerte. Unter Berücksichtigung dieser reagierten alle getesteten Pilzstämmen sensibel auf Voriconazol. Im Gegensatz dazu waren sie resistent gegenüber Posaconazol.

Antimykotikum	MIC in µg/ml	
Posaconazol	≤ 0,5 sensibel	≥ 1 resistent
Voriconazol	≤ 2 sensibel	≥ 4 resistent

Tabelle 6: Richtlinien zur Resistenzevaluation aus dem Atlas of Clinical Fungi [de Hoog 2011]

Grundlage der Auswahl der Extrakte war der aktuelle Forschungsstand, der in Tabelle 7 zusammengefasst ist und um die MIC-Werte aus diesem Versuch ergänzt wurde.

Bei allen Stoffen, mit Ausnahme von Resveratrol, war eine hemmende Wirkung auf Mikroorganismen bekannt. Das ließ vermuten, dass es auch bei ihrer Testung an *Scedosporium* spp. erfolgreich sein könnte. In anderen Forschungsarbeiten wurde mit viel niedrigeren Konzentrationen eine Unterdrückung des mikrobiellen Wachstums erreicht. Bei Resveratrol ist aus der Literatur bekannt, dass es keine Effektivität auf bereits getestete Mikroorganismen besitzt. Dies bestätigte sich auch für die getesteten CBS-Stämme.

Hier zeigt sich die Sonderstellung dieser Artengruppe sowie ihre äußerst schwierige Behandlung.

Stoff	Aktueller wissenschaftlicher Stand mit Quelle		Daten dieses Versuches MIC [mg/ml]
	Getestete Mikroorganismen	MIC [mg/ml]	
Resveratrol	keine antimikrobielle Wirkung bekannt [Collado-Gonzales et al. 2012]		keine Wachstums- inhibierung
Quercetin	7 Bakterien und 1 Pilz [Liu et al. 2012]	0,1- 0,006	
Phycion	<i>Blumeria graminis</i> [Ma et al. 2010]	0,01	
Emodin	<i>Japan-Enzephalitis-Virus</i> <i>Enterovirus 71</i> [Lin et al. 2008]	0,5- 1,51 0,14- 0,52	
Salizylsäure	<i>Aspergillus ssp.</i> [Panahirad et al. 2013]	1,83	1
Juglon	<i>Candida albicans</i> [Simonsen et al. 2006]	0,008	0,1– 0,01
	<i>Pleurotus sajor-caju</i> [Curreli et al. 2001]	0,5- 1	
2-Methoxy-1,4-naphtochinon	<i>Candida albicans</i> [Sritrairat et al. 2011]	0,00125	0,1– 0,01

Tabelle 7: Zusammenfassung der Literaturrecherche

Die aktuellen Empfehlungen zur Therapie einer Scedosporiose sind entweder eine Monotherapie mit Voriconazol oder eine Kombinationstherapie des Echocandins Micafungin mit einem Triazol (Posaconazol oder Voriconazol). [Lackner et al. 2012]

Im Experiment der Diplomarbeit wurde die Sensibilität auf Voriconazol nochmals nachgewiesen. Sie ist identisch mit den allgemeinen Therapierichtlinien. Posaconazol wird nur im Rahmen einer Kombinationstherapie verwendet. In dieser Diplomarbeit wurden aber nur Etests mit einer antimykotischen Substanz durchgeführt.

Die hier angewendeten Empfehlungen aus dem Atlas of Clinical Fungi [de Hoog 2011] sind sehr allgemein gefasst und nicht immer auf den jeweiligen Pilz vollständig zutreffend. Aktuell gibt es keine spezifischeren Richtlinien, um eine Aussage bezüglich des Resistenzverhaltens von *Scedosporium spp.* ableiten zu können.

Bei dem Vergleich (siehe Tabelle 8) der ermittelten MIC-Werte mit der Literatur [Lackner et al. 2012] zeigt sich, dass die Werte nicht identisch sind, aber im selben Bereich liegen. Unter Berücksichtigung der Empfehlungen des Atlas of Clinical Fungi (siehe Tabelle 6) ist die Einteilung in resistente und sensible Arten identisch. Die Schimmelpilze sind sensibel gegenüber Voriconazol und resistent gegenüber Posaconazol.

