Untersuchungen zum Organika-Abbaupotential aquatischer Hyphomyceten

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)

von Herrn Dipl.-Biochemiker Torsten Augustin
geb. am: 28.06.1971 in: Görlitz

Gutachter:
1. Prof. Dr. G.-J. Krauß, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. M. Kästner, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle
3. Prof. Dr. F. Bärlocher, Mount-Allison-University, Sackville

Halle/Saale, 03.12.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005975
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005975]

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Aquatische Hyphomyceten aus Gewässern des Mansfelder Landes 1

1.2 Eigenschaften der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) 3

1.3 Der mikrobielle Abbau von PAK 7

1.4 Anliegen und Zielsetzung der Arbeit 8

2 Material und Methoden 11

2.1 Herkunft der aquatischen Hyphomyceten 11

2.2 Kultivierung aquatischer Hyphomyceten 12

2.2.1 Stammkultur 12

2.2.2 Hauptkultur 13

2.2.3 Anzucht mit Vorkultur 15

2.3 Wachstumsuntersuchungen 15

2.3.1 Wachstumsverlauf 15

2.3.2 Wachstum unter PAK-Einfluss 15

2.4 Screening auf ligninolytische Aktivität 16

2.5 Versuche zum Organika-Abbau durch aquatische Hyphomyceten 16

2.5.1 Anzucht 16

2.5.2 Probenaufbereitung 17

2.5.3 HPLC 17

2.5.4 Massenspektrometrische Untersuchungen 19

2.6 Untersuchungen mit ^{13}C-Naphthalen zur Mineralisierung von Naphthalen in Pilzkulturen 19

2.6.1 Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{13}C/^{12}C$ im CO_2-der Gasphase 20

2.6.2 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie 20

2.7 Enzymatische Untersuchungen 21

2.7.1 UDP-Glucuronyltransferase 21

2.7.2 UDP-Glucosyltransferase 23

2.8 Lichtmikroskopische Untersuchungen 23

2.9 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. 1951 24

2.10 Chemikalien 24

3 Ergebnisse 26
3.1 Screening auf ligninolytische Aktivität 26
3.2 PAK-Stoffwechsel aquatischer Hyphomyceten 29
3.2.1 Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in ausgewählten Medien und unter Naphthaleneinfluss 29
3.2.2 Untersuchungen zum Naphthalenmetabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 37
3.2.2.1 Untersuchungen mit ^{13}C-Naphthalen zur Mineralisierung von Naphthalen in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 43
3.2.2.1.1 Zeitabhängiges Isotopenverhältnis $^{12}C/^{13}C$ im CO_2 der Gasphase über Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 43
3.2.2.1.2 Ergebnisse der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie 45
3.2.3 Untersuchungen zum Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 45
3.2.4 Untersuchungen zum Fluorenmetabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 56
3.2.5 Screening auf PAK-Metabolismus 59
3.3 Enzymatische Untersuchungen an *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 60
3.3.1 UDP-Glucuronyltransferase 61
3.3.2 UDP-Glucosyltransferase 64

4 Diskussion 66
4.1 Screening auf ligninolytische Aktivität 67
4.2 PAK-Metabolismus aquatischer Hyphomyceten 72
4.2.1 Metabolismus von Naphthalen und 1-Naphthol in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 73
4.2.1.1 Untersuchungen mit ^{13}C-Naphthalen zur Mineralisierung von Naphthalen in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 78
4.2.2 Einfluss von Kulturparametern auf den Metabolismus von Naphthalen und 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 81
4.2.3 Metabolismus von Fluoren in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 und *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 83
4.3 Enzymatische Untersuchungen an *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 86
4.3.1 UDP-Glucuronyltransferase (EC 2.4.1.17) 87
4.3.2 UDP-Glucosyltransferase 89

4.4 Beurteilung des Xenobiotika-Stoffwechsels von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 aus ökologischer Sicht 90
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick 91

5 Zusammenfassung 94
6 Literatur 95
7 Anhang 118
8 Abkürzungen 131

1 Einleitung

1.1 Aquatische Hyphomyceten aus Gewässern des Mansfelder Landes

Das Mansfelder Land in Mitteldeutschland ist durch eine 8 Jahrhunderte währende Periode des Kupferschieferbergbaus gekennzeichnet. Nach der Entdeckung von Kupferschiefererz in der Nähe von Hettstedt im Jahre 1199 wurden in der Region insgesamt 2,2 Millionen Tonnen Kupfer und 11000 Tonnen Silber gewonnen, davon mehr als drei Viertel in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts (UMWELTSANIERUNG 1996). Durch die Verhüttung der geförderten Erze wurden gasförmige Schadstoffe (Schwefeldioxid) und schwermetallhaltige Stäube emittiert. Die Erosion und Auslaugung von deponierten Schlacken und Theisenschlämmen (verfestigter Flugstaub) führten und führen zum Eintrag von Schwermetallen (Zn, Cu, Pb, As) und Kohlenwasserstoffen in Sicker- und Grundwasser sowie Fliess- und Standgewässer (SCHRECK 1997; FRÜHAUF 1999). So finden sich im Sickerwasser der Theisenschlämme am Stadtborn Hergisdorf Metallgehalte von 2600 mg/L (Zn), 13,25 mg/L (Cu) und 2,8 mg/L (Cd) (Anhang Tab. 22). Das Wasser weist hohe Sulfat- (6750 mg/L) und Nitratkonzentrationen (76,4 mg/L) auf, der PAK-Gehalt beträgt 2,9 µg/L (KRAUSS et al. 2001).
Die hydrochemischen Daten und die Schwermetallbelastung von Standorten, die zur Isolierung von aquatischen Hyphomyceten dienten, sind im Anhang (Tab. 21, Tab. 22) zusammengefasst (KRAUSS et al. 1998, 2001).

Aquatische Hyphomyceten sind eine Gruppe von „mitosporic fungi“, deren asexuelle Vermehrung durch mitotisch gebildete Sporen (Konidien) erfolgt. In traditionellen Systemen werden sie den Fungi imperfecti (Deuteromycotina) zugeordnet (SCHWANTES 1996). Sie bevorzugen saubere, sauerstoffreiche Fliessgewässer und sporulieren unter Wasser (INGOLD 1975; WEBSTER 1987; BÄRLOCHER 1992). Für einen Teil der aquatischen Hyphomyceten konnte neben der anamorphen Form auch ein Teleomorph (sexuelles Stadium) nachgewiesen werden. Diese Pilze werden, in Abhängigkeit von Art der Sporenbildung und Vermehrung, den Ascomyceten oder Basidiomyceten zugeordnet (WEBSTER 1992).

Die Degradation organischer Substanz in Gewässern erfolgt im Allgemeinen durch Bakterien und Pilze. Nach dem Laubfall seneszenter Blätter werden lösliche Bestandteile (Zucker, Aminosäuren) des pflanzlichen Materials ausgelaugt (SUBERKROPP und KLUG 1981; HIEBER und GESSNER 2002). Die nachfolgende Besiedlung durch

Mikroorganismen dominieren Pilze. Neben aquatischen Hyphomyceten sind auch blattbesiedelnde terrestrische Pilze im Wasser lebensfähig. Die Degradation der pflanzlichen Biomasse erfolgt jedoch vorwiegend durch die aquatische Hyphomyceten (BÄRLOCHER 1992; ALLAN 1995). Die Sporulation unter Wasser ermöglicht die Verbreitung im aquatischen Milieu und die Form der Konidien begünstigt das Anhaften an Substrate (WEBSTER 1987; BÄRLOCHER 1992; READ et al. 1992a, b). Aquatische Hyphomyceten verfügen über Enzyme zum Abbau pflanzlicher Biopolymere (CHANDRASHEKAR und KAVERIAPPA 1988; SUBERKROPP 1998) und konditionieren das Blattmaterial für die Nahrungsaufnahme durch Invertebraten. So bevorzugen Makroinvertebraten Blätter, die mit aquatischen Hyphomyceten besiedelt sind (SUBERKROPP 1992).

Eine Beeinträchtigung der Pilzgemeinschaft kann die Aufnahme von Blattmaterial in die Nahrungskette beeinflussen. Für aquatische Hyphomyceten wurden Sensitivitäten gegenüber Schwermetallen nachgewiesen, Wachstum und Sporenbildung können gehemmt werden (ABEL und BÄRLOCHER 1984; BERMINGHAM et al. 1996a, b; MIERSCH et al. 1997; SRIDHAR et al. 2000, 2001). So reduzierte der Ausfluss aus einer Kohlenmine die Artenzahl in betroffenen Flussabschnitten im Vergleich zu unbelasteten Bereichen (MALTBY und BOOTH 1991; BERMINGHAM et al. 1996a). Zwei der Metall-Ionen im Ausfluss (Mn: 0,04 bis 0,3 mg/L; Fe: 0,2 bis 20 mg/L) verminderten die Sporenproduktion von 3 Stämmen, zeigten jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum (BERMINGHAM et al. 1996b). Für Cd, Cu und Zn wurden Hemmung von Wachstum und Sporulation nachgewiesen. Unter Cd-Konzentrationen, die 50 mg/L übersteigen, wurde in vitro die Sporulation reiner Kulturen vollständig unterbunden und das Wachstum um 90 % vermindert (ABEL und BÄRLOCHER 1984; MIERSCH et al. 1997). Im Allgemeinen ist die asexuelle Reproduktion der aquatischen Hyphomyceten Stress-anfälliger als das Wachstum (BÄRLOCHER 1992; ABEL und BÄRLOCHER 1994; SUBERKROPP und CHAUVET 1995; KRAUSS et al. 2001).

Untersuchungen zu aquatischen Hyphomyceten in schwermetallbelasteten Gewässern des Mansfelder Landes zeigen eine Abhängigkeit der Sporulation vom Belastungsgrad. Die Sporenproduktion war in Standorten mit den höchsten Schwermetallkonzentrationen am geringsten. Dennoch konnte eine unerwartet hohe Artendiversität nachgewiesen werden (SRIDHAR et al. 2000; KRAUSS et al. 1998, 2001, 2002a). Einige Stämme der aquatischen Hyphomyceten synthetisieren schwefelreiche Verbindungen (Thiolate), die zu einer Erhöhung der Schwermetalltoleranz beitragen (PIERAU 1999; MIERSCH et al. 1997, 2001).

Neben Schwermetallen können auch organische Schadstoffe zu verminderter Biomasseproduktion und Rückgang der Artzahl aquatischer Hyphomyceten führen (CHANDRASHEKAR und KAVERIAPPA 1989; BERMINGHAM et al. 1998;

RAVIRAJA et al. 1998). In einem indischen Fluss verringerte die Belastung mit organischen Verbindungen die Artenzahl auf unter 20 % im Vergleich zu unbelasteten Gewässern (RAVIRAJA et al. 1998). Das Herbizid Mecoprop reduzierte in vitro die blattassoziierte Biomasse eines Stammes des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (BERMINGHAM et al. 1998). In den Gewässern des Mansfelder Landes wurden als Kontamination organischen Ursprungs polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen (KRAUSS et al. 1998, 2001, 2002a) (Anhang Tab. 21).

1.2 Eigenschaften der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK)

Als polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) werden Verbindungen bezeichnet, deren Struktur zwei oder mehr kondensierte Benzenringe aufweist. Diese Stoffklasse enthält aufgrund der Vielzahl von möglichen Isomeren zahlreiche Verbindungen. Heterozyklische Verbindungen, die Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome enthalten, weisen vergleichbare Eigenschaften auf und können den PAK ebenfalls zugeordnet werden (SIMS und OVERCASH 1983).

PAK sind durch geringe Wasserlöslichkeit, relativ hohe Siede- und Schmelzpunkte und niedrige Dampfdrücke gekennzeichnet. Diese Eigenschaften korrelieren in der Regel mit dem Kondensationsgrad. Die Toxizität und das häufige Vorkommen in der Umwelt führte zur Aufnahme von 16 unsubstituierten PAK in eine „List of priority pollutants“ durch die amerikanische EPA (Environmental Protection Agency) (KEITH und TELLIARD 1979). Die gewählten Aromaten gelten als repräsentativ für die PAK-Belastung von Standorten. In der deutschen Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) sind fünf dieser Substanzen mit Grenzwerten aufgeführt. Die Strukturformeln der 16 PAK der EPA-Liste sind in Abb. 1, ausgewählte physikalische und chemische Eigenschaften in Tab. 1 zusammengestellt.

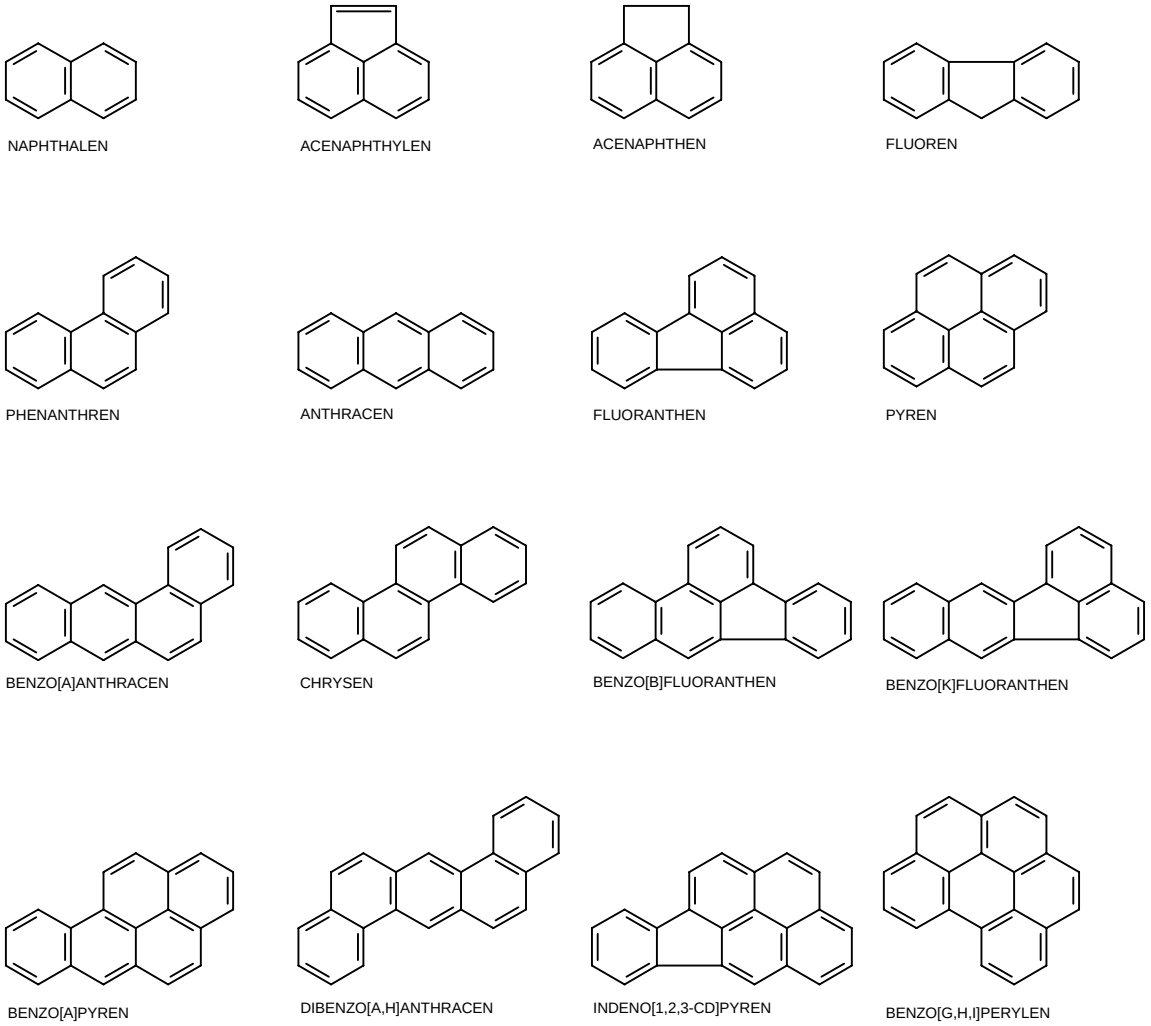


Abb. 1: Strukturformeln der PAK der EPA-Liste

Tab. 1: Physikochemische Eigenschaften der PAK der EPA-Liste (Zusammenstellung nach KÄSTNER 2000); PAK in der deutschen Trinkwasserverordnung sind hervorgehoben

PAK	Summen-formel	M_r	Schmp. [°C]	Sdp. [°C]	Dampfdruck [mPa]	Wasser-löslichkeit [mg/L]	log Kow
Naphthalen	$C_{10}H_8$	128	80	218	$10{,}8\cdot10^{3}$	30,0	3,37
Acenaphthylen	$C_{12}H_8$	152	92	265	-	3,93	4,07
Acenaphthen	$C_{12}H_{10}$	154	96	279	$1{,}16\cdot10^{3}$	3,47	4,33
Fluoren	$C_{13}H_{10}$	166	116	298	$4{,}5\cdot10^{2}$	1,98	4,18
Phenanthren	$C_{14}H_{10}$	178	101	340	$9{,}3\cdot10^{1}$	1,29	4,46
Anthracen	$C_{14}H_{10}$	178	218	342	$1{,}1\cdot10^{1}$	0,073	4,45
Fluoranthen	$C_{16}H_{10}$	202	110	375	$2{,}4\cdot10^{2}$	0,26	5,33
Pyren	$C_{16}H_{10}$	202	150	404	$1{,}6\cdot10^{0}$	0,135	5,32
Benzo[a]anthracen	$C_{18}H_{12}$	228	159	435	$1{,}0\cdot10^{-1}$	0,014	5,61
Chrysen	$C_{18}H_{12}$	228	256	448	$1{,}5\cdot10^{-3}$	0,0006	5,86
Benzo[b]fluoranthen	$C_{20}H_{12}$	252	168	-	$2{,}9\cdot10^{-2}$	0,0012	6,57
Benzo[k]fluoranthen	$C_{20}H_{12}$	252	217	480	$1{,}8\cdot10^{-2}$	0,0006	6,84
Benzo[a]pyren	$C_{20}H_{12}$	252	179	495	$3{,}8\cdot10^{-3}$	0,0038	6,04
Dibenzo[a,h]anthracen	$C_{22}H_{14}$	278	267	524	$6{,}7\cdot10^{-6}$	0,0005	6,75
Indeno[1,2,3-cd]pyren	$C_{22}H_{12}$	276	162	-	-	0,062	7,66
Benzo[g,h,i]perylen	$C_{22}H_{12}$	276	278	-	$1{,}8\cdot10^{-4}$	0,0003	7,23
Referenzen			1	1,2	3	2,4,5	1,2,3,4,6

(1) SIMS und OVERCASH 1983; (2) KOCH und WAGNER 1989; (3) BECK et al. 1995;
(4) RICHARDSON und GANGOLLI 1993; (5) RIPPEN 1994; (6) MEANS et al. 1980

Schmp.: Schmelzpunkt; Sdp.: Siedepunkt; log Kow: Octanol-Wasser Koeffizient

PAK entstehen vorwiegend bei der Verbrennung fossiler Energieträger oder als Nebenprodukte industrieller Prozesse (RAMDAHL 1985). Ihr Eintrag in die Umwelt erfolgt über eine Vielzahl von Quellen, wie Direkteintrag aus der Luft, als Folge von Unfällen während Transport, Nutzung und Entsorgung von Petroleumprodukten und aus natürlichen Sourcen (GIGER und BLUMER 1974, LAFLAMME und HITES 1978).

Die geringe Wasserlöslichkeit der PAKs führt zu einer hohen Verweildauer in der Umwelt. PAK adsorbieren sehr schnell an Sedimente und verbleiben im Boden bis sie durch Verdampfung, Photooxidation, chemische Oxidation, Bioakkumulation, mikrobielle Prozesse oder Erdaushub entfernt werden (HITES et al. 1980; MEANS et al. 1980; GSCHWEND und HITES 1981; CERNIGLIA 1992; KÄSTNER und STOTTMEIER 2000).

Aufgrund toxischer, mutagener oder karzinogener Wirkungen stellen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe eine Gefahr für die Umwelt und die menschliche Gesundheit dar (THAKKER et al. 1985; DIPPLE et al. 1990; MENZIE et al. 1992; KALF et al. 1997; WEISSENFELS 1998). Hydrophobie, Verweildauer in der Umwelt und Genotoxizität steigen mit dem Kondensationsgrad an. Die Toxizität höherkondensierter PAK zeigt sich in ihrer karzinogenen Wirkung (MILLER und MILLER 1981; JACOB et al. 1986; MENZIE et al. 1992; ATSDR 1995) (Tab. 2).

Tab. 2: Toxizität ausgewählter PAK (aus WEISSENFELS 1990)

PAK	akute Toxizität	chronische Toxizität	
	LD_{50} oral [mg/kg Körpergewicht]	Karzinogenität pro [kg Körpergewicht]	Mutagenität Ames-Test
Naphthalen	310	-	-
Acenaphthen	n.b.	?	+
Fluoren	n.b.	-	-
Phenanthren	700	?	-
Anthracen	nb	3,3 g	-
Fluoranthen	500	?	+
Pyren	510	?	?
Benzo[a]anthracen	n.b.	2 mg	+
Chrysen	320	99 mg	+
Benzo[a]pyren	250	2 µg	+
Dibenzo[a,h]anthracen	n.b.	6 µg	+
Indeno[1,2,3-cd]pyren	n.b.	+	+

LD_{50} oral: Letale Dosis für 50 % der Versuchstiere (Ratten, Mäuse) ; n.b.: nicht bestimmt; ?: Ergebnis nicht eindeutig

Die Konzentration der PAKs in der Umwelt variiert in Abhängigkeit von industrieller Infrastruktur und Kontamination mit Erdölprodukten (JONES et al. 1989; WILD et al. 1991). In industriefreien Gebieten wurden einige Nanogramm PAK je Gramm Boden nachgewiesen, in einer Ölraffinerie dagegen betrug die PAK-Belastung 1,79 mg/g Boden (JOHNSON und LARSEN 1985).

1.3 Der mikrobielle Abbau von PAK

Die Dekontamination von PAK-belasteten Sedimenten und Oberflächenböden erfolgt vorwiegend durch mikrobielle Degradation (SIMS et al. 1990). Der Abbau kann vollständig (Mineralisation) oder teilweise durch mikrobielle Konsortien oder Mikroorganismen einer Art erfolgen (CERNIGLIA 1984; GIBSON und SUBRAMANIAN 1984; CERNIGLIA 1992; KÄSTNER 2000).

Die Fähigkeit zum Abbau von PAK wurde für eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Algen nachgewiesen (CERNIGLIA 1992).

Niedrigmolekulare PAK werden in der Regel schneller als höhermolekulare PAK abgebaut (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989). Die mikrobielle Degradation niedermolekularer PAK, wie Naphthalen, Phenanthren, Anthracen oder Acenaphthen ist gut untersucht (GIBSON und SUBRAMANIAN 1984; SCHOCKEN und GIBSON 1984; CERNIGLIA et al. 1992; POTHULURI et al. 1992a).

Der Katabolismus von PAK in Prokaryoten und Eukaryoten erfordert molekularen Sauerstoff für eine enzymatische Reaktion am organischen Molekül. Enzyme, die diese Reaktionen vermitteln sind Dioxygenasen und Cytochrom P450 Monooxygenasen (GIBSON et al. 1968; DAGLEY 1971; GIBSON und SUBRAMANIAN 1984; HOLLAND 1994; SUTHERLAND et al. 1995; BEZALEL et al. 1997; SLIGAR 1999). Weitere Enzymsysteme, die einen Abbau von PAK ermöglichen, sind Methan-Monooxygenasen (COLBY et al. 1977; DALTON et al. 1981; WALTERS et al. 1999) und Enzyme des ligninolytischen Systems (BUMPUS 1989; HAMMEL 1995; SACK et al. 1997b; GÜNTHER et al. 1998; HOFRICHTER et al. 1998). Abb. 2 zeigt eine Übersicht über die bekannten Abbauwege des mikrobiellen PAK-Stoffwechsels.

Die Metabolisierung von PAK mit Hilfe von Cytochrom P-450 Monooxygenasen wird vorwiegend in Säugerzellen und filamentösen Pilzen beobachtet. Bakterien können ebenfalls Monooxygenase-Aktivitäten aufweisen (SCHOCKEN und GIBSON 1984; HEITKAMP et al. 1988; KELLEY et al. 1990; SUTHERLAND et al. 1990; SUTHERLAND et al. 1995), vorrangig leitet jedoch die Dioxygenase-Reaktion den Abbau ein.

Für Mikroalgen wurde ein Dioxygenase-System nachgewiesen (SCHOENY et al. 1988; WARSHAWSKY et al. 1988, 1995; SEMPLE et al. 1999). Algen nehmen somit eine Ausnahmestellung unter den eukaryotischen Organismen ein, da dieses Enzymsystem kennzeichnend für Bakterien ist. Neben cis-Dihydrodiolen bilden Algen auch trans-Dihydrodiole (CERNIGLIA et al. 1980a und 1980b; SEMPLE et al. 1999).

Weissfäulepilze können - im Vergleich zu nicht-ligninolytischen Pilzen - PAK über einen weiteren Abbauweg metabolisieren. Ligninolytische Enzyme vermitteln unspezifische

Reaktionen mit Sauerstoffradikalen, die zur Bildung von PAK-Chinonen führen. Eine Mineralisierung bis zum CO_2 ist möglich (BUMPUS et al. 1985; SACK et al. 1997b; GÜNTHER et al. 1998; HOFRICHTER et al. 1998).

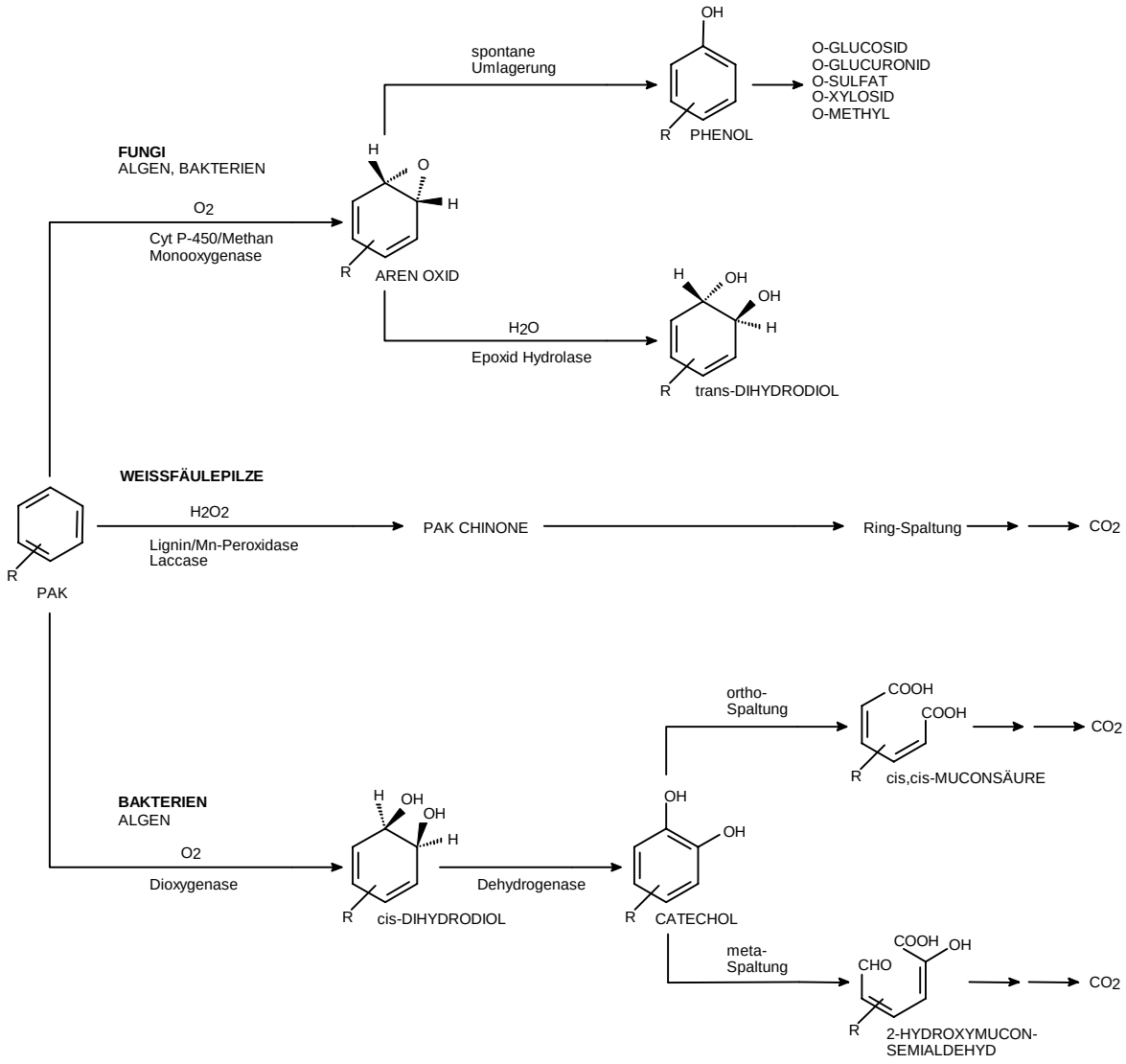


Abb. 2: Übersicht über den mikrobiellen Katabolismus von PAK (nach CERNIGLIA 1992; KÄSTNER 2000)

1.4 Anliegen und Zielsetzung der Arbeit

Aquatische Hyphomyceten sind ein bedeutender Bestandteil der Nahrungskette in Frischwassersystemen. Sie vermitteln den Biomassetransfer zwischen eingetragenen Blättern und Detritus-verwertenden Organismen und beeinflussen so die Dekomposition organischer Materialien (DIX und WEBSTER 1995).

In den schwermetallbelasteten Oberflächen- und Grundwässern des Mansfelder Landes könnten die nachgewiesenen aquatischen Hyphomyceten (KRAUSS et al. 1998, 2001, 2002a, 2002b; SRIDHAR et al. 2000) zur Bioremedation durch die Stimulation nativer mikrobieller Populationen beitragen. Diese ökologische Funktion wurde bereits für Bakterien beschrieben (MADSON et al. 1991). Anpassung an das wässrige Milieu und Schwermetalltoleranz prädestinieren aquatische Hyphomyceten für Untersuchungen zur Bioremedation und Entgiftung von Standorten, die Mehrfachbelastungen durch Schwermetalle und organische Xenobiotika (z. B. PAK) aufweisen.
Zur mikrobiellen Biodegradation in PAK-belasteten Standorten durch aquatische Hyphomyceten liegen keine Erkenntnisse vor, da sich Studien vorwiegend mit Bakterien und Pilzen, die den Basidiomyceten (insbesondere Weissfäulepilze) oder Zygomyceten zugeordnet werden, beschäftigen (HAMMEL 1995; CERNIGLIA 1997; KÄSTNER 2000).

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Stämmen aquatischer Hyphomyceten aus Gewässern des Mansfelder Landes hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum PAK-Abbau. Da aquatische Hyphomyceten aus schwermetallbelasteten Gewässern bisher nicht Gegenstand solcher Studien waren, sollten Vorversuche zu einer ersten Bewertung möglicher Abbaupotentiale beitragen. Über Screenings zum Abbau von organischen Verbindungen (Lignin) und Charakterisierung des Wachstumsverhalten in Reinkultur und unter PAK-Einfluss sollten aus den verfügbaren Isolaten geeignete Kandidaten für weiterführende Versuche zum PAK-Metabolismus gewählt werden. Metabolite des PAK-Stoffwechsels sollten mittels HPLC-DAD und Massenspektrometrie identifiziert und der Einfluss von Kulturparametern (Zusammensetzung Nährlösung) bestimmt werden. Eine Bewertung der Ergebnisse sollte die verfügbaren Daten zur Belastung der ursprünglichen Standorte und bekannte Abbauwege der mikrobiellen PAK-Degradation einbeziehen.

Als Modellverbindungen für die PAK wurden Naphthalen und Fluoren gewählt.
Naphthalen, ein bizyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, und seine methylierten Derivate werden den giftigsten Verbindungen in der wasserlöslichen Fraktion des Petroleums zugerechnet (ANDERSON et al. 1974). Naphthalen ist der am häufigsten nachgewiesene polyzyklische Kohlenwasserstoff an PAK-kontaminierten Standorten (GRIMMER und POTT 1983). Naphthalen wird von der EPA (US Environmental Protection Agency) als „priority toxic pollutant“ eingeordnet (US EPA 1980a, b). Für verschiedene Organismen konnte eine Verringerung der Hämoglobinkonzentration und eine Hemmung des Sauerstoffkonsums nach Naphthalenexposition nachgewiesen werden (STRUBLE und HARMON 1983; DARVILLE und WILHM 1984). Toxische Wirkung wurde u.a. auch für Neugeborene beschrieben (SITTING 1985).

Der Metabolismus von Naphthalen in Bakterien und filamentösen Pilzen wurde intensiv untersucht (CERNIGLIA und GIBSON 1977; HEITKAMP et al. 1987; CERNIGLIA et al. 1992; SUTHERLAND et al. 1995; KÄSTNER 2000; ROCKNE et al. 2000; UZ et al. 2000; BENNETT et al. 2002; CERNIGLIA und SHUTTLEWORTH 2002; FERRERO et al. 2002).

Fluoren, ein trizyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, ist ein Hauptbestandteil fossiler Brennstoffe (WISE et al. 1988). Es wurde in Atmosphäre, Frischwasser und Sedimenten nachgewiesen (FERNANDEZ et al. 1992; GRIFOLL et al. 1992; CASELLAS et al. 1995). Fluoren weist eine hohe Toxizität für Fische (THOMAS et al. 1981) und Wasseralgen (HSIEH et al. 1980) auf und besitzt karzinogenes Potential (DANZ et al. 1992).

Der mikrobielle Fluorenabbau durch Bakterien und filamentöse Pilze wurde verstärkt in den letzten Jahren untersucht (BOLDRIN et al. 1993; POTHULURI et al. 1993; TRENZ et al. 1994; CASELLAS et al. 1997; BRESSLER und FEDORAK 2000; GARON et al. 2000; KÄSTNER 2000).

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der aquatischen Hyphomyceten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme aquatischer Hyphomyceten wurden von Fr. Dr. G. Krauß (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Sektion Hydrogeologie) aus Gewässern des Mansfelder Landes isoliert und identifiziert (KRAUSS et al. 1998, 2001).
Zur Isolation werden in Netze eingenähte Erlenblätter in Oberflächengewässern für 2 oder 4 Wochen exponiert. Erlenblätter sind ein bevorzugtes Substrat von Wasserpilzen und werden von ihnen kolonisiert (BÄRLOCHER 1992). Im Anschluss an die Exposition werden die Blätter gewaschen und in 75 mL Wasser (destilliert, steril) zur Anregung der Sporulation für 48 h bei 20 °C belüftet. Einzelne Sporen werden unter dem Mikroskop identifiziert und auf Agarplatten - zur Etablierung reiner Oberflächenkulturen - überführt. Die Kontrolle der Oberflächenkultur auf Artenreinheit erfolgt durch erneute Sporulation.