	MIC für Voriconazol in µg/ml		MIC für Posaconazol in µg/ml,	
	eigene Daten	Literatur	eigene Daten	Literatur
<i>S. aurantiacum</i>	0,125 bis 0,25	0,5	3 bis größer 32	1
<i>S. apiospermum</i>	0,064	1	2	1
<i>P. ellipsoidea</i>	0,094	1	0,75	1
<i>P. angusta</i>	0,125	0,5	4	1
<i>P. boydii</i>	0,023 bis 0,047	1	0,74 bis 1,5	1

Tabelle 8: Vergleich der eigenen Daten mit der Literatur [Lackner et al. 2012]

4.2.2 Schwachpunkte des Versuches

Aus chemischer Sicht ist es nicht möglich, die Konzentration der Testsubstanzen zu erhöhen, weil ihr Löslichkeitsprodukt dann überschritten wird und sie sich nicht mehr vollständig auflösen. Zudem würde die Forschungshypothese trotzdem wieder abgelehnt werden, weil die Hemmkonzentrationen dann um das Zehntausendfache höher als die Ergebnisse der Etests wären.

Trotz mehrmaliger Wiederholungen wuchs der Stamm *P. boydii* CBS 117432 bei keinem Versuch. Dafür konnte keine Erklärung gefunden werden.

4.2.3 Schlussfolgerung aus dem Versuch

Bei diesem Experiment konnte keine wachstumshemmende Wirkung der Extrakte aus Neophyten nachgewiesen werden. Zudem gab es keine artspezifischen Unterschiede. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Konsequenz, dass in zukünftigen Forschungsarbeiten andere Substanzen getestet werden sollten. Die Ergebnisse dieses Experimentes korrelierten mit den Aussagen der Arbeitsgruppe um Sharon Chen aus der „ECMM-ISHAM Working Group on *Pseudallescheria/Scedosporium* Infections“. Diese vertritt die Ansicht, dass das Potenzial der Behandlung mit herkömmlichen Antimykotika noch nicht voll ausgeschöpft ist. Aufgrund des Mangels an neuen Medikamenten sollte die Therapie mit den derzeit zugelassenen Pharmazeutika weiter optimiert werden. [Chen 2014]

4.3 Diskussion des Versuches mit *Galleria mellonella*

4.3.1 Interpretation des Versuches

Bei diesem Versuch wurde unter Verwendung des Modellorganismus *Galleria mellonella* die Reaktion der Tiere auf eine artifizielle Infektion mit den CBS-Barcode-Stämmen aus der Artengruppe *Scedosporium/Pseudallescheria* untersucht. Es zeigte sich, dass mit *P. angusta* infizierte Raupen am schnellsten verstarben. Die Arten *S. aurantiacum*, *P. ellipsoidea* und *S. apiospermum* gruppierten sich im Mittelfeld. Am spätesten trat der Tod nach einer Infektion mit *P. boydii* ein. Die Hypothese für diesen Versuch lautete, dass es zwischen den einzelnen Arten Unterschiede bezüglich ihrer Pathogenität gibt. Die Hypothese konnte durch den Versuch verifiziert werden. Marker für die Pathogenität war der Todeszeitpunkt der Raupen. Somit ist *P. angusta* am virulentesten und *P. boydii* nur schwach pathogen.

In den letzten Jahren wurde die Pathogenität der *Scedosporium*-Artengruppe in nur sehr geringem Umfang erforscht.

Anlässlich des ISHAM Workshops on Barcoding of Medical Fungi bestimmte eine weitere Arbeitsgruppe aus Innsbruck, geleitet von Frau Mag.Dr.rer.nat. Ulrike

Binder, die Pathogenität der durch das CBS zur Verfügung gestellten Stämme unter Verwendung des gleichen Modellorganismus *Galleria mellonella*. Diese Arbeitsgruppe kam zu der Erkenntnis, dass in ihrem Versuch *S. apiospermum* die geringste und *S. aurantiacum* die höchste Pathogenität zeigte. Dies widerspricht den Ergebnissen der hier vorliegenden Diplomarbeit. Ursache dafür könnte sein, dass die Innsbrucker Arbeitsgruppe andere Einteilungen für die Stämme vornahm und zusätzlich noch einen weiteren Temperaturbereich verwendete. Die Gemeinsamkeit beider Versuche bestand darin, dass die gleiche Konzentration an Konidien ($1 \cdot 10^7$) verwendet wurde. Die Unterschiede ergaben sich bei der Wahl der Temperaturbereiche, der Versuchsdauer und in der Anzahl der Kontrollgruppen. [Binder et al. 2014]

In Innsbruck gab es neben der in dieser Arbeit verwendeten Temperatur von 30°C noch einen zusätzlichen Versuchsteil mit einer Temperatur von 37°C im Klimaschrank. Daraus ergab sich für Binder et al. die Erkenntnis, dass die Mortalität bei 37°C höher sei als bei 30°C.