Die Stämme stammen von folgenden Oberflächengewässern der Regionen um Mansfeld und Bitterfeld:

Grube Johannes Bitterfeld (Jo)
Sammelteich Sanderschacht (bei Helbra) – H3
Stadtborn Hergisdorf – H4
Spülfeld Wormsleben – H5
Bach „Böse Sieben“ (bei Wormsleben) – H6
Bach „Böse Sieben“ (bei Eisleben) – H7
Bach „Glume“ (bei Eisleben) – H8
Südlicher Auslauf des „Süßen Sees“ (bei Seeburg) – H9

Von diesen Standorten wurden folgende Isolate zur Verfügung gestellt:

Heliscus lugdunensis Sacc. & Thérry

H3-2-5	(Sammelteich Sanderschacht)
H4-2-4	(Stadtborn Hergisdorf)
H6-06-10	(„Böse Sieben“, Wormsleben)
H8-2-1	(„Glume“, Eisleben)
H8-06-10	(„Glume“, Eisleben)

H9-06-15 (Südl. Auslauf „Süßer See“)

Anguillospora sp.
H4-02-3 (Stadtborn Hergisdorf)
Gr. Joh. 06-5 (Grube Johannes, Bitterfeld)

Tetracladium marchalianum de Wild
H8-2-2 („Glume“, Eisleben)

Lemonniera aquatica de Wild
H9-06-L3 (Südl. Auslauf „Süßer See“)

Phialophora sp.
H9-06-An1 (Südl. Auslauf „Süßer See“)

Zum Vergleich wurde ein *Heliscus lugdunensis*-Stamm (Hel BB) aus einem nahezu unbelasteten kanadischen Gewässer (Boss Brook, nahe Sackville, BC) kultiviert.

Die asexuelle Vermehrung der aquatischen Hyphomyceten durch mitotisch gebildete Sporen sind das Kriterium für die Einordnung in die Gruppe der „mitosporic fungi“ (ehemals: Fungi imperfecti, Deuteromycotina). Ein Teil der aquatischen Hyphomyceten ist zur Bildung von sexuellen Stadien fähig. Art der Sporenbildung und Vermehrung führen dann zur Einordnung als Ascomyceten oder Basidiomyceten (WEBSTER 1992).
Von den untersuchten Stämmen ist *Heliscus lugdunensis* die anamorphe Form (asexuell) des Teleomorph (sexuell) *Nectria lugdunensis*. Beide Formen werden der Ordnung Hypocreales (Unterreich Ascomycotina, Familie Hypocreaceae) zugeordnet (MARVANOVÁ, persönliche Mitteilung).
Neben aquatischen Hyphomyceten können auch einige terrestrische Arten im Wasser sporulieren. Der isolierte terrestrische Hyphomycet *Phialophora* sp. wird den Deuteromycotina zugeordnet.

2.2 Kultivierung aquatischer Hyphomyceten

2.2.1 Stammkultur

Die Stammkulturen der isolierten aquatischen Hyphomyceten wurden als Oberflächenkulturen mit 1 % Malz in 1,5 % Agar geführt. Zur Passage der Pilzstämme

wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 7 mm) Agarstücke aus einer kultivierten Agarplatte ausgestanzt und auf eine neue Agarplatte gelegt. Die beimpften Platten wurden bei 15 °C gelagert. In regelmässigen Abständen wurden die Stammkulturen passagiert.

2.2.2 Hauptkultur

Flüssigmedien unterschiedlicher Zusammensetzung wurden für die Hauptkulturen der aquatischen Hyphomyceten eingesetzt. Hierzu wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 7 mm) 10 Myzelstücke aus der Wachstumszone einer Oberflächenkultur (s. Kap. 2.2.1) ausgestanzt, in 10 mL steriles destilliertes Wasser überführt und mit einem Ultraturrax® homogenisiert. 1 mL des Homogenisats dienten zur Inokulation von 75 mL Flüssigmedium.
Die Volumina der Hauptkulturen wurden variiert. Die Anzucht der aquatischen Hyphomyceten in 50 mL, 150 mL oder 250 mL Flüssigmedium erfolgte in getönten 250 mL – Flaschen von SCHOTT mit teflonbeschichteten Schraubverschlüssen. Für Ansätze mit 10 mL Flüssigmedium wurden 100 mL-Serumflaschen mit Butyl-Stopfen und Aluminium-Kappen verwendet. Die Kulturen wurden in Dunkelheit bei 15 °C mit 120 min^{-1} geschüttelt.

Die Hauptkulturen der aquatischen Hyphomyceten wurden in Malz/Pepton-, Mineral- und einem Komplexmedium mit Erlenblättern geführt:

Malz/Pepton-Medium

Pepton	1	g
Malzextrakt	5	g
Aqua dest.	ad	1 L
		pH 5,2

Kirk-Medium (nach TIEN und KIRK 1988)

KH_2PO_4	2,0	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5	g
$CaCl_2$	0,1	g
Mineralsalzlösung	10	mL
Vitaminlösung[1]	1,5	mL
NH_4NO_3	48	mg
L-Asparagin	79	mg
D-Glucose	10	g
Aqua dest.	ad	1 L
	mit NaOH auf pH	4,5

[1)] wurde sterilfiltriert (0,2 µm, Schleicher und Schuell) und dem Medium nach dem Autoklavieren zugegeben

Mineralsalzlösung (nach TIEN und KIRK 1988)

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	3,0	g
Nitrilotriacetat	1,5	g
NaCl	1,0	g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,5	g
$CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$	180	mg
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	180	mg
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	100	mg
$ZnSO_4$	100	mg
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$	18,5	mg
$NaMoO_4 \cdot 2\ H_2O$	12	mg
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	10	mg
H_3BO_3	10	mg
Aqua dest.	ad	1 L

Vitaminlösung (nach TIEN und KIRK 1988)

Pyridoxin · HCl	10	mg
p-Aminobenzoesäure	5	mg
D,L-Kalziumpanthothenat	5	mg
Liponsäure	5	mg
Nicotinsäure	5	mg
Riboflavin	5	mg
Thiamin · HCl	5	mg
Biotin	2	mg
Folsäure	2	mg
Cyanocobalamin	0,1	mg
Aqua dest.	ad	1 L

Für das Komplexmedium wurden Blätter von *Alnus glutinosa* (Schwarzerle) gesammelt, gewaschen, gefriergetrocknet und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das erhaltene Pulver wurde in destilliertem Wasser suspendiert (5 g/L) und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Extrakt zur Entfernung von Blattpartikeln sterilfiltriert. Die Inokulation erfolgte wie bei den anderen Kulturansätzen (s. o.).
Mit diesem Komplexmedium sollten die Nährstoffverhältnisse im natürlichen Lebensraum der Wasserpilze nachgestellt werden. Erlenblätter sind ein bevorzugtes Substrat der untersuchten Pilze und werden von ihnen als Erstbesiedler für Nachfolgeorganismen konditioniert. Mittels Elementaranalyse wurde der Kohlenstoff- (45 %), Stickstoff- (2,8 %) und Schwefelgehalt (0,4 %) der gefriergetrockneten Blätter bestimmt (G. KRAUSS, persönliche Mitteilung).

2.2.3 Anzucht mit Vorkultur

Bei der Anzucht mit Vorkultur wurde eine Kultur des Pilzes in Malz/Pepton-Medium (150 mL), wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben, angelegt. Nach 5 Tagen wurde der Pilz vom Medium mittels Filtration abgetrennt und mit frischem Flüssigmedium gewaschen. Der gewaschene Pilz wurde in Mineralmedium oder Malz/Pepton-Medium resuspendiert, wobei auf das ursprüngliche Volumen der Vorkultur aufgefüllt wurde.

2.3 Wachstumsuntersuchungen

2.3.1 Wachstumsverlauf

Zur Bestimmung des Wachstumsverlaufes wurden Kulturen der Stämme, wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben, angesetzt. Die Zunahme der Biomasse wurde über das Trockengewicht ermittelt. Hierzu wurden an jedem Tag 3 Parallelen über Cellulosefilter von Millipore (SCWP 04700) abgesaugt und das Pilzmyzel für 48 h bei 85 °C getrocknet.

2.3.2 Wachstum unter PAK-Einfluss

Zur Charakterisierung der Isolate (s. Kap. 2.1) und zur Identifizierung von Stämmen mit der Fähigkeit zum PAK-Metabolismus wurden Wachstumsuntersuchungen durchgeführt. Die Anzucht der Stämme erfolgte in Flüssigkulturen (s. Kap. 2.2.2). Nach 48 h wurden Naphthalen, 1-Naphthol oder Fluoren zugesetzt (gelöst in N,N-Dimethylformamid). Nach

weiteren 5 Tagen wurden die Ansätze, wie unter Kap. 2.5.2 beschrieben, aufgearbeitet und auf Metabolite untersucht. Zur Bestimmung des Wachstums wurde die Trockenmasse des Pilzmyzels bestimmt.

2.4 Screening auf ligninolytische Aktivität

Das Screening auf ligninolytische Aktivität lehnte sich an das Testverfahren von SUNDMAN und NÄSE (1971) an. Hierzu wurde heißem Agarmedium 0,05 % (w/v) Lignin unterschiedlicher chemischer Struktur (Handelsnamen: organosolv, hydrolytisch, alkali) zugesetzt und im Autoklaven sterilisiert. Das homogenisierte Testmedium wurde in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erkalten wurden die Medien mit 12 Stämmen aquatischer Hyphomyceten (s. Kap. 2.1) beimpft.
Das Impfen erfolgte durch das Auflegen von Agarstücken, die zuvor aus einer Oberflächenkultur (s. Kap. 2.2.1) ausgestanzt wurden. Nach 14-tägiger Inkubation der Agarplatten bei 15 °C wurde das Pilzmyzel von der Oberfläche mit einer Rasierklinge abgeschabt. Die Nachweisreaktion erfolgte durch Fluten der Platten mit jeweils 10 mL einer Testlösung, die zu gleichen Teilen aus 1 %-igen (w/v) Lösungen von $FeCl_3$ und $K_3[Fe(CN)_6]$ bestand. Innerhalb von ca. 7 min wurde der Testagar durch das Reagenz grün gefärbt. Farblose Zonen zeigten den Abbau von Lignin an.
Die Untersuchungen wurden auf Voll- (1 % Malzextrakt, 0,1 % Pepton und 1,5 % Agar) und Mangelmedium (0,1 % Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle, 1,5 % Agar) durchgeführt. Als Kontrolle dienten Kulturen auf Vollmedium ohne Ligninpräparate.

2.5 Versuche zum Organika-Abbau durch aquatische Hyphomyceten

2.5.1 Anzucht

Die Anzucht der Pilze für Abbauversuche erfolgte wie unter Kap. 2.2 beschrieben.
Die Kultivierung erfolgte im unbeleuchteten Kühlraum bei 15 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 min^{-1}. Nach 48 h wurden die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) in gelöster Form zugegeben. Als Lösungsmittelvermittler diente N,N-Dimethylformamid (PAK-Konzentration: 1 mg/20 µL). Mitgeführte Kontrollansätze enthielten Medium, Medium mit Pilz oder Medium mit PAK. Nach weiteren 5 Tagen wurden die Ansätze aufgeschlossen

2.5.2 Probenaufbereitung

Nach Inkubation der Versuchsansätze wurde der Pilz mit einem Ultraturrax® im Medium homogenisiert. Eine anschliessende Essigesterextraktion überführte die hydrophoben Verbindungen aus dem Medium in die organische Phase. Nach 3-maligem Ausschütteln wurden die Essigester-Phasen vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des wasserfreien Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Resuspension der Rückstände in 1-1,5 mL Acetonitril konnte die Analyse auf Metabolite mittels HPLC (s. Kap. 2.5.3) durchgeführt werden.
Die verbliebene wässrige Phase wurde mit dem dreifachen Volumen eines aus gleichen Teilen bestehenden Ethanol/Methanol-Gemisches versetzt und bei 10000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Rückstände wurden in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) aufgenommen und mittels HPLC (s. Kap. 2.5.3) analysiert (CERNIGLIA et al. 1982).

2.5.3 HPLC

Die HPLC für die PAK-Metabolite wurde auf einer L5000-Anlage von MERCK mit 655A-11 Pumpe und 655A-52 Säulenofen durchgeführt. Als Detektoren dienten ein Photodiodenarray HP 1050-DAD und ein Fluoreszenzdetektor HP 1046A (beide von HEWLETT-PACKARD). Die untersuchten Substanzen wurden auf einer MERCK LiChrospher-Säule (RP 18; 250 × 4 mm, 5 µm) getrennt. Zum Schutz des chromatographischen Materials wurde eine Vorsäule (RP 18) eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL.
Die Verbindungen wurden über Retentionszeit und UV-Spektrum identifiziert. Hierzu wurde mit Standardsubstanzen eine Spektrenbibliothek erstellt. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte über die Methode des externen Standards.

Die hydrophoben Metabolite, die in die Essigesterphasen übergegangen waren (s. Kap. 2.5.2), wurden nach Abziehen des Lösungsmittels, Resuspension in Acetonitril und Injektion in die HPLC mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten chromatographisch getrennt (s. Tab. 3). Die Flussrate betrug 0,8 mL/min. Detektiert wurde mit dem DAD bei 250 und 280 nm. Die Fluoreszenz wurde bei λ_{em} 380 nm - nach Anregung mit λ_{ex} 252 nm – gemessen.

Tab. 3: HPLC-Gradient zur Trennung hydrophober PAK-Metabolite

Zeit [min]	% Acetonitril	% Wasser	Fluss [mL/min]
0,0	40	60	0,8
10,0	40	60	0,8
30,0	100	0	0,8
40,0	100	0	0,8
41,0	40	60	0,8
50,0	40	60	0,8

Die hydrophilen Metabolite wurden nach Abziehen des Lösungsmittelgemisches, Resuspension in Methanol/Wasser und Injektion in die HPLC mit einem Gradienten zwischen 1 %-igem Triethylamin in Wasser (pH 5,3; eingestellt mit Essigsäure) und Methanol getrennt (modifiziert nach THOMPSON et al. 1996) (Tab. 4).

Tab. 4: HPLC-Gradient zur Trennung hydrophiler PAK-Metabolite

Zeit [min]	% A	% B	Fluss [mL/min]
0,0	100	0	0,7
6,0	100	0	0,7
6,1	36	64	0,7
18,0	36	64	0,7
18,1	100	0	0,7
30,0	100	0	0,7

A:	55%	H_2O (1 % Triethylamin) pH 5,3
	45%	Methanol
B:	100%	Methanol

Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 0,7 mL/min und einer Säulentemperatur von 35 °C. Detektiert wurde bei 280 nm und λ_{em} 350 nm (λ_{ex} 290 nm).

Für die chromatographischen Methoden wurde die analytische Streuung der quantitativen Bestimmung ermittelt. Hierzu wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Standardsubstanzen (10 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL) jeweils fünf mal injiziert und die Standardabweichungen der Messwerte berechnet. Die analytischen Streuungen wurden für Naphthalen und 1-Naphthol (Methode zur Trennung hydrophober Verbindungen), sowie für 1-Naphthylsulfat (Trennung hydrophiler Verbindungen) bestimmt.

2.5.4 Massenspektrometrische Untersuchungen

In Vorbereitung zur Massenspektrometrie wurde das Eluat der HPLC-Analyse (s. Kap. 2.5.3) fraktioniert. Entsprechende Fraktionen mehrerer HPLC-Läufe wurden vereinigt und unter Stickstoffstrom eingeengt. Die Metabolite wurden mittels GC-EIMS oder HPLC-IES-MS analysiert.
Für die GC-EIMS wurde eine DB-5MS-Säule (J&W; 15 m; ID: 0,32 mm; Filmdicke: 0,25 µm) bei einem Gasfluss von 0,8 mL Helium/min eingesetzt. Die Messungen erfolgten auf einem THERMOQUEST Voyager (70 eV EI, Quellentemperatur: 200 °C, Injektortemperatur: 250 °C, Interface-Temperatur: 300 °C, splitlose Injektion). Die Säulentemperatur wurde, ausgehend von 60 °C (1 min), mit einem Temperaturgradienten von 30 °C/min auf 220 °C erhöht und bei dieser Temperatur für 5 min beibehalten.

Für die HPLC-ESI-MS wurde eine RP18-Säule (5 µm, 1×100 mm, SEPSER V) auf einer MICRO-TECH Ultra-Plus MicroLC mit einem Linear™UVIS 200 UV-Detektor (λ: 280 nm) eingesetzt. Der Gradient der HPLC-Trennung ist in Tab. 5 aufgelistet. Die Elektrospray-Massenspektren negativer Ionen wurden im Anschluss an die HPLC mit einem FINNIGAN MAT TSQ 7000 gemessen.

Tab. 5: Lösungsmittelgradient für die HPLC-IES-MS

Zeit [min]	% A	% B	Fluss [mL/min]
0,0	85	15	0,07
15,0	10	90	0,07
25,0	10	90	0,07

A: H_2O (0,2 % Essigsäure)

B: Methanol (0,2 % Essigsäure)

2.6 Untersuchungen mit ^{13}C-Naphthalen zur Mineralisierung von Naphthalen in Pilzkulturen

Für Untersuchungen zur Metabolisierung und Mineralisierung von Naphthalen wurde der Pilz in einer Malz-Pepton-Vorkultur angezogen (s. Kap. 2.2.3). Nach 5 Tagen wurde der Pilz vom Medium mittels Filtration abgetrennt und mit Mineralmedium (s. Kap. 2.2.2) gewaschen. Der gewaschene Pilz wurde in Mineralmedium resuspendiert. Die Hauptkultur

wurde auf das Volumen der Vorkultur aufgefüllt. Als organische C-Quelle wurden 50 mg Glucose/L Mineralmedium zugegeben. Von der Hauptkultur wurden mit einer sterilen Pipette jeweils 10 mL abgenommen und in 100 mL Serumflaschen mit Butylstopfen überführt. Nach einer Stunde wurde den Ansätzen in den Serumflaschen 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen (SIGMA-ALDRICH, 99 Atomprozent), gelöst in N,N-Dimethylformamid, zugesetzt. Es wurden Kontrollen mit Pilz ohne Naphthalen und mit Naphthalen ohne Pilz mitgeführt. In allen Proben wurde täglich der Kohlendioxidgehalt der Gasphase bestimmt. An den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 10 wurden komplette Versuchsreihen – bestehend aus Abbauansätzen und Kontrollen – aufgeschlossen und wie unter Kap. 2.5.2 beschrieben für die GC/C-IRMS präpariert.

2.6.1 Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{13}C/^{12}C$ im CO_2-der Gasphase

Zur Messung des Isotopenverhältnisses wurden täglich mit einer Injektionsspritze Proben aus dem Luftraum der Ansätze entnommen und mittels GC-MS analysiert. Injiziert wurden 50 µL auf eine CHROMPAK Poraplot-Säule (25 m; ID 0,32 mm; Filmdicke 10 µm; T: 40 °C). Der Fluss des Trägergases Helium betrug 1,5 mL/min. Als Massenspektrometer wurde ein FINNIGAN MAT 252 eingesetzt.

2.6.2 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Die Essigesterextrakte der Versuche mit ^{13}C-1-Naphthalen wurden mittels GC/C-IRMS auf die Bildung von Metaboliten untersucht. Es wurden 3 µL der Probe auf eine SGE BPX5-Säule (50 m; ID 0,32 mm; Filmdicke 0,5 µm) bei einem Heliumfluss von 1 mL/min injiziert. Das Temperaturprogramm für die Säule ist in Tab. 6 aufgelistet. Die Massenspektren wurden mit einem FINNIGAN MAT 252 bestimmt.

Tab. 6: Temperaturgradient für die GC/C-IRMS

Zeit [min]	T [°C]
0,0	40
8,0	40
10,0	70
25,0	250
37,0	250

2.7 Enzymatische Untersuchungen

Für Untersuchungen zu Enzymen des Xenobiotika-Stoffwechsels wurden Mikrosomen isoliert. Der Pilz wurde in Malz/Pepton-Flüssigmedium (s. Kap. 2.2.2) angezogen und nach 7-tägigem Wachstum geerntet. Neben PAK-freiem Medium wurden Ansätze mit 0,05 mM 1-Naphthol (Zugabe: 48 h nach Inokulation) kultiviert.
Der Pilz wurde durch Filtration der Kulturlösung über Cellulosefilter von Millipore (SCWP 04700) geerntet. Anschließend wurde das Myzel mit sterilem, entionisiertem Wasser gewaschen, unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und in Extraktionspuffer (50 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$ pH 7,4; 1 mM DTT; 20 % Glycerol; 2 mM PMSF) resuspendiert. Die Zelltrümmer wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g abgetrennt. Aus dem Überstand konnten die Mikrosomen in einem abschließenden Zentrifugationsschritt (120000 g, 90 min) als Pellet isoliert werden. Das überstehende Cytosol wurde dekantiert und das Pellet in Extraktionspuffer ohne PMSF (s. o.) resuspendiert. Cytosol und resuspendierte Mikrosomen wurden auf enzymatische Aktivitäten untersucht.
Für einige Versuche wurde das relativ große Volumen der cytosolischen Fraktion eingeengt. Zur Konzentrierung des Cytosols wurde der Überstand der Ultrazentrifugation in Dialyseschläuche gefüllt und für 8 h bei 4 °C auf Sephadex G10 gelegt oder für 4 h lyophilisiert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde mit Puffer auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

2.7.1 UDP-Glucuronyltransferase

Für den Nachweis der UDP-Glucuronyltransferase wurde die Reaktion von 4-Nitrophenol mit UDP-Glucuronsäure genutzt (MATSUI et al. 1979; WATANABE et al. 1986). Im Verlauf der Reaktion nimmt der Gehalt von 4-Nitrophenol im Ansatz ab. Diese Abnahme kann photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Ansatz:	25 µL	0,5 M $NaH_2PO_4 \times H_2O$ pH 7,4	(enthält 10 mM DTT)
	25 µL	5 mM 4-Nitrophenol	
	150 µL	Enzymlösung (Cytosol oder resuspendierte Mikrosomen)	

Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL 10 mM UDP-Glucuronsäure gestartet. Nach 15 min wurde die Reaktion mittels 0,5 mL Trichloressigsäure gestoppt. Der gebildete Niederschlag wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 g abgetrennt. Vom Überstand wurden 0,4 mL

abgenommen und nach Zugabe von 0,4 mL 2M NaOH mit entionisiertem Wasser auf 3 mL aufgefüllt. Die Messung erfolgte bei 405 nm gegen Wasser.

Zur Charakterisierung des Enzyms wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion vom pH-Wert, von der Substratmenge und dem Proteingehalt der Enzymlösung ermittelt.
Das pH-Optimum wurde in NaH_2PO_4-Puffer (0,5 M) bestimmt. Die enzymatischen Aktivitäten wurden in Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte im Bereich von pH 6 bis pH 8 gemessen.
Die v/S-Charakteristik der UDP-Glucuronyltransferase wurde für das Substrat 4-Nitrophenol ermittelt. Nach Start der enzymatischen Reaktion mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von 4-Nitrophenol wurde der Umsatz gemessen.
Der Einfluss des Proteingehaltes auf die Reaktion wurde durch die Zugabe unterschiedlicher Volumina der Enzymlösung zum Assay bestimmt. Um das Volumen des Assays konstant zu halten, wurde bei Zugabe von kleineren Volumina mit Puffer bis zum Gesamtvolumen aufgefüllt.
Der Proteingehalt in den Enzymlösungen wurde mit dem Verfahren nach LOWRY et al. (s. Kap. 2.9) bestimmt.

Zur Bestimmung einer direkten Glucuronierung von 1-Naphthol durch die mikrosomale UDP-Glucuronyltransferase wurde folgender Ansatz eingesetzt:

25 µL	0,5 M $NaH_2PO_4 \times H_2O$, pH 7,4	(enthält 10 mM DTT)
20 µL	Aqua dest.	
5 µL	0,25 M 1-Naphthol (in DMSO; Endkonz.: 5 mM)	
100 µL	resuspendierte Mikrosomen	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL 25 mM UDP-Glucuronsäure gestartet. Reaktionslösung wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationsfrist wurde zum Nachweis von 1-Naphthylglucuronid entweder direkt ein Teilvolumen des Testansatzes in die HPLC (s. Kap. 2.5.3) injiziert oder das Gesamtvolumen mit 0,5 mL Trichloressigsäure zum Ausfällen der Proteine versetzt. Der Niederschlag wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 g abgetrennt und der Überstand unter Stickstoffstrom eingeengt. Für die HPLC (s. Kap. 2.5.3) wurde der Rückstand in 100 bis 500 µL Methanol/Wasser (1:1) resuspendiert.
Im Verlauf der Versuche wurde das Volumen der Mikrosomenlösung im Assay variiert (50, 75, 100 und 120 µL), wobei mit destilliertem Wasser bis zum Gesamtvolumen von 250 µL aufgefüllt wurde. Ansätze mit einem Überschuss der Enzymlösung (700 µL) wurden ebenfalls inkubiert.

2.7.2 UDP-Glucosyltransferase

Die UDP-Glucosyltransferase katalysiert – ähnlich der UDP-Glucuronosyltransferase – Reaktionen, die zur Bildung von konjugierten Metaboliten führen. Der Enzymassay entspricht dem Testansatz für die UDP-Glucuronosyltransferase (s. o.), anstelle von UDP-Glucuronsäure wird UDP-Glucose als Substrat eingesetzt.

2.8 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Zur Bestimmung von Kulturparametern für Versuche zum PAK-Abbau wurde das Pilzwachstum unter verschiedenen Naphthalenkonzentrationen in Flüssigmedium und auf Oberflächenkulturen verfolgt.

Für lichtmikroskopische Untersuchungen zum Wachstum auf Oberflächenkulturen unter Organika-Stress wurden Objektträger in Agarplatten (1,5 % Agar) eingegossen. Auf die erkaltete Agaroberfläche wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Naphthalen in Ethanol ausgestrichen. Es wurden Agarplatten mit

1 mg/mL
0,5 mg/mL
0,1 mg/mL
0,05 mg/mL präpariert.

Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels blieben Naphthalenkristalle auf der Agaroberfläche zurück. Auf die Platten wurden aus einer Pilzkultur ausgestochene Agarstücke (Korkbohrer: ∅ 7 mm) gelegt. Nach 7-tägiger Kultivierung bei 15 °C und Dunkelheit wurden die eingegossenen Objektträger mit einem Skalpell aus dem Agar geschnitten und unter einem Inversmikroskop (ZEISS Axiovert S100) betrachtet. Für Bildaufnahmen wurde eine SONY CCD MC 3254 Kamera verwendet.

Für Studien zum Wachstum in Flüssigmedium wurden Hauptkulturen (s. Kap. 2.2.2) eines Pilzstammes an drei aufeinanderfolgenden Tagen angesetzt. Die Ansätze umfassten organikafreie und organikahaltige (0,05 mM Naphthalen) Kulturen. Am dritten Tag wurden mit einer Pipette Tropfen der Pilzkulturen auf einen Objektträger überführt und unter einem Kontrastmikroskop (ZEISS Axioskop) untersucht. Durch eine Toluidinblau-Lösung (0,1 % Toluidinblau + 2,5 % $NaHCO_3$) wurden Bereiche der Proteinneusynthese im Pilz blau gefärbt. Bilder wurden mit einer CCD Kamera MC 3254 von SONY digitalisiert.

2.9 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. 1951

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Mikrosomen- und Cytosol-Fraktionen der Ultrazentrifugation (s. Kap. 2.7) wurden 50 oder 100 µL der proteinhaltigen Lösung mit 2 mL 5 %-iger Trichloressigsäure versetzt. Das Protein wurde bei 4 °C gefällt und anschließend für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µL 1 N NaOH aufgenommen. Zu 100 µL der alkalischen Proteinlösung wurden 1 mL Lösung 5 (s. u.) gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µL Folin-Phenolreagenz und 2 mL destilliertes Wasser zugegeben und gut geschüttelt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei 578 nm gegen einen Blindwert (NaOH anstatt Protein) bestimmt. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte über eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin.

Lösung 1: 2 % Na_2CO_3
Lösung 2: 1 % $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
Lösung 3: 2 % Na,K-Tartrat
Lösung 4: Lösungen 2 + 3 (1:1) unmittelbar vor Gebrauch mischen
Lösung 5: 10 mL Lösung 1 + 200 µL Lösung 4

2.10 Chemikalien

Naphthalen	Fluka
^{13}C-1-Naphthalen (99 Atom%)	Sigma-Aldrich
1-Naphthol	Fluka
2-Naphthol	VWR Merck
1,4-Naphthochinon	Fluka
1,2-Naphthochinon	Sigma-Aldrich
1-Methoxynaphthalen	Sigma-Aldrich
1-Naphthyl-β-D-glucopyranosid	Reatec
1-Naphthyl-β-D-glucuronid	Sigma-Aldrich
1-Naphthylsulfat	Sigma-Aldrich
Fluoren	Fluka
9-Fluorenol	Sigma-Aldrich
9-Fluorenon	VWR Merck
4-Nitrophenol	Fluka

UDP-Glucose	Fluka
UDP-Glucuronsäure	Sigma-Aldrich
Lignin organosolv	Sigma-Aldrich
Lignin hydrolitisch	Sigma-Aldrich
Lignin alkali	Sigma-Aldrich

3 Ergebnisse

3.1 Screening auf ligninolytische Aktivität

Von den untersuchten aquatischen Hyphomyceten zeigte der Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 die grösste ligninolytische Aktivität. Auf allen eingesetzten Ligninpräparaten konnte Ligninolyse durch diesen Stamm nachgewiesen werden.
Relativ hohe ligninolytische Aktivitäten konnten auch für die Stämme *H. lugdunensis* H3-2-5, *H. lugdunensis* H9-06-15, *Phialospora* sp. H9-06-An1 und *Lemonniera aquatica* H9-06-L3 belegt werden. *H. lugdunensis* H3-2-5 zeigte Ligninolyse für die Ligninpräparate *organosolv* und *hydrolytisch*. Es konnten keine Unterschiede auf Voll- und Mangelmedium beobachtet werden. Die drei Stämme vom Standort H9 (Südlicher Auslauf „Süßer See“) ähneln sich in ihrem ligninolytischen Verhalten:

- keine ligninolytische Aktivität für Lignin *alkali*
- Ligninolyse auf Vollmedium für Lignin *organosolv* und *hydrolytisch*, mit der höchsten ligninolytischen Aktivität für Lignin *organosolv*
- Ausnahme: *H. lugdunensis* H9-06-15 zeigte Ligninolyse für Lignin *organosolv* und *hydrolytisch* auch auf Mangelmedium.

Geringe ligninolytische Aktivität wurde für die Stämme von den Standorten Grube Johannes, „Böse Sieben“ (H6) und „Glume“ (H8) beobachtet.
Anguillospora sp. GrJo 06-5 aus der Grube Johannes zeigte Ligninolyse nur für Lignin *organosolv* und Vollmedium.
Die *Heliscus*-Stämme H6-06-10 und H8-2-1 wiesen ligninolytische Aktivität für Lignin *organosolv* und *hydrolytisch* auf. Die besten Ergebnisse wurden auf Mangelmedium erreicht. Auf Vollmedium wurde keine Ligninolyse beobachtet.
Tetracladium marchalianum H8-2-2 zeigte ausschliesslich für Lignin *hydrolytisch* ligninolytische Aktivität. Es konnten keine Unterschiede zwischen Voll- und Mangelmedium nachgewiesen werden. Von allen Stämmen mit ligninolytischer Aktivität zeigte nur *Tetracladium marchalianum* H8-2-2 keine Ligninolyse für Lignin *organosolv*.
Keine ligninolytische Aktivität konnte für die Stämme *Heliscus lugdunensis* BB (Boss Brook, Vergleichsstamm aus unbelastetem Gewässer), *Anguillospora* sp. H4-03-3 und *Heliscus lugdunensis* H8-06-10 beobachtet werden.

Die Ergebnisse des Screenings sind in Tab. 7 zusammengefasst. Als Maß für die ligninolytische Aktivität der aquatischen Hyphomyceten diente die Entfärbung des ligninhaltigen Agars nach Zugabe der Testreagenz.

Tab. 7: Ergebnisse des Screenings auf ligninolytische Aktivität von aquatischen Hyphomyceten

Stamm	Lignin					
	organosolv		hydrolytisch		alkali	
	VM	MM	VM	MM	VM	MM
Heliscus lugdunensis BB	-	--	-	--	--	--
Anguillospora sp. GrJo 06-5	+	--	--	--	--	--
Heliscus lugdunensis H3-2-5	+	+	+	+	-	--
Heliscus lugdunensis H4-2-4	++	++	++	+	+	--
Anguillospora sp. H4-02-3	--	--	--	--	--	--
Heliscus lugdunensis H6-06-10	--	+	--	+	--	--
Heliscus lugdunensis H8-2-1	-	+	-	+	-	--
Heliscus lugdunensis H8-06-10	-	--	-	--	-	--
Tetracladium marchalianum H8-2-2	--	--	+	+	--	--
Heliscus lugdunensis H9-06-15	++	+	+	+	-	--
Lemonniera aquatica H9-06-L3	++	--	+	--	--	--
Phialophora sp. H9-06-An1	++	--	+	--	-	--

VM	Vollmedium (Malz/Pepton + Agar)
MM	Mangelmedium (Ammoniumnitrat + Agar)
--	keine ligninolytische Aktivität
-	nicht eindeutig
+	ligninolytische Aktivität nachgewiesen
++	starke ligninolytische Aktivität

Als starke ligninolytische Aktivität wurde die Deckungsgleichheit von einem deutlich entfärbten Bereich mit der Ausbreitung des Pilzmyzels gewertet. Blieb die Ausdehnung des farblosen Bereiches hinter der Wachstumsfront des Pilzmyzels zurück, oder waren Teilbereiche der bewachsenen Fläche aufgehellt, so wurde dies als Nachweis für ligninolytische Aktivität angesehen.

Der Großteil der Stämme zeigte auf Mangelmedium ein reduziertes Wachstum gegenüber dem Vollmedium. Das Wachstum der Hyphomyceten auf ligninhaltigem Vollmedium unterschied sich – mit Ausnahme von *Heliscus lugdunensis* BB und *Tetracladium marchalianum* H8-2-2 - nicht von den Kontrollansätzen. *H. lugdunensis* BB und *T. marchalianum* H8-2-2 zeigten auf dem Vollmedium der Kontrollen das stärkste Wachstum.

Die Durchmesser der Pilzkulturen als Maß für das Wachstum der aquatischen Hyphomyceten sind in Tab. 8 aufgelistet. Die Unterschiede im Wachstum zwischen Parallelansätzen betrugen 1-2 mm.