Der Beobachtungszeitraum in diesem Experiment betrug nur sechs Tage und nicht wie im Versuch dieser Diplomarbeit 14 Tage.

Weiterhin gab es im Versuch der Innsbrucker Forschungsgruppe drei Kontrollgruppen (nativ/ mit IPS-Injektion/ durch Hitze inaktivierte Konidien). Obwohl die Konidien in der Kontrollgruppe durch Hitze inaktiviert wurden, starben auch in dieser Kontrollgruppe genauso viele Tiere wie Tiere mit einer noch lebenden Konidieninjektion. Daraus ergab sich eine neue Fragestellung, nämlich ob die Tiere entweder durch das Pilzwachstum oder aufgrund der Immunantwort auf die Pilzinfektion gestorben sind.

Aber auch bei der Betrachtung der einzelnen Stämme zeigen sich deutliche Unterschiede bezüglich des Todeszeitpunktes. In den Experimenten dieser Diplomarbeit zeigte sich, dass es deutliche Ergebnisschwankungen abhängig von den Versuchstieren gab. Dies wirkte sich mit aller Wahrscheinlichkeit auf die beiden Experimente aus und kann die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise erklären. Zudem war die Menge der Versuchstiere sehr gering, sodass statistische Schwankungen stärker ins Gewicht fallen.

	Binder et al. (d)	eigene Daten (d)
<i>S. aurantiacum</i> CBS 116910	6	5
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136046	5,5	3
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136047	2,5	4
<i>S. aurantiacum</i> CBS 136049	5,5	6
<i>S. apiospermum</i> CBS 117410	nicht definierbar	13
<i>P. ellipsoidea</i> CBS 301.79	5,5	10,5
<i>P. angusta</i> CBS 254.72	6	3
<i>P. boydii</i> CBS 120157	5	nicht definierbar
<i>P. boydii</i> CBS 117432	nicht definierbar	nicht definierbar

Tabelle 9: Vergleich der eigenen Daten mit jenen der Innsbrucker Arbeitsgruppe [Binder et al. 2014] bei 30 °C („nicht definiert“ wurde verwendet, wenn bei Beendigung des Experimentzeitraumes noch Versuchstiere am Leben waren)

Gilgado et al. untersuchten die Pathogenität von *P. boydii*, *S. apiospermum* und *S. aurantiacum* an Mäusen. Es wurden zwei Gruppen von Mäusen (mit/ohne Immunsuppression) verwendet. Die Autoren zeigten, dass eine Infektion mit allen *Scedosporium* ssp. zu 100 % tödlich ist. Am virulentesten war *S. aurantiacum*. Durch diese Art verstarben innerhalb von 30 Tagen über 80 % der Tiere. Für *P. boydii* und *S. apiospermum* lag die Pathogenität bei 20 %. [Gilgado et al. 2009]

4.3.2 Schwachpunkte des Versuches

Als problematisch bei diesem Versuch ist anzusehen, dass es teilweise massive Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen gab, sogar in der unbehandelten Kontrollgruppe. Ursachen dafür könnten sein, dass für beide Serien die Versuchstiere aus der gleichen Bestellung verwendet wurden und somit beim zweiten Experiment die Raupen deutlich älter waren. Daher hat sich wahrscheinlich ihre Qualität verschlechtert. Das könnte erklären, warum es teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Daten des ersten und zweiten Versuches gibt.

Durch die Kontaminationen bei *P. boydii* CBS 117432, *P. angusta*, *S. apiospermum* und *S. aurantiacum* CBS 136046 war es bei diesem Versuchsaufbau nicht möglich, zu unterscheiden, ob die Tiere durch eine Infektion mit *Scedosporium* oder durch den Erreger der Kontamination (*A. fumigatus*) verstarben. Um dies eindeutig zu klären, gäbe es entweder die Möglichkeit, den Versuch zu wiederholen oder eine Pathologie der verstorbenen Raupen zur Klärung durchzuführen.