Tab. 8: Durchmesser von Pilzkulturen aquatischer Hyphomyceten in mm nach 14-tägigem Wachstum auf ligninhaltigen Agar (n=3)

Stamm	Lignin						Kontrolle
	organosolv		hydrolytisch		alkali		
	VM	MM	VM	MM	VM	MM	
Heliscus lugdunensis BB	48	k.W.	47	47	48	41	54
Anguillospora sp. GrJo 06-5	31	19	31	23	30	23	31
Heliscus lugdunensis H3-2-5	45	38	47	45	47	40	47
Heliscus lugdunensis H4-2-4	46	27	46	45	46	39	47
Anguillospora sp. H4-02-3	25	19	24	20	26	19	26
Heliscus lugdunensis H6-06-10	47	37	47	41	46	37	47
Heliscus lugdunensis H8-2-1	44	37	45	40	44	37	44
Heliscus lugdunensis H8-06-10	48	35	47	41	52	37	47
Tetracladium marchalianum H8-2-2	22	11	20	10	17	12	23
Heliscus lugdunensis H9-06-15	50	35	47	40	51	36	49
Lemonniera aquatica H9-07-L3	22	6	23	13	22	9	24
Phialospora sp. H9-06-An1	25	20	27	23	23	22	24

VM Vollmedium (Malz/Pepton + Agar)
MM Mangelmedium (Ammoniumnitrat + Agar)
Kontrolle VM ohne Lignin

k.W. kein Wachstum

3.2 PAK-Stoffwechsel aquatischer Hyphomyceten

Der Stamm mit der ausgeprägtesten ligninolytischen Aktivität - *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 – wurde als Untersuchungsobjekt für den PAK-Katabolismus aquatischer Hyphomyceten gewählt. Als Modellverbindungen für die Versuche mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wurden Naphthalen und Fluoren eingesetzt.

3.2.1 Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in ausgewählten Medien und unter Naphthaleneinfluss

Zur Bestimmung von Kulturparametern für nachfolgende Versuche zum PAK-Abbau wurde das Wachstumsverhalten von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 unter verschiedenen Naphthalenkonzentrationen verfolgt.

Auf einer naphthalenfreien Agar-Oberflächenkultur wuchs *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 ausgehend vom Punkt der Impfung strahlenförmig in alle Richtungen. Die wachsenden Hyphen waren im Phasenkontrastmikroskop zu erkennen (Abb. 3). Der Pilz wuchs sowohl auf der Oberfläche des Mediums als auch im Agar.

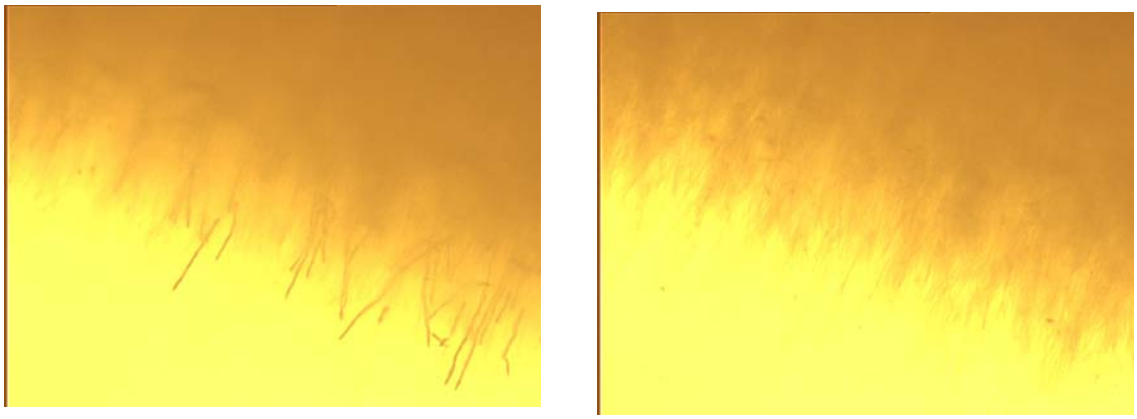


Abb. 3: Wachsende Hyphen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in (links) und auf (rechts) einer Agarkultur (7 Tage nach Impfung); 10-fache Vergrösserung

Das Wachstum von *H. lugdunensis* H4-2-4 unter Naphthaleneinfluss wurde nach dem Ausplattieren einer naphthalenhaltigen Lösung auf Agarplatten und nachfolgende Beimpfung mit dem Pilz bestimmt.
Unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Naphthalen in Ethanol, die auf Agarplatten ausgestrichen wurden, führten in Folge des Verdampfens des Lösungsmittels zur Bildung

von Naphthalenkristallen. Die Kristalle auf der Oberfläche bildeten flächige Strukturen, Naphthalenkristalle im Agar nadelförmige Gebilde (Abb. 4).

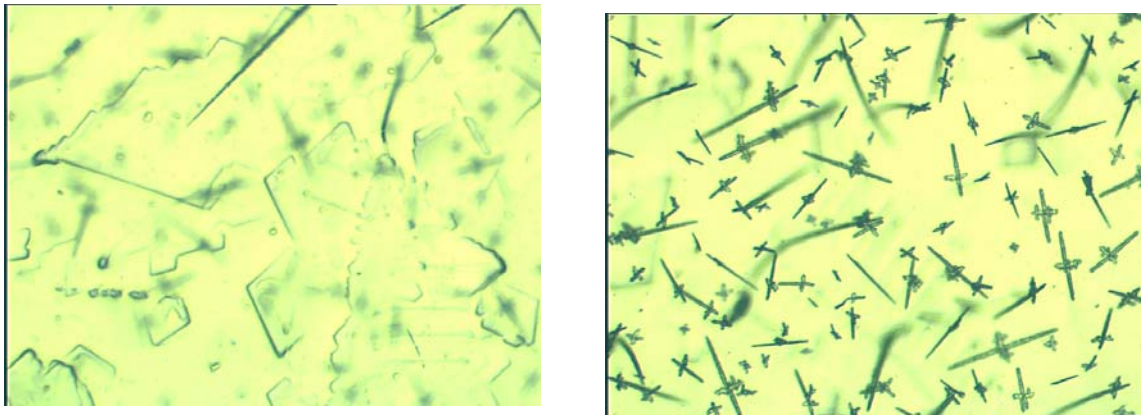


Abb. 4: Naphthalenkristalle auf einer Agarplatte (links) und im Agar (rechts); 10-fache Vergrösserung

Die Anzahl und die Grösse der Naphthalenkristalle hingen von der Konzentration der Naphthalenlösung und dem Volumen der ausplattierten Lösung ab. Im Verlauf des Versuches über einen Zeitraum von 7 Tagen konnte eine Abnahme der Naphthalenkristalle auf allen Ansätzen beobachtet werden. Diese Abnahme ist auf das Verflüchtigen des Naphthalens zurückzuführen.

Bei Konzentrationen der Naphthalenlösung von 0,05 mg/mL und 0,1 mg/mL Ethanol bildeten sich nur wenige Naphthalenkristalle, die zudem mit fortschreitender Versuchsdauer verdampften. Das Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt. Eine Konzentration von 0,5 mg/mL der Naphthalenlösung führte zur Bildung von ausgeprägten Kristallstrukturen, die über den Zeitraum des Versuches Bestand hatten. Das Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde beeinträchtigt. Gegenüber dem gleichmässig strahlenförmigem Wachstum der naphthalenfreien Kontrolle kam es zu einem stark verminderten und unregelmässigen Wachstum. In Abb. 5 sind Naphthalenkristalle und vom Impfstück ausgehende Hyphen des Pilzes zu erkennen.

Die höchste getestete Naphthalenlösung von 1 mg/mL Ethanol führte zur Bildung von grossflächigen Kristallstrukturen. Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 auf diesen Agarplatten wurde nicht beobachtet (Abb. 6).

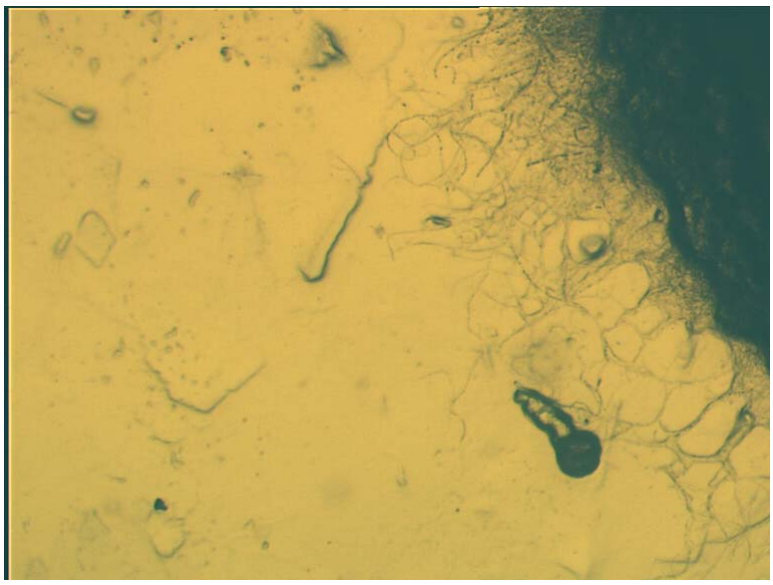


Abb. 5: Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 auf Agarkultur mit Naphthalenkristallen; Konzentration der Naphthalenlösung: 0,5 mg/mL;
rechts oben: Agarstück zum Beimpfen der Agarplatte; 10-fache Vergrösserung

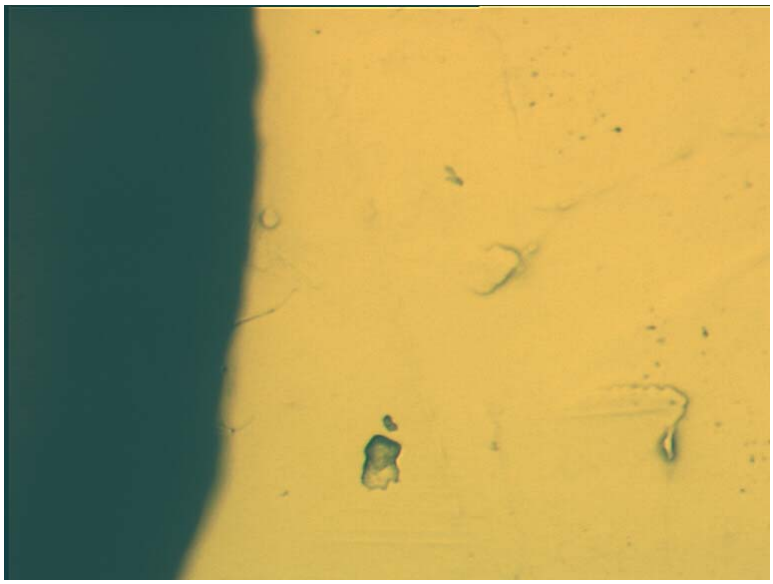


Abb. 6: Randzone eines Impfstückes (*H. lugdunensis* H4-2-4) auf naphthalenhaltigem Agar; Konzentration der Naphthalenlösung: 1 mg/mL; 10-fache Vergrösserung

Nach dem Nachweis eines Wachstums von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 unter Naphthaleneinfluss auf einer Oberflächenkultur, folgten Versuche in Flüssigkultur. Es sollten die höchstmögliche Naphthalenkonzentration, die das Wachstum des Pilzes nicht beeinflusst, sowie der Zeitpunkt und die Art und Weise der Inokulation des Flüssigmediums mit dem Pilz bestimmt werden.

Das Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in 150 mL Malz/Pepton-Flüssigmedium (in 250 mL Flaschen mit teflonbeschichteten Schraubverschlüssen) ohne Naphthalen ist in Abb. 7 grafisch dargestellt.

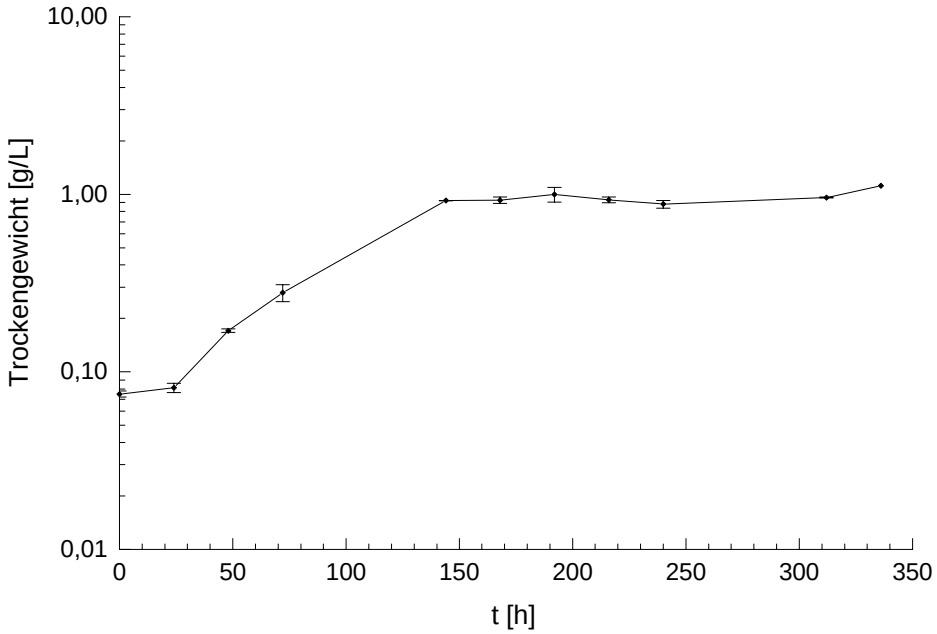


Abb. 7: Wachstum von *H. lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium (150 mL); durchschnittliche relative Standardabweichung: 4,7 % (n=3)

Nach der Inokulation des Flüssigmediums mit homogenisiertem Pilzmyzel (s. Kap. 2.2.2) ging das Wachstum des Pilzes nach ca. 24 h in die Trophophase über. Die Idiophase wurde nach ca. 150 h erreicht. Am siebenten Tag wurde ein Trockengewicht von 0,93 g/L (SD: 0,03; n=3) bestimmt.

Die Inokulation mit homogenisiertem Pilzmyzel aus der Wachstumszone einer Oberflächenkultur wurde anderen Impfmethoden vorgezogen. So stellt das Wachstum des Pilzes auf Filterpapier und anschliessendes Schwenken desselbigen im Flüssigmedium eine schonendere Form der Beimpfung dar. Hierbei wird jedoch nicht nur Myzel aus der Wachstumszone des Pilzes in das Flüssigmedium überführt.

Das Wachstum des Pilzes in Flüssigkultur nach der Inokulation mit homogenisiertem Pilzmyzel wurde lichtmikroskopisch dokumentiert (Abb. 8, Abb. 9). So konnte bestätigt werden, dass diese Art der Beimpfung das Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Flüssigkultur nicht entscheidend beeinträchtigt.

Abb. 8: Suspendiertes Myzel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 24-stündigem Wachstum in Malz/Pepton-Medium (40-fache Vergrösserung)

Abb. 9: Suspendiertes Myzel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 48-stündigem Wachstum in Malz/Pepton-Medium (40-fache Vergrösserung)

Der Vergleich von Abb. 8 mit Abb. 9 zeigt ausgeprägtere Strukturen des Pilzmyzels in den 2 Tage alten Ansätzen. Mittels Toluidienblau wurden die Bereiche der Proteinneusynthese im Organismus gefärbt (Abb. 10, Abb. 11). Die Lokalisation der Proteinbiosynthese in den Hyphen ist auf das apikale Wachstum zurückzuführen.

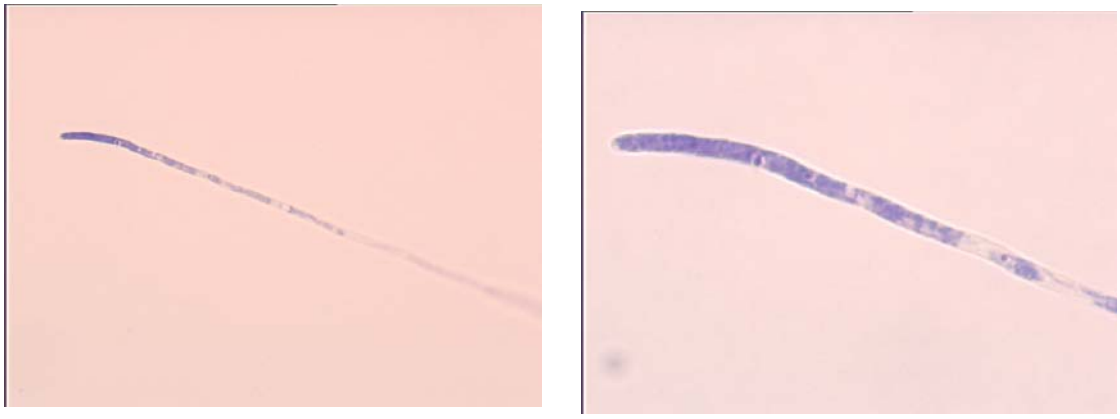


Abb. 10: Mit Toluidinblau gefärbte Hyphe von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 48-stündigem Wachstum in Malz/Pepton-Medium;
40-fache (links) und 100-fache (rechts) Vergrösserung

Abb. 11: Mit Toluidinblau gefärbtes Myzel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 48-stündigem Wachstum in Malz/Pepton-Medium;
40-fache (links) und 100-fache (rechts) Vergrösserung

Nach der Bestimmung des Wachstumsverlaufs von *H. lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium und der Wahl der Inokulationsmethode wurde das Wachstum des Pilzes in naphthalenhaltiger Flüssigkultur bestimmt.

Das Wachstum von *H. lugdunensis* H4-2-4 wurde hierbei von Naphthalenkonzentrationen von bis zu 0,05 mM im Medium nicht beeinflusst. Höhere Konzentrationen führten zur einer Hemmung des Pilzwachstums. Unter 0,25 mM Naphthalen in 150 mL-Ansätzen betrug die Biomasse (Trockengewicht) des Pilzes zum Zeitpunkt der Ernte (7. Tag nach Inokulation) ca. 20 % (0,19 g/L, SD: 0,04; n=3) der Biomasseproduktion im naphthalenfreien Kontrollansatz. Das Wuchsbild von *H. lugdunensis* H4-2-4 im Medium veränderte sich. Der Pilz bildete keine homogene Suspension mit dem Medium, wie es für

naphthalenfreie Flüssigkulturen und Naphthalenkonzentrationen unter 0,05 mM kennzeichnend war, sondern wuchs in distinkten, flockigen Strukturen.