4.3.3 Schlussfolgerungen aus dem Versuch

Die Hypothese dieses Experimentes konnte zwar bestätigt werden, dennoch empfiehlt sich eine Wiederholung des Versuches unter verbesserten Laborbedingungen. Zum einen sollte die Qualität der Raupen gleich sein. Zum anderen wäre es besser, die Kontamination der Injektionsflüssigkeit vorher zu überprüfen und nur kontaminationsfreie Suspensionen zu verwenden.

Um die statistischen Schwankungen zu minimieren, sollte eine größere Menge an Versuchstieren verwendet werden und mehr als zwei Versuchsreihen durchgeführt werden.

Die Innsbrucker Arbeitsgruppe kam zu dem Erkenntnis, dass es nicht nachvollziehbar ist, ob die Versuchstiere am Pilzwachstum selbst oder aufgrund der Immunantwort verstarben. Für künftige Versuche sollte das Versuchsprotokoll daher um einen Punkt erweitert werden. Dieser müsste eine Histologie zur Klärung der tatsächlichen Todesursache (Pilzwachstum oder Immunantwort) der verstorbenen Raupen beinhalten. Durch diese Untersuchung könnte außerdem noch geklärt werden, ob die Injektionsflüssigkeiten kontaminiert waren beziehungsweise ob eine Kontamination überhaupt einen Einfluss hat.

4.4 Zusammenfassende Schlussfolgerungen aus den drei Versuchen

Ziel dieser Diplomarbeit war es, neue Untersuchungsmethoden an der *Scedosporium/Pseudallescheria*-Artengruppe zu erproben. Dazu wurden drei Experimente ausgewählt, welche bis dahin noch nicht oder nur in sehr geringem Umfang bei diesen Pilzen eingesetzt wurden.

Die schon bei vielen anderen Mikroorganismen verwendete Methode der VOC-Bestimmung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Eine artspezifische Unterscheidung war dadurch möglich. Zwar sind noch intensive Forschungsarbeiten notwendig, aber es scheint durchaus denkbar, dass diese Methode Anwendung in der mikrobiologischen Diagnostik finden kann.

Bei den Extrakten aus Neophyten konnte lediglich die Erkenntnis gewonnen werden, dass diese Pflanzenstoffe sich nicht wachstumshemmend auf die Artengruppe auswirken und keine artspezifischen Unterschiede zu erkennen waren.

Im Tierversuch mit *Galleria mellonella* wurde deutlich, dass es innerhalb der Artengruppe wesentliche Unterschiede bei der Pathogenität gibt und eine Unterscheidung bis auf Artenebene sinnvoll und umsetzbar erscheint.

Zusammengefasst erscheint basierend auf den Erkenntnissen dieser Diplomarbeit nur eine weitere Erforschung der Metabolitenprofile und der Pathogenitätsmerkmale der Artengruppe zielführend.

Literaturverzeichnis

- Arendrup, M.C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W. & EUCAST-AFST 2012, "EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST)", *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 18, no. 7, pp. E246-7.
- Banville, N., Browne, N. & Kavanagh, K. 2012, "Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection", *Virulence*, vol. 3, no. 6, pp. 497-503.
- Betancourt, D.A., Krebs, K., Moore, S.A. & Martin, S.M. 2013, "Microbial volatile organic compound emissions from *Stachybotrys chartarum* growing on gypsum wallboard and ceiling tile", *BMC microbiology*, vol. 13, pp. 283-2180-13-283.
- Binder, U., Lass-Flörl, C. & Lackner, M. 2014, "Galleria mellonella as an alternative model to study *Scedosporium*-infections", *Diversity and Barcoding of Medical Fungi: Novel Achievements and Masterclass*
A meeting of the ISHAM Working Groups on Barcoding and Scedosporium, ed. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, CBS-KNAW, Utrecht, Netherlands, 22.-23. April 2014, pp. 19.
- Bos, L.D., Sterk, P.J. & Schultz, M.J. 2013, "Volatile metabolites of pathogens: a systematic review", *PLoS pathogens*, vol. 9, no. 5, pp. e1003311.
- Buselmaier, W. 2012, "Stoffsynthese durch Pilze" in *Biologie für Mediziner*, 12, edn, Springer, Berlin, pp. 280-281.
- Buzina, W., Feierl, G., Haas, D., Reinthaler, F.F., Holl, A., Kleinert, R., Reichenpfer, B., Roll, P. & Marth, E. 2006, "Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature", *Medical mycology*, vol. 44, no. 5, pp. 473-477.
- Campbell, N.A. & Reece, J.B. 2011, "Pilze bilden während der geschlechtlichen oder der ungeschlechtlichen Vermehrung Sporen" in *bio : Biologie*, eds. A. Kratochwil, R. Scheibe & H. Wiczorek, 8, edn, Pearson Studium, München, pp. 862-864.
- Chambers, S.T., Syhre, M., Murdoch, D.R., McCartin, F. & Epton, M.J. 2009, "Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*", *Medical mycology*, vol. 47, no. 5, pp. 468-476.
- Chen S. 2014, "Antifungal Drugs: new approaches", *Diversity and Barcoding of Medical Fungi: Novel Achievements and Masterclass*
A meeting of the ISHAM Working Groups on Barcoding and Scedosporium, ed. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, CBS-KNAW, Utrecht, Netherlands, 22.-23. April 2014, pp. 13.
- Cimon, B., Carrere, J., Vinatier, J.F., Chazalotte, J.P., Chabasse, D. & Bouchara, J.P. 2000, "Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis", *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 19, no. 1, pp. 53-56.
- Collado-Gonzalez, M., Guirao-Abad, J.P., Sanchez-Fresneda, R., Belchi-Navarro, S. & Arguelles, J.C. 2012, "Resveratrol lacks antifungal activity against *Candida albicans*", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 28, no. 6, pp. 2441-2446.
- Curreli, N., Sollai, F., Massa, L., Comandini, O., Rufo, A., Sanjust, E., Rinaldi, A. & Rinaldi, A.C. 2001, "Effects of plant-derived naphthoquinones on the growth of *Pleurotus sajor-caju* and degradation of the compounds by fungal cultures", *Journal of Basic Microbiology*, vol. 41, no. 5, pp. 253-259.
- Darai, G. 2012, "Scedosporium: Diagnostik" in *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*, 4, edn, Springer, Berlin, pp. 789-790.
- de Hoog, G.S. 2011, *Atlas of clinical fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