Der PAK-Metabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 sollte in verschiedenen Medien untersucht werden. Neben der Kultivierung in 150 mL Malz/Pepton-Medium wurde in Vorbereitung auf diese Versuche das Wachstumsverhalten des Pilzes in 50 mL Malz/Pepton-Medium (Abb. 12), 50 mL Mineralmedium und in 50 mL und 150 mL des Mediums aus homogenisierten Erlenblättern dokumentiert.

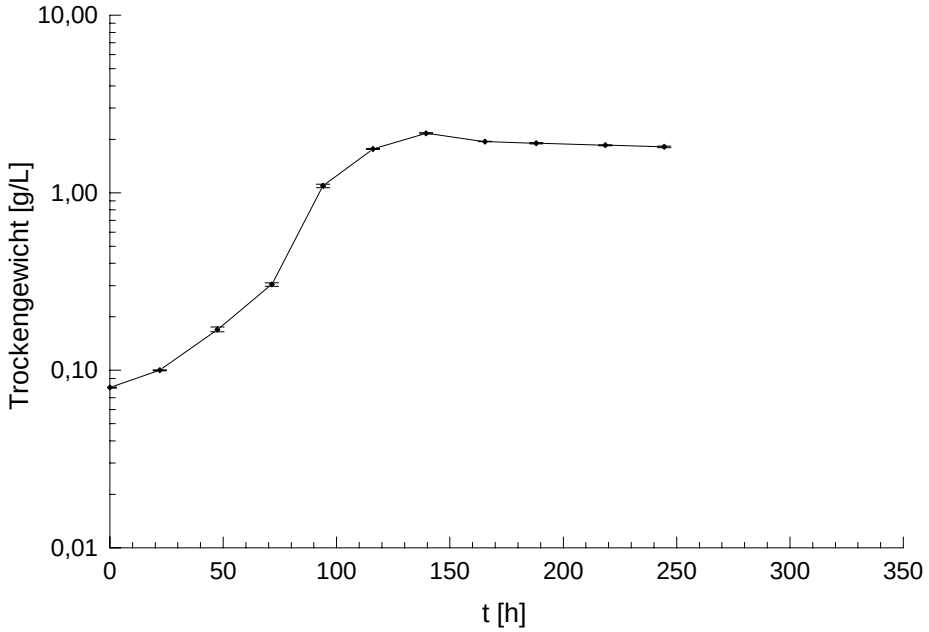


Abb. 12: Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium (50 mL); durchschnittliche relative Standardabweichung: 1,2 % (n=3)

In 50 mL Malz/Pepton-Medium zeigte *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 einen stärkere Biomasse-Zunahme als in 150 mL Malz/Pepton. Das Trockengewicht am siebenten Tag betrug 1,94 g/L (SD: 0,003; n=3).

In 50 mL Mineralmedium (Abb. 13) fiel die Biomasseproduktion geringer aus als in 50 mL Malz/Pepton-Medium. Am siebenten Tag wurde ein Trockengewicht von 1,01 g/L (SD: 0,01; n=3) bestimmt.

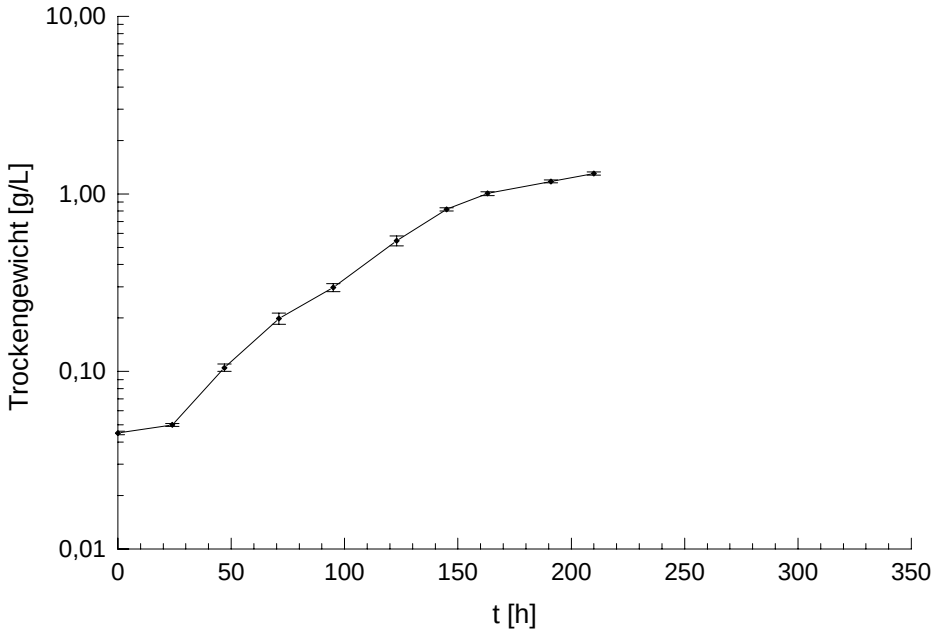


Abb. 13: Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium (50 mL); durchschnittliche relative Standardabweichung: 3,6 % (n=3)

Das Wachstum von *H. lugdunensis* H4-2-4 in 50 mL Malz/Pepton-Medium und 50 mL Mineralmedium wurde durch Zugabe von 0,05 mM Naphthalen 48 h nach der Inokulation nicht gehemmt.

Als ein weiteres Medium wurden homogenisierte Erlenblätter (s. Kap. 2.2.2) eingesetzt. Das Trockengewicht von *H. lugdunensis* H4-2-4 in PAK-freien Kulturen betrug am siebenten Tag in 50 mL 0,78 g/L (SD: 0,05; n=3) und in 150 mL 0,58 g/L (SD: 0,03; n=3).

Der grösste Biomassezuwachs von *H. lugdunensis* H4-2-4 wurde in Malz/Pepton-Medium gemessen. Neben der Zusammensetzung des Mediums hatte auch das Volumen der Flüssigkultur einen Einfluss auf die Biomasseproduktion. So ist das Trockengewicht in 50 mL-Kulturen höher als in 150 mL (Abb. 14).

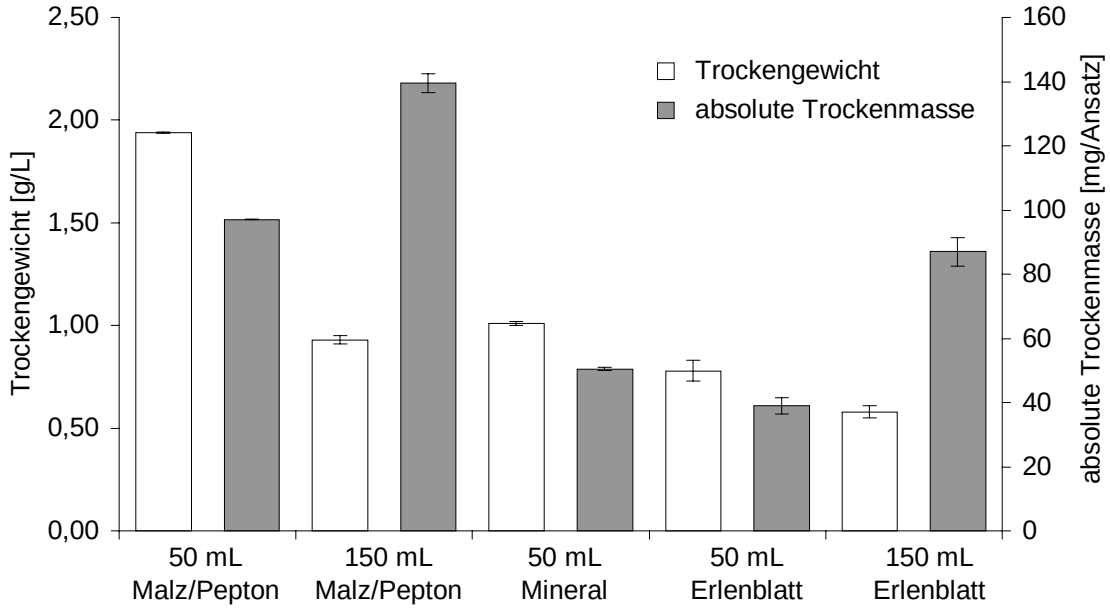


Abb. 14: Trockengewichte und absolute Trockenmassen in 7 Tage alten Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Abhängigkeit von Zusammensetzung und Volumen des Flüssigmediums; durchschnittliche relative Standardabweichung: 5,9 % (n=3)

3.2.2 Untersuchungen zum Naphthalenmetabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Die Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium bildeten die Grundlage der Versuche zum Naphthalenstoffwechsel. Zur Identifizierung und Quantifizierung von Naphthalen und seinen Metaboliten wurden zwei HPLC-Methoden eingesetzt (s. Kap. 2.5.3).

Die HPLC-Methode zum Nachweis der hydrophoben Naphthalenmetabolite ermöglichte die chromatographische Trennung von Naphthalen und den möglichen Stoffwechselprodukten 1,2-Naphthochinon, 1,4-Naphthochinon, 2-Naphthol und 1-Naphthol.

In Abb. 15 ist ein Chromatogramm von Standardsubstanzen dieser Verbindungen wiedergegeben. Für den verwendeten Lösungsmittelgradienten wurden die folgenden Retentionszeiten ermittelt: 1,2-Naphthochinon 7,1 min; 1,4-Naphthochinon 12 min; 2-Naphthol 14,7 min; 1-Naphthol 17,1 min; Naphthalen 26,5 min. Es wurde eine Bibliothek der UV-Spektren dieser Verbindungen erstellt.

Als Nachweisgrenzen für die UV-Detektion wurden folgende Werte ermittelt: 1-Naphthol (2 µg/mL); 2-Naphthol (1 µg/mL); 1,4-Naphthochinon (0,1 µg/mL); 1,2-Naphthochinon (0,1 µg/mL); Naphthalen (1 µg/mL).

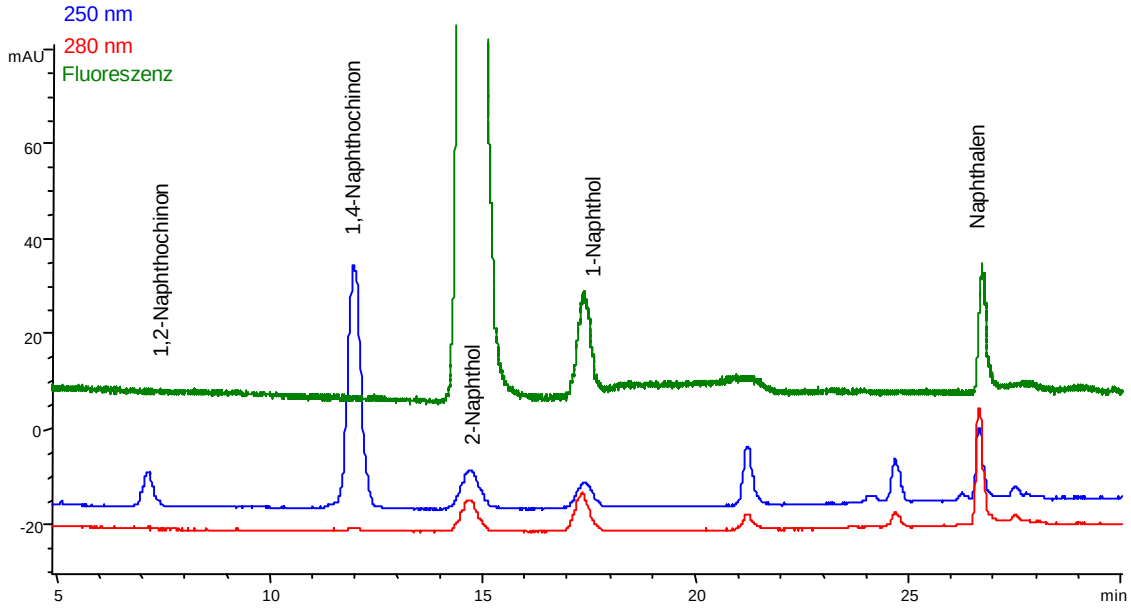


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm einer Trennung von Standardsubstanzen des Naphthalenstoffwechsels

Controller:	MERCK-HITACHI L5000 LC	
Pumpe:	MERCK-HITACHI 655A-11	
Detektor:	DAD	HP 1050
	Fluoreszenz	HP 1046 A
Säule:	MERCK LiChrospher RP18 (250 × 4; 5)	
Vorsäule:	RP18	
Fluss:	0,8 mL/min	
Detektion:	DAD	250 nm/ 280 nm
	Fluoreszenz	Exz. 252 nm/Em. 380 nm
Standardgemisch:	c: 0,01 mg/mL	
Injektionsvolumen:	20 µL	

Eine Spektrenbibliothek wurde ebenfalls für Standardverbindungen möglicher hydrophiler Metabolite von Naphthalen angelegt. Mit der entsprechenden chromatographischen Methode (s. Kap. 2.5.3) wurden die Retentionszeiten von Reinsubstanzen des 1-Naphthyl-β-D-Glucuronids (6,7 min), 1-Naphthylsulfats (8,7 min) und 1-Naphthyl-β-D-Glucopyranosids (9,8 min) gemessen. Die Nachweisgrenzen der UV-Detektion betrugen: 1-Naphthyl-β-D-Glucuronid: 0,2 µg/mL; 1-Naphthylsulfat: 0,5 µg/mL; 1-Naphthyl-β-D-Glucopyranosid: 0,2 µg/mL.

Die quantitative Bestimmung von Metaboliten mittels HPLC ist einer analytischen Streuung unterworfen. Diese Variation der Messwerte wurde für unterschiedlich konzentrierte Standardlösungen von Naphthalen, 1-Naphthol und 1-Naphthylsulfat ermittelt (Tab. 9).

Tab. 9: Analytische Streuungen der HPLC-Methoden für Standardsubstanzen; n (je Konzentration)=5

Verbindung	Konzentration [µg/mL]	Standardabweichung [%] 250 nm	280 nm
Naphthalen	10	3,93	4,04
	100	2,50	2,23
	500	2,32	1,89
1-Naphthol	10	4,66	4,25
	100	2,54	2,43
	500	2,58	1,81
1-Naphthylsulfat	10	1,12	0,99
	100	1,24	1,34
	500	1,10	1,05

Der Metabolismus von Naphthalen durch den aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde in Malz/Pepton-Medium untersucht. Flüssigkulturen (150 mL) des Pilzes wurden 48 h nach der Inokulation 0,05 mM Naphthalen zugesetzt (s. Kap. 2.5.1). Nach weiteren 5 Tagen wurden die Ansätze, wie in Kap. 2.5.2 dokumentiert, aufgeschlossen und mittels HPLC (s. Kap. 2.5.3) untersucht. Es konnten keine Metabolite nachgewiesen werden. Das Trockengewicht zum Zeitpunkt der Ernte betrug 0,89 g/L (SD: 0,04; n=3); für die naphthalenfreie Kontrolle wurde ein Wert von 0,93 g/L (SD: 0,03; n=3) bestimmt. Eine Bildung von Metaboliten konnte auch nach einer Verlängerung des Zeitraums zwischen Inokulation und Ernte um 5 Tage (auf 10 Tage) nicht festgestellt werden.

In 50 mL Malz/Pepton-Medium konnten bei gleicher Kulturführung wie in 150 mL (Zugabe von 0,05 mM Naphthalen nach 48 h; Aufschluss nach 7 Tagen) ebenfalls keine Metabolite nachgewiesen werden. Die Trockengewichte betrugen 1,94 g/L (SD: 0,003; n=3) für die Kontrolle und 1,89 g/L (SD: 0,04; n=3) für die Ansätze mit 0,05 mM Naphthalen.

Der Einfluss des Kulturmediums auf den Naphthalenmetabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde durch Versuche in Mineralmedium, einem Komplexmedium aus Erlenblättern und in destilliertem Wasser bestimmt.

Nach Inokulation, Naphthalenzugabe (0,05 mM nach 48 h) und Aufschluss der *Heliscus lugdunensis*-Kulturen nach 7 Tagen konnten keine Metabolite in Mineralmedium (50 mL), dem Medium aus Erlenblättern (50 mL, 150 mL) oder in Wasser (150 mL) nachgewiesen werden. In 50 mL Mineralmedium betrug das Trockengewicht zum

Zeitpunkt des Aufschlusses 1,04 g/L (SD: 0,02; n=3), in 50 mL Blattmedium 0,73 g/L (SD: 0,03; n=3) und in 150 mL Blattmedium 0,57 g/L (SD: 0,04; n=3). Für die PAK-freien Kontrollen wurden folgende Werte bestimmt: 50 mL Mineralmedium: 1,01 g/L (SD: 0,01; n=3); 50 mL Blattmedium: 0,78 g/L (SD: 0,05; n=3); 150 mL Blattmedium: 0,58 g/L (SD: 0,03; n=3) bestimmt. In Wasser wurde keine signifikante Biomassezunahme nach der Inokulation beobachtet.

Da unter 0,05 mM Naphthalen keine Metabolitbildung nachgewiesen werden konnte, wurden die Naphthalenkonzentration im Malz/Pepton-Medium erhöht. Die Zugabe von 0,25 mM Naphthalen erfolgte 48 h nach der Inokulation und der Aufschluss der Kulturen am siebenten Tag. Unter diesen Voraussetzungen konnten während der HPLC einer Probe zwei Peaks detektiert werden, die in den mitgeführten Kontrollen nicht auftraten. Den detektierten Peaks konnten - nach Vergleich von Retentionszeiten und UV-Absorptionsspektren mit Standardsubstanzen - die Verbindungen 1,4-Naphthochinon und 1-Naphthol zugeordnet werden (Abb. 16, Abb. 17).