- Dunkel, M., Schmidt, U., Struck, S., Berger, L., Gruening, B., Hossbach, J., Jaeger, I.S., Efmert, U., Piechulla, B., Eriksson, R., Knudsen, J. & Preissner, R. 2009, "SuperScent--a database of flavors and scents", *Nucleic acids research*, vol. 37, no. Database issue, pp. D291-4.
- Fan, D., Zhou, X., Zhao, C., Chen, H., Zhao, Y. & Gong, X. 2011, "Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O-beta-D-glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L", *Fitoterapia*, vol. 82, no. 6, pp. 805-810.
- Farber, B.F. & Wolff, A.G. 1993, "Salicylic acid prevents the adherence of bacteria and yeast to silastic catheters", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, no. 5, pp. 599-602.
- Fuchs, B.B. & Mylonakis, E. 2006, "Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense", *Current opinion in microbiology*, vol. 9, no. 4, pp. 346-351.
- Fuchs, G., Schlegel, H.G. & Eitinger, T. 2014, "Pilze: Pilzwachstum und Einteilung der Pilze" in *Allgemeine Mikrobiologie*, 9, voll überarb u erw Aufl edn, Thieme, Stuttgart u.a., pp. 74-79.
- Gilgado, F., Cano, J., Gene, J., Serena, C. & Guarro, J. 2009, "Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex", *Medical mycology*, vol. 47, no. 4, pp. 371-374.
- Gilgado, F., Cano, J., Gene, J., Sutton, D.A. & Guarro, J. 2008, "Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*", *Journal of clinical microbiology*, vol. 46, no. 2, pp. 766-771.
- Hawksworth, D.L., Crous, P.W., Redhead, S.A., Reynolds, D.R., Samson, R.A., Seifert, K.A., Taylor, J.W., Wingfield, M.J., Abaci, O., Aime, C., Asan, A., Bai, F.Y., de Beer, Z.W., Begerow, D., Berikten, D., Boekhout, T., Buchanan, P.K., Burgess, T., Buzina, W., Cai, L., Cannon, P.F., Crane, J.L., Damm, U., Daniel, H.M., van Diepeningen, A.D., Druzhinina, I., Dyer, P.S., Eberhardt, U., Fell, J.W., Frisvad, J.C., Geiser, D.M., Geml, J., Glienke, C., Grafenhan, T., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., de Gruyter, J., Gueho-Kellermann, E., Guo, L.D., Hibbett, D.S., Hong, S.B., de Hoog, G.S., Houbraken, J., Huhndorf, S.M., Hyde, K.D., Ismail, A., Johnston, P.R., Kadaifciler, D.G., Kirk, P.M., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Lagneau, P.E., Levesque, C.A., Liu, X., Lombard, L., Meyer, W., Miller, A., Minter, D.W., Najafzadeh, M.J., Norvell, L., Ozerskaya, S.M., Ozic, R., Pennycook, S.R., Peterson, S.W., Pettersson, O.V., Quaedvlieg, W., Robert, V.A., Ruibal, C., Schnurer, J., Schroers, H.J., Shivas, R., Slippers, B., Spierenburg, H., Takashima, M., Taskin, E., Thines, M., Thrane, U., Uztan, A.H., van Raak, M., Varga, J., Vasco, A., Verkley, G., Videira, S.I., de Vries, R.P., Weir, B.S., Yilmaz, N., Yurkov, A. & Zhang, N. 2011, "The amsterdam declaration on fungal nomenclature", *IMA fungus*, vol. 2, no. 1, pp. 105-112.
- Hof, H., Dörries, R. & Geginat, G. 2014, "Allgemeine Mykologie: Merkmale und Klassifikation" in *Medizinische Mikrobiologie [Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene]*, 5, edn, Thieme, Stuttgart, pp. 466-469.
- Horre, R., Marklein, G., Siekmeier, R., Nidermajer, S. & Reiffert, S.M. 2009, "Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients", *Respiration; international review of thoracic diseases*, vol. 77, no. 3, pp. 320-324.
- Issakainen, J., Salonen, J.H., Anttila, V.J., Koukila-Kahkola, P., Castren, M., Liimatainen, O., Vuento, R., Ojanen, T., Koivula, I., Koskela, M. & Meurman, O. 2010, "Deep, respiratory tract and ear infections caused by *Pseudallescheria* (*Scedosporium*) and *Microascus* (*Scopulariopsis*) in Finland. A 10-year retrospective multi-center study", *Medical mycology*, vol. 48, no. 3, pp. 458-465.
- Junger, M., Vautz, W., Kuhns, M., Hofmann, L., Ulbricht, S., Baumbach, J.I., Quintel, M. & Perl, T. 2012, "Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 93, no. 6, pp. 2603-2614.
- Junqueira, J.C. 2012, "*Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives", *Virulence*, vol. 3, no. 6, pp. 474-476.
- Kaban, U. 2008, "Pseudallescheria-/Scedosporium-Arten: Bedeutung als opportunistische Erreger tiefer Schimmelpilz-Mykosen", *Epidemiologisches Bulletin- Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health*, [Online], no. 29, pp. 28.04.2015-229. Available from: http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reYq8gLvbyN0o/PDF/26p9ScuOE58M.pdf. [28.04.2015].

- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B. & Piechulla, B. 2009, "Bacterial volatiles and their action potential", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81, no. 6, pp. 1001-1012.
- Kavanagh, K. & Reeves, E.P. 2004, "Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens", *FEMS microbiology reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 101-112.
- Kew, M.C. 2013, "Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma", *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*, vol. 22, no. 3, pp. 305-310.
- Lackner, M., De Hoog, G., Yan, L., Moreno L.F., Ahmed, S.A., Andreas, F., Kaltseis, J., Nagl, M., Lass-Flörl, C., Risslegger, B., Rambach, G., Speth, C., Robert, V., Buzina, W., Chen, S., Bouchara, J.P., Cano, J., Guarro, J., Gene, J., Silva, F.F., Haido, R., Haase, R., Havlicek, V., Garcia-Hermoso, G., Meis, J.F., Hagen, F., Kirchmail, M., Rainer, J., Schwabenbauer, K., Zoderer, M., Meyer, E., Gilgado, F., Pieckova, E., Regenermel, M., Rath, P.M., Steinmann, J., Wellington de Alencar, X., Symoenes, F., Tintelnot, K., Ulfing, K., Velegraki, A., Tortorano, A.M., Giraud, S., Mina, S., Rigler-Hohenwarter, K., Hernandez F.L., Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Kaur, J., Dutra da Silva, M.I., Delhaes, L., Alastruey-Izquierdo, A., Moussa, T., Li, R.Y., Lu, Q., Almaghrabi, O., Al-Zahrani, H., Okada, G., Deng, S., Liao, W., Zeng, J., Issakainen, J. & Lopes, L.C.L. 2015, *Proposed nomenclature for Pseudallescheria, Scedosporium and related genera, with notes on their position within the Microasaceae*, Paper edn, Fungal Diversity, online.
- Lackner, M., de Hoog, G.S., Verweij, P.E., Najafzadeh, M.J., Curfs-Breuker, I., Klaassen, C.H. & Meis, J.F. 2012, "Species-specific antifungal susceptibility patterns of Scedosporium and Pseudallescheria species", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 5, pp. 2635-2642.
- Lass-Flörl, C. 2009, "The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe", *Mycoses*, vol. 52, no. 3, pp. 197-205.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. 2002, "Insect hemocytes and their role in immunity", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 32, no. 10, pp. 1295-1309.
- Lemfack, M.C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R. & Piechulla, B. 2014, "mVOC: a database of microbial volatiles", *Nucleic acids research*, vol. 42, no. Database issue, pp. D744-8.
- Lewbart, G. & Lewbart, G. 2012, *Invertebrate medicine*, 2nd edn, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Lin, C.W., Wu, C.F., Hsiao, N.W., Chang, C.Y., Li, S.W., Wan, L., Lin, Y.J. & Lin, W.Y. 2008, "Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71", *International journal of antimicrobial agents*, vol. 32, no. 4, pp. 355-359.
- Liu, H., Mou, Y., Zhao, J., Wang, J., Zhou, L., Wang, M., Wang, D., Han, J., Yu, Z. & Yang, F. 2010, "Flavonoids from Halostachys caspica and their antimicrobial and antioxidant activities", *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 15, no. 11, pp. 7933-7945.
- Ma, X., Yang, X., Zeng, F., Yang, L., Yu, D. & Ni, H. 2010, "Phycion, a natural anthraquinone derivative, enhances the gene expression of leaf-specific thionin of barley against Blumeria graminis", *Pest management science*, vol. 66, no. 7, pp. 718-724.
- Masoud-Landgraf, L., Badura, A., Eber, E., Feierl, G., Marth, E. & Buzina, W. 2014, "Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients", *Medical mycology*, vol. 52, no. 2, pp. 179-186.
- Matha, V. & Acek, Z. 1984, "Changes in haemocyte counts in Galleria mellonella (L.)(Lepidoptera: Galleriidae) larvae infected with Steinernema sp.(Nematoda: Steinernematidae)", *Nematologica*, vol. 30, no. 1, pp. 86-89.
- McNeill, J. 2012, "International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code)", .
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G. & Worm, B. 2011, "How many species are there on Earth and in the ocean?", *PLoS biology*, vol. 9, no. 8, pp. e1001127.