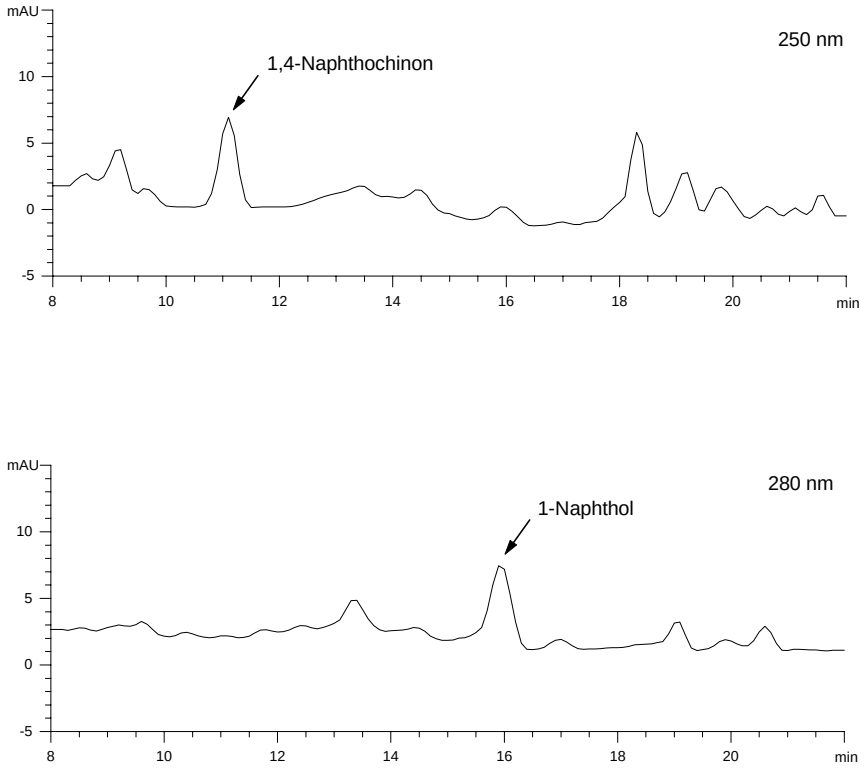
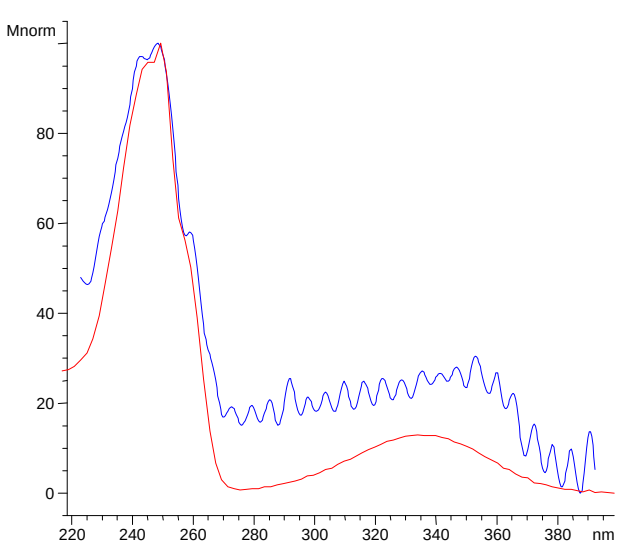


Abb. 16: HPLC-Nachweis von 1,4-Naphthochinon und 1-Naphthol nach Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Kulturen mit 0,25 mM Naphthalen



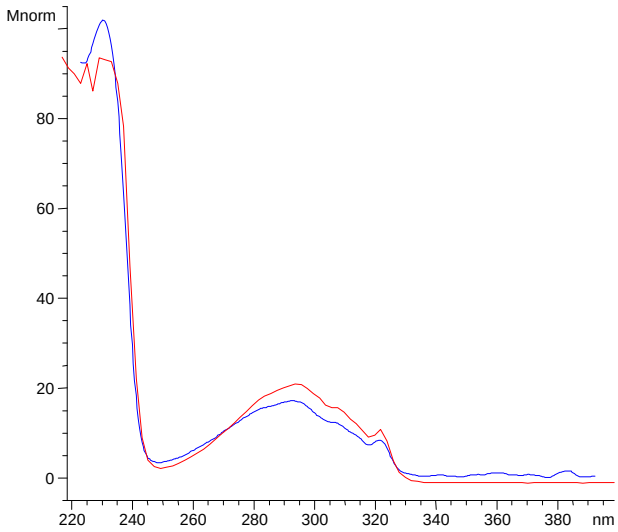


Abb. 17: Vergleich der UV-Spektren von Metaboliten des Naphthalens in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mit Standardsubstanzen

Für die UV-Spektrenvergleiche wurden von der Auswertungssoftware Übereinstimmungen von 98,7 % (1,4-Naphthochinon) und 98,4 % (1-Naphthol) berechnet. Zur Bestätigung der Befunde wurde die GC-EIMS (s. Kap. 2.5.4) eingesetzt. Für Spektrenvergleiche wurden Massenspektren der Standardsubstanzen aufgezeichnet. Die Identifizierung der Metabolite ist in Tab. 10 zusammengefasst. Im Anhang (Abb. 42, Abb. 43) sind die entsprechenden Massenspektren aufgeführt.

Tab. 10: Identifizierung von Metaboliten des Naphthalens in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mittels GC-EIMS; Retentionszeiten der Gaschromatographie und Fragmentionen

Metabolit	Retentionszeit [min]	Fragmentionen [m/z]
1,4-Naphthochinon	4,21	158 [M^+] (100), 130 (42), 104 (56), 102 (64), 76 (60), 66 (9), 50 (49)
1-Naphthol	5,10	144 [M^+] (100), 116 (49), 115 (90), 89 (14), 72 (10), 63 (14), 57 (14)

m/z: Massenzahl; Ionen in eckigen Klammern, relative Intensitäten (prozentual) in runden Klammern

Neben 0,25 mM wurden 0,5 mM und 0,75 mM Naphthalen in 150 mL Malz/Pepton-Medium eingesetzt. Die Bildung der Metabolite durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte ausschliesslich für Kulturen mit 0,25 mM Naphthalen im Medium nachgewiesen werden.
Eine Übersicht über die Versuche zeigt Tab. 11.

Tab. 11: Zusammenfassung der Versuche zum Naphthalenmetabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4: Übersicht über Flüssigmedien und identifizierte Metabolite

Medium	Naphthalen	Volumen		Wiederfindung				identifizierte Metabolite		
		Medium	Luftraum	Kontrolle		Kultur		Name	Umsatz	
	[mM]	[mL]	[mL]	[%]	SD	[%]	SD		[%]	SD
Malz/Pepton	0,05	50	260	50	1,5	57	7,5			
		150	160	73	2,0	68	3,0			
	0,25	150	160	66	4,0	58	5,0	1-Naphthol	0,09	0,04
								1,4-Naphthochinon	0,01	0,01
	0,50	150	160	56	1,5	52	4,0			
	0,75	150	160	45	6,5	47	4,0			
Mineral	0,05	50	260	54	11,5	57	13,0			
Erlenblätter	0,05	50	260	64	2,0	56	5,0			
		150	160	73	2,5	78	1,5			
Wasser	0,05	150	260	75	3,0	71	1,5			

Die Wiederfindungen in den Ansätzen verringerten sich mit zunehmender Naphthalenkonzentration. Sie sanken von ca. 70 % (0,05 mM Naphthalen, 150 mL Medium) auf ca. 45 % (0,75 mM, 150 mL) des eingesetzten Naphthalens. Die Wiederfindungen wurden weiterhin durch das Volumen des Gasraums über dem Flüssigmedium beeinflusst: eine Vergrößerung des Gasraums führte zu einer Verringerung der Wiederfindung. Bei einer Naphthalenkonzentration von 0,05 mM betrug die Wiederfindung in 150 mL Malz/Pepton-Medium (160 mL Gasraum) ca. 70 %, in 50 mL Flüssigmedium (260 mL Gasraum) ca. 50 %.

Den geringsten messbaren Einfluss auf die Wiederfindungen hatte die Zusammensetzung des Mediums. Bei einem Volumen des Flüssigmediums von 150 mL und einer Naphthalenkonzentration von 0,05 mM lagen die Wiederfindungen für Malz/Pepton-Medium, Blattmedium und Wasser um die 70 %.

3.2.2.1 Untersuchungen mit ^{13}C-Naphthalen zur Mineralisierung von Naphthalen in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Die Untersuchungen mit ^{13}C-1-Naphthalen wurden mit *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 durchgeführt. Für die Versuchsansätze wurde der Stamm in einer Vorkultur mit 150 mL Malz/Pepton-Medium angezogen (s. Kap. 2.6). Dieses Medium erlaubte den größten Biomassezuwachs aller untersuchten Medien (s. Kap. 3.2.1). Das Trockengewicht zum Zeitpunkt der Ernte betrug 0,92 g/L (SD: 0,04; n=3). Für die Hauptkultur wurde das Mineralmedium, aufgrund seiner definierten Zusammensetzung, gewählt. Der Hauptkultur (10 mL in 100 ml Serumflaschen) wurde 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen (99 Atomprozent) zugesetzt. Unter Konzentrationen dieser Grössenordnung wird das Wachstum des Pilzes inhibiert, in Malz/Pepton-Medium konnten jedoch Metabolite nach Naphthalenzugabe identifiziert werden (s. Kap. 3.2.2).

3.2.2.1.1 Zeitabhängiges Isotopenverhältnis ^{12}C/^{13}C im CO_2 der Gasphase über Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Nach der Zugabe von 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen zur Hauptkultur von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen das Isotopenverhältnis im CO_2 der Gasphasen bestimmt. Zum Vergleich wurden PAK-freie Kontrollansätze mitgeführt.
Eine Anreicherung von ^{13}C im Kohlendioxid der Gasphase hätte auf eine Mineralisierung des Naphthalens hingewiesen. Über den Versuchszeitraum änderte sich das Isotopenverhältnis im CO_2 jedoch zugunsten des Isotopen ^{12}C. In den Kontrollansätzen blieb das Verhältnis von ^{13}C zu ^{12}C ab dem zweiten Versuchstag nahezu konstant (Abb. 18). Im Anhang Tab. 24 sind die entsprechenden Messwerte aufgelistet.
Die Zunahme des CO_2-Gehaltes im Gasraum über dem Medium ist in Abb. 19 dargestellt. Die entsprechenden Daten sind im Anhang Tab. 23 zusammengefasst. In Kulturen mit Naphthalen wurde über den Versuchszeitraum mehr CO_2 gebildet als in den organikafreien Kontrollen. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme (d: 10) wurde in den

naphthalenhaltigen Kulturen ca. das 1,5-fache an CO_2 im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

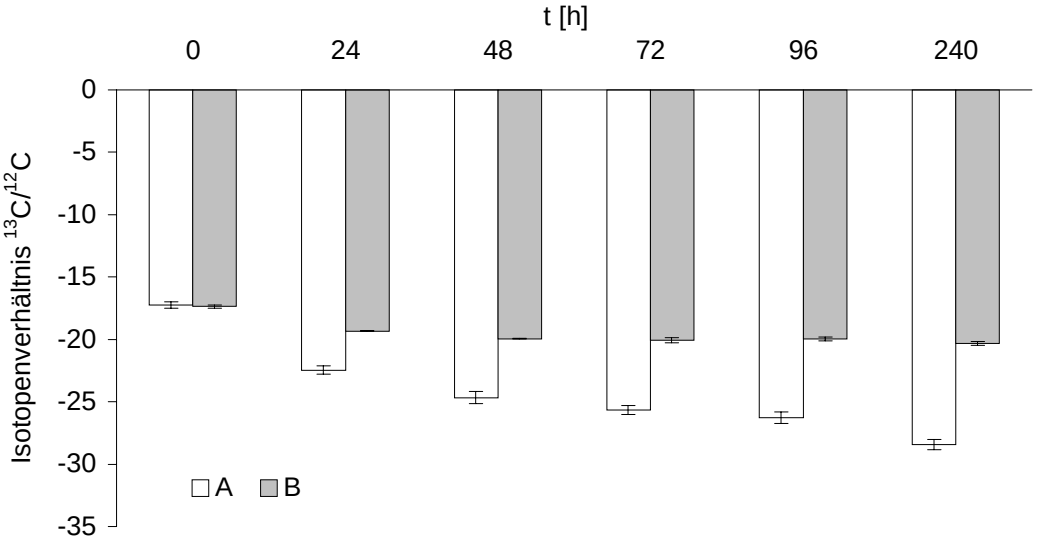


Abb. 18: zeitabhängiges Isotopenverhältnis im CO_2 der Gasphase über Kulturen von *H. lugdunensis* H4-2-4

A *H. lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium mit 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen (durchschnittliche relative Standardabweichung: 0,91 %; n=3)

B Kontrolle: *H. lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium (durchschnittliche relative Standardabweichung: 3,98 %; n=3)

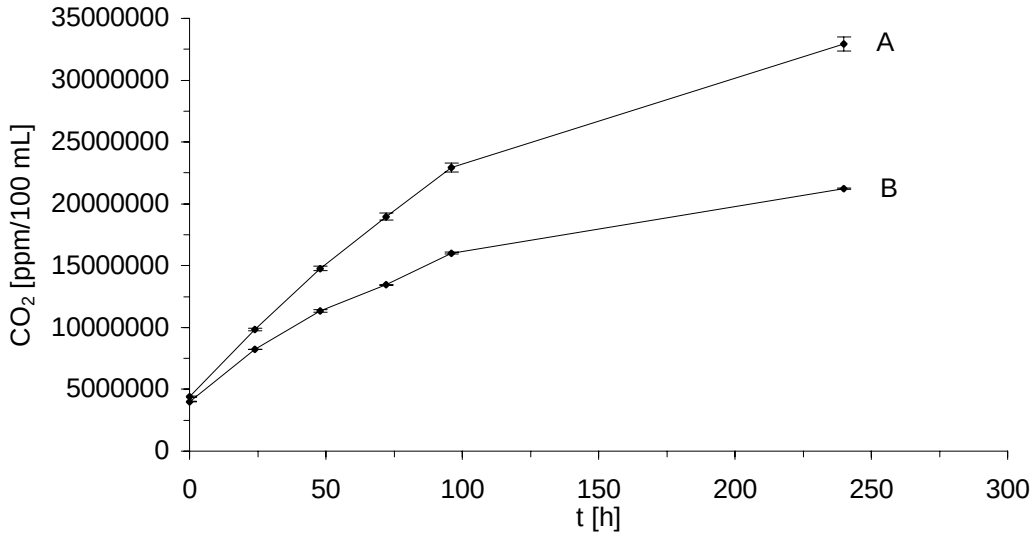


Abb. 19: zeitabhängige Zunahme des CO_2-Gehaltes in der Gasphase über Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

A *H. lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium mit 0,2 mM Naphthalen (durchschnittliche relative Standardabweichung: 2,9 %; n=3)

B Kontrolle: *H. lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium (durchschnittliche relative Standardabweichung: 0,99 %; n=3)

3.2.2.1.2 Ergebnisse der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Eine Bildung von Metaboliten in Kulturen (Mineralmedium) von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mit 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen (99 Atomprozent) sollte mittels GC/C-IRMS nachgewiesen werden. Eine Identifizierung von Metaboliten ist über die Retentionszeit der Gaschromatographie und einer Anreicherung von ^{13}C in Verbindungen möglich. Für die Messungen wurden Kulturen des Pilzes 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Tage nach PAK-Zugabe aufgeschlossen. Mit Standardsubstanzen wurden die Retentionszeiten von Naphthalen, 1-Naphthol, 2-Naphthol, 1,2-Naphthochinon, 1,4-Naphthochinon und 1-Methoxynaphthalen bestimmt.
Eine Bildung von Metaboliten konnte nicht nachgewiesen werden. In den Chromatogrammen der aufgeschlossenen Ansätze traten keine Peaks mit identischen Retentionszeiten zu den Standardverbindungen auf. Eine Anreicherung von ^{13}C in Verbindungen wurde ebenfalls nicht beobachtet.

3.2.3 Untersuchungen zum Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Die Untersuchungen zum Naphthalenstoffwechsel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 führten zum Nachweis von 1-Naphthol und 1,4-Naphthochinon. Die Bildung von 1,4-Naphthochinon durch *H. lugdunensis* H4-2-4 sollte durch Zugabe von 1-Naphthol zu Kulturen des Pilzes bestätigt werden.
Der Metabolismus von 1-Naphthol wurde in Malz/Pepton-Medium, Mineralmedium, einem Medium aus Erlenblättern und Wasser untersucht.
Der Wachstumsverlauf von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in 150 mL Malz/Pepton-Medium mit 0,05 mM 1-Naphthol zeigte keinen Unterschied zu PAK-freien Kulturen. Das Wachstum von *H. lugdunensis* H4-2-4 wurde somit weder von 0,05 mM Naphthalen (s. Kap. 3.2.1) als auch von 0,05 mM 1-Naphthol inhibiert. Bei höheren Konzentrationen zeigte 1-Naphthol eine stärkere Wachstumshemmung als vergleichbare Naphthalenkonzentrationen. So konnte nach Zugabe von 0,25 mM 1-Naphthol zu einer Flüssigkultur von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 keine Zunahme der Biomasse beobachtet werden. Unter 0,25 mM Naphthalen wurde dagegen eine Biomasseproduktion nachgewiesen (s. Kap. 3.2.1).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde für die Versuche mit *H. lugdunensis* H4-2-4 eine 1-Naphthol-Konzentration von 0,05 mM gewählt. Die Zugabe von 1-Naphthol erfolgte 48 h nach der Inokulation und der Aufschluss der Ansätze nach weiteren 5 Tagen.