- Mowlds, P., Barron, A. & Kavanagh, K. 2008, "Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*", *Microbes and infection / Institut Pasteur*, vol. 10, no. 6, pp. 628-634.
- Munk, K. & Dersch, P. 2008, "Stoffwechsel der Pilze" in *Taschenlehrbuch Biologie Mikrobiologie*, eds. K. Munk & P. Dersch, 6th edn, Thieme, Stuttgart, pp. 147-150.
- Neumeister, B., Burkhardt, F. & Dahouk, S. 2009, *Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie ; 288 Tabellen*, 2, edn, Thieme, Stuttgart.
- Panahirad, S., Zaare-Nahandi, F., Mohammadi, N., Alizadeh-Salteh, S. & Safaie, N. 2013, "Effects of salicylic acid on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B accumulation in pistachio (*Pistacia vera* L.) fruit", *Journal of the science of food and agriculture*, .
- Pandit, S., Kim, H.J., Park, S.H. & Jeon, J.G. 2012, "Enhancement of fluoride activity against *Streptococcus mutans* biofilms by a substance separated from *Polygonum cuspidatum*", *Biofouling*, vol. 28, no. 3, pp. 279-287.
- Peng, W., Qin, R., Li, X. & Zhou, H. 2013, "Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.: a review", *Journal of ethnopharmacology*, vol. 148, no. 3, pp. 729-745.
- Petruzzi, M., Grassi, F.R., Nardi, G.M., Martinelli, D., Serpico, R., Luglie, P.F. & Baldoni, E. 2010, "Sodium iodide associated to salicylic acid in the topical management of chronic oral candidiasis: a randomized trial", *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, vol. 24, no. 3, pp. 381-384.
- Piechulla, B. & Degenhardt, J. 2014, "The emerging importance of microbial volatile organic compounds", *Plant, Cell & Environment*, vol. 37, no. 4, pp. 811-812.
- Purves, W.K., Markl, J. & Sadava, D.E. 2011, "Welche Faktoren bedrohen die Existenz von Arten?" in *Biologie*, 9.th edn, Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg, pp. 1649-1650.
- Robinson, W.H. 2005, *Urban insects and arachnids [a handbook of urban entomology]*, Cambridge Univ. Press, Cambridge u.a.
- Sberveglieri, V., Carmona, E.N., Comini, E., Ponzoni, A., Zappa, D., Pirrotta, O. & Pulvirenti, A. 2014, "A novel electronic nose as adaptable device to judge microbiological quality and safety in foodstuff", *BioMed research international*, vol. 2014, pp. 529519.
- Scully, L.R. & Bidochka, M.J. 2006, "Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens", *FEMS microbiology letters*, vol. 263, no. 1, pp. 1-9.
- Seebacher, C., Blaschke-Hellmessen, R. & Bernhardt, H. 1990, *Mykosen Epidemiologie, Diagnostik, Therapie*, Fischer, Jena.
- Sethi, S., Nanda, R. & Chakraborty, T. 2013, "Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases", *Clinical microbiology reviews*, vol. 26, no. 3, pp. 462-475.
- Shestivska, V., Spanel, P., Dryahina, K., Sovova, K., Smith, D., Musilek, M. & Nemecek, A. 2012, "Variability in the concentrations of volatile metabolites emitted by genotypically different strains of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of applied microbiology*, vol. 113, no. 3, pp. 701-713.
- Simonsen, H.T., Adersen, A., Berthelsen, L., Christensen, S.B., Guzman, A. & Molgaard, P. 2006, "Ethnopharmacological evaluation of radial (leaves of *Lomatia hirsuta*) and isolation of 2-methoxyjuglone", *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 6, pp. 29.
- Sritrairat, N., Nukul, N., Inthasame, P., Sansuk, A., Prasirt, J., Leewatthanakorn, T., Piamsawad, U., Dejrudee, A., Panichayupakaranant, P., Pangsomboon, K., Chanowanna, N., Hintao, J., Teanpaisan, R., Chaethong, W., Yongstar, P., Pruphetkaew, N., Chongsuvivatwong, V. & Nittayananta, W. 2011, "Antifungal activity of lawsone methyl ether in comparison with chlorhexidine", *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, vol. 40, no. 1, pp. 90-96.

- Suerbaum, S. & Hahn, H. 2012, "Dermatophyten: Rolle als Krankheitserreger" in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 7, edn, Springer, Berlin, pp. 619-623.
- Taylor, J.W. 2011, "One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR", *IMA fungus*, vol. 2, no. 2, pp. 113-120.
- Thorn, R.M., Reynolds, D.M. & Greenman, J. 2011, "Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro", *Journal of microbiological methods*, vol. 84, no. 2, pp. 258-264.
- Ubbink-Kok, T., Anderson, J.A. & Konings, W.N. 1986, "Inhibition of electron transfer and uncoupling effects by emodin and emodinanthrone in *Escherichia coli*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 30, no. 1, pp. 147-151.
- Vogel, H., Altincicek, B., Glockner, G. & Vilcinskas, A. 2011, "A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*", *BMC genomics*, vol. 12, pp. 308-2164-12-308.
- Wang, Y.C. & Lin, Y.H. 2012, "Anti-gastric adenocarcinoma activity of 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone, an anti-*Helicobacter pylori* compound from *Impatiens balsamina* L", *Fitoterapia*, vol. 83, no. 8, pp. 1336-1344.
- Weber, K., Schulz, B. & Ruhnke, M. 2011, "Resveratrol and its antifungal activity against *Candida* species", *Mycoses*, vol. 54, no. 1, pp. 30-33.
- Wöstemeyer, J. 2009, "Was sind Pilze?" in *Mikrobiologie*, 1.th edn, Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 132-133.
- Yang, X., Summerhurst, D.K., Koval, S.F., Ficker, C., Smith, M.L. & Bernards, M.A. 2001, "Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation", *Phytotherapy Research : PTR*, vol. 15, no. 8, pp. 676-680.
- Zhang, H., Li, C., Kwok, S.T., Zhang, Q.W. & Chan, S.W. 2013, "A Review of the Pharmacological Effects of the Dried Root of (Hu Zhang) and Its Constituents", *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, vol. 2013, pp. 208349.