In 150 mL Malz/Pepton-Flüssigkulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnten unter diesen Bedingungen 1,4-Naphthochinon, 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat als Metabolite des 1-Naphthols nachgewiesen werden.

1,4-Naphthochinon und 1-Naphthylsulfat wurden über die Retentionszeit der HPLC und den UV-Spektrenvergleich mit Standardsubstanzen identifiziert (Abb. 20, Abb. 21, Abb. 24, Abb. 25). Die Befunde der HPLC-Untersuchungen wurden mittels EIMS bzw. ESI-MS bestätigt (s. Kap. 2.5.4). Über die Massenspektrometrie konnte als weiterer Metabolit 1-Methoxynaphthalen ermittelt werden. Nach dem Kauf der reinen Verbindung konnte 1-Methoxynaphthalen auch über das UV-Spektrum und die Retentionszeit der HPLC nachgewiesen werden (Abb. 22, Abb. 23).

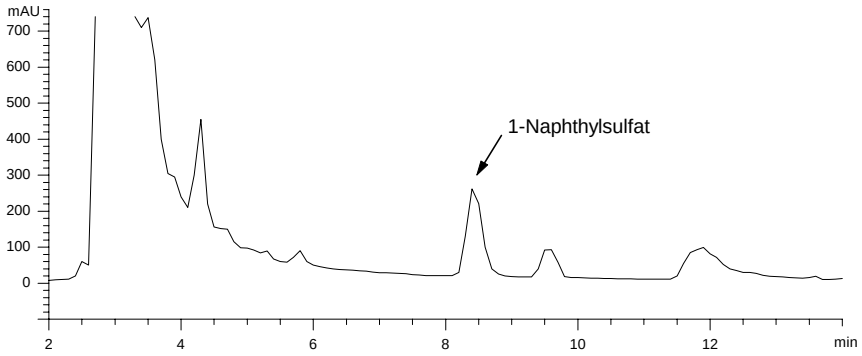


Abb. 20: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;
HPLC-Chromatogramm zum Nachweis von 1-Naphthylsulfat (Detektion: 280 nm)

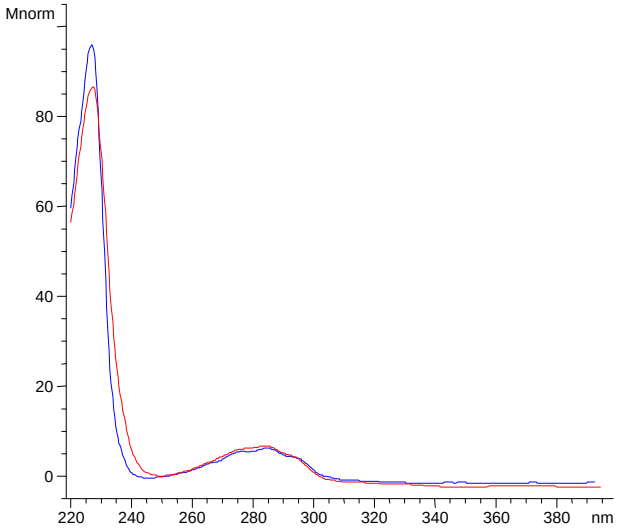


Abb. 21: Identifizierung von 1-Naphthylsulfat über das UV-Spektrum als Metabolit des 1-Naphthol-Stoffwechsels in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;
Spektrenvergleich mit Standardsubstanz (match-Faktor: 96,9 %)

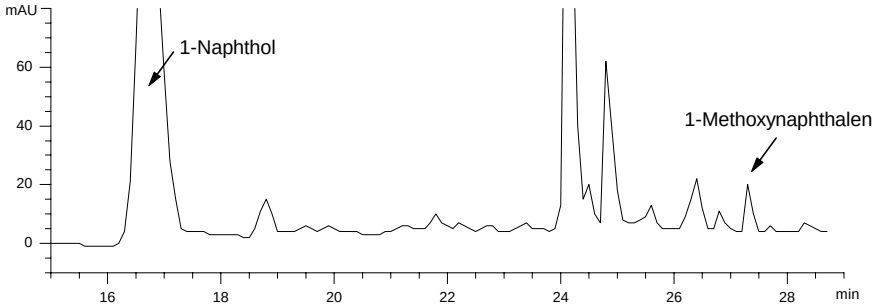


Abb. 22: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4; HPLC-Chromatogramm zum Nachweis von 1-Methoxynaphthalen (Detektion: 250 nm);

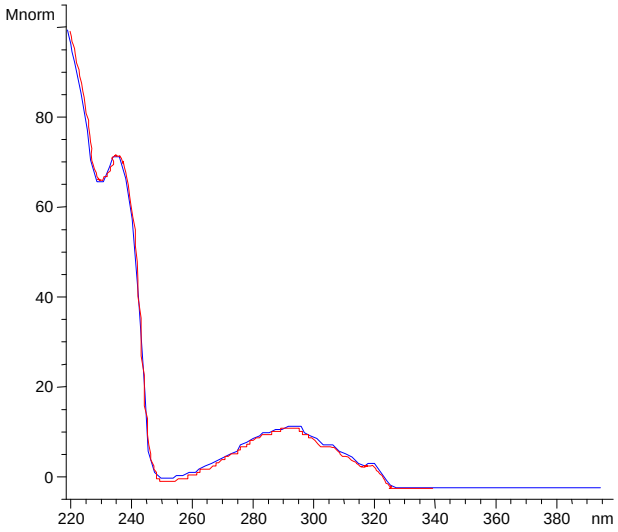


Abb. 23: Identifizierung von 1-Methoxynaphthalen über das UV-Spektrum als Metabolit des 1-Naphthol-Stoffwechsels in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4; Spektrenvergleich mit Standardsubstanz (match-Faktor: 99,9 %)

Das hydrophobe 1-Methoxynaphthalen ging während der Probenaufbereitung für die Chromatographie (s. Kap. 2.5.2) in die Essigesterphase über. Mit der entsprechenden HPLC-Methode (s. Kap. 2.5.3) wurde eine Retentionszeit von 27,5 min bestimmt.

Die Identifizierung von 1,4-Naphthochinon und 1-Methoxynaphthalen durch GC-EIMS ist in Tab. 12 dokumentiert. 1-Naphthylsulfat wurde mittels HPLC-ESI-MS nachgewiesen (Tab. 13).

Tab. 12: Identifizierung von Metaboliten des 1-Naphthols in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mittels GC-EIMS; Retentionszeiten der Gaschromatographie und Fragmentionen

Metabolit	Retentionszeit [min]	Fragmentionen [m/z]
1,4-Naphthochinon	4,21	158 [M^+] (100), 130 (42), 104 (56), 102 (64), 76 (60), 66 (9), 50 (49)
1-Methoxynaphthalen	4,50	158 [M^+] (79), 143 (45), 115 (100), 89 (10), 63 (14)

m/z: Massenzahl; Ionen in eckigen Klammern, relative Intensitäten (prozentual) in runden Klammern

Die Massenspektren von 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat sowie die zugehörigen Chromatogramme sind im Anhang (Abb. 44, Abb. 45, Abb. 46) abgebildet.
Ein Metabolit konnte nicht identifiziert werden. Ein Spektrenvergleich mit Standardsubstanzen zeigte eine 96 %-ige Übereinstimmung mit dem UV-Spektrum von 1,2-Naphthochinon (Abb. 26). Für diese Verbindung konnte nach HPLC-ESI-MS ein Massenspektrum aufgezeichnet werden (Anhang Abb. 47). Der Metabolit besitzt eine Massenzahl von 239 und fragmentiert, so dass bei 159 ein weiterer Massenpeak auftritt (Tab. 13). Es ergibt sich eine Massendifferenz von 80.

Tab. 13: Nachweis von 1-Naphthylsulfat und einem unidentifizierten Metaboliten in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mittels HPLC-ESI-MS; Retentionszeiten der HPLC und Fragmentionen

Metabolit	Retentionszeit [min]	Fragmentionen [m/z]
1-Naphthylsulfat	13,41	224 (8), 223 [M-H]$^-$ (100), 144 (5), 143 (78)
unidentifizierter Metabolit	14,22	240 (7), 239 [M-H]$^-$ (100), 160 (5), 159 (97)

m/z: Massenzahl; Ionen in eckigen Klammern, relative Intensitäten (prozentual) in runden Klammern

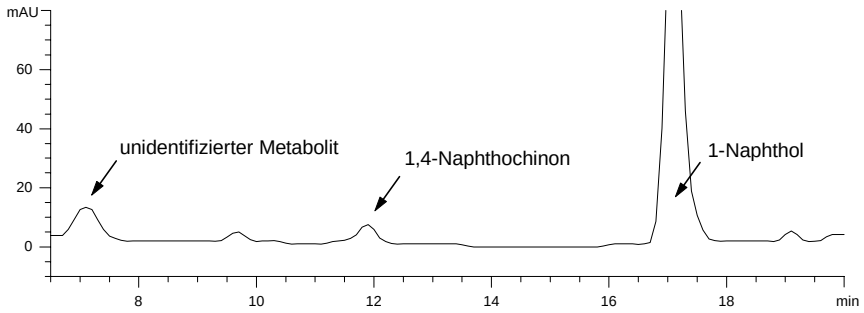


Abb. 24: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4; HPLC-Chromatogramm zum Nachweis von 1,4-Naphthochinon und unidentifizierten Metaboliten (Detektion: 250 nm)

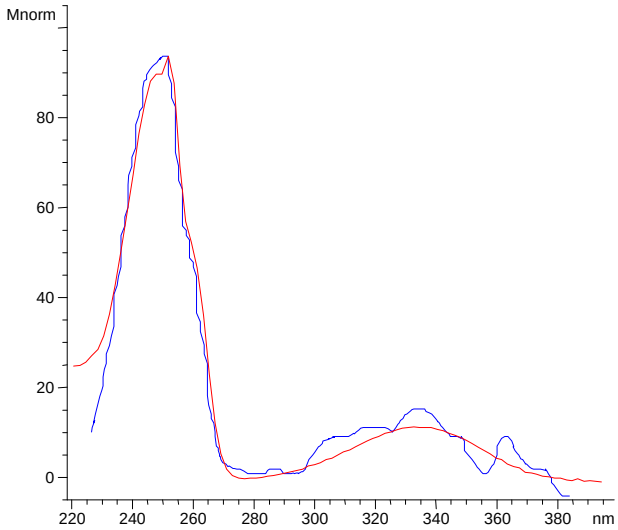


Abb. 25: Identifizierung von 1,4-Naphthochinon über das UV-Spektrum als Metabolit des 1-Naphthol-Stoffwechsels in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4; Spektrenvergleich mit Standardsubstanz (match-Faktor: 98,7 %)

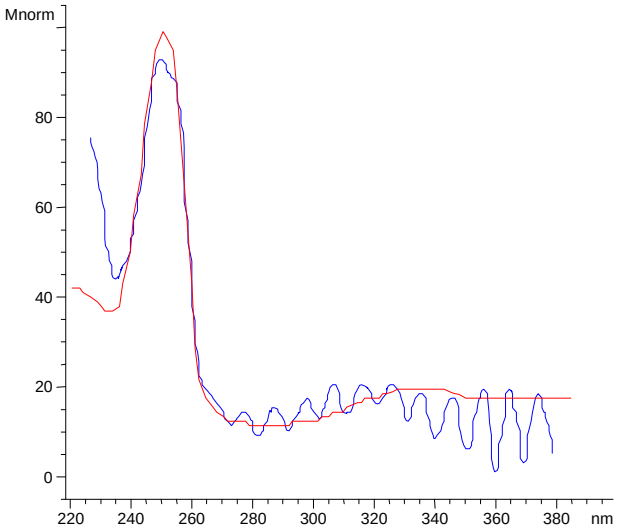


Abb. 26: UV-Spektrum eines unidentifizierten Metaboliten des 1-Naphthol-Stoffwechsels in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;
Übereinstimmung mit Spektrum von 1,2-Naphthochinon: 96 %

In Ergänzung zu den Versuchen in 150 mL Malz/Pepton-Medium sollten Versuche in 50 und 250 mL Malz/Pepton-Medium den Einfluss des Volumens der Flüssigkultur - und in Abhängigkeit davon, des Gasraumes über dem Medium - bestimmen. Die Zugabe von 0,05 mM 1-Naphthol erfolgte nach 48 h und der Aufschluss nach weiteren 5 Tagen.
In 50 mL Malz/Pepton-Medium bildete *H. lugdunensis* H4-2-4 1-Methoxynaphthalen, 1-Naphthylsulfat, 1,4-Naphthochinon und die unidentifizierte Verbindung. Als Metabolite in 250 mL Flüssigkultur konnten 1,4-Naphthochinon, 1-Methoxynaphthalen und der unidentifizierte Metabolit nachgewiesen werden.

Die Wiederfindungen für 1-Naphthol lagen in 50 mL Malz/Pepton-Medium bei 14 % (SD: 3,9) für die Ansätze mit *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 und 88 % (SD: 0,7) für die Kontrollansätze. Die Pilzkultur setzte innerhalb des Versuchszeitraumes 11,85 % (SD: 1,06) des eingesetzten 1-Naphthols zu 1-Naphthylsulfat, 3,33 % (SD: 0,5) zu 1-Methoxynaphthalen und 0,19 % (SD: 0,05) zu 1,4-Naphthochinon um. Der Umsatz für den unidentifizierten Metaboliten (s. o.) konnte nicht quantifiziert werden.
Bei einem Volumen von 150 mL Malz/Pepton-Medium betrugen die Wiederfindungen in Ansätzen mit dem aquatischen Hyphomyceten 82 % (SD: 7,0) und in den Kontrollen 90 % (SD: 2,6) des eingesetzten 1-Naphthols. Die vorherrschenden Metabolite zum Zeitpunkt des Aufschlusses waren 1-Methoxynaphthalen (6,74 %; SD: 1,43) und 1-Naphthylsulfat (4,50 %; SD: 0,08). In geringeren Mengen wurde 1,4-Naphthochinon (0,12 %; SD: 0,01) gebildet, eine Quantifizierung des unidentifizierten Metaboliten war nicht möglich.

In 250 mL wurden 1,4-Naphthochinon (0,07 %: SD: 0,01) und 1-Methoxynaphthalen (2,91 %; SD: 0,22) als Metabolite des 1-Naphthols nachgewiesen. Die Wiederfindungen für 1-Naphthol betrugen annähernd 100 % für die Kontrollansatze und 81 % (SD: 2,6) für die Ansätze mit *Heliscus lugdunensis* H4-2-4.

In 150 mL Malz/Pepton-Medium und 0,05 mM 1-Naphthol betrug die absolute Trockenmasse von *H. lugdunensis* H4-2-4 zum Zeitpunkt des Aufschlusses 127,5 mg (SD: 8,2). In 50 mL wurde eine Biomasse von 90,5 mg (SD: 5,5) und in 250 mL von 77,5 mg (SD: 9,7) gemessen. Mit dem Volumen des Flüssigmediums als Bezugsgrösse ergeben sich Trockengewichte von 0,85 g/L (SD: 0,07) für 150 mL, 1,81 g/L (SD: 0,1) für 50 mL und 0,31 g/L (SD: 0,03) für 250 mL. Demnach wurde in den 150 mL-Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 die größte Menge an Biomasse gebildet, ca. 1,4 mal so viel wie in 50 mL. Der Vergleich der Trockengewichte zeigt für die 50 mL-Kulturen das Maximum und eine Abnahme der Werte mit zunehmenden Kulturvolumen. In 250 mL Malz/Pepton-Medium sind sowohl absolute Trockenmasse als auch Trockengewicht am geringsten.

In Abhängigkeit vom Volumen der untersuchten Flüssigmedien änderte sich auch der verfügbare Sauerstoff, da 50 mL-, 150 mL- und 250 mL-Kulturen in 250 mL-Flaschen mit teflonbeschichteten Schraubverschlüssen (kein Gasaustausch mit Außenluft möglich) angezogen wurden.
Für den Metabolismus von 1-Naphthol (0,05 mM) durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte eine Relation zum Volumen des Flüssigmediums und dem Sauerstoffangebot nachgewiesen werden (s. Tab. 14). Die Abb. 27, Abb. 28 und Abb. 29 illustrieren die Bildung der Metabolite 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat in Malz/Pepton-Kulturen in Abhängigkeit vom Volumen der Gasphase und des Mediums.
Eine Erhöhung des Sauerstoffangebotes im Verhältnis zum Medium - und der Biomasse - verschiebt das Metabolitspektrum zu 1-Naphthylsulfat und unidentifizierten Metaboliten.
Eine Erniedrigung des Sauerstoffangebotes führte zur bevorzugten Bildung von 1-Methoxynaphthalen. Der kleinere Gasraum in Ansätzen mit 150 mL Malz/Pepton (Abb. 28) limitierte im Endeffekt die Bildung von 1-Naphthylsulfat und den beiden unidentifizierten Metaboliten. Zwar stieg die absolute Menge an 1-Naphthylsulfat auf das 1,14-fache zum Zeitpunkt des Aufschlusses (im Vergleich zu den 50 mL-Ansätzen), bezogen auf die Biomasse ergab sich jedoch eine Verminderung um den Faktor 0,81. Die Gesamtmenge an gebildetem 1-Methoxynaphthalen in den 150 mL-Ansätzen stieg dagegen auf das ca. 6,1-fache gegenüber den 50 mL-Ansätzen (s. Tab. 14). Mit der Biomasse als Bezugsgrösse ergibt sich eine Erhöhung für 1-Methoxynaphthalen auf die 4,3-fache Menge (Abb. 29).

In den 50 mL Malz/Pepton-Kulturen entfällt der Grossteil des metabolisierten 1-Naphthols auf die unidentifizierte Verbindung, in den 150 mL- und 250 mL-Ansätzen sind 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat die Hauptmetabolite.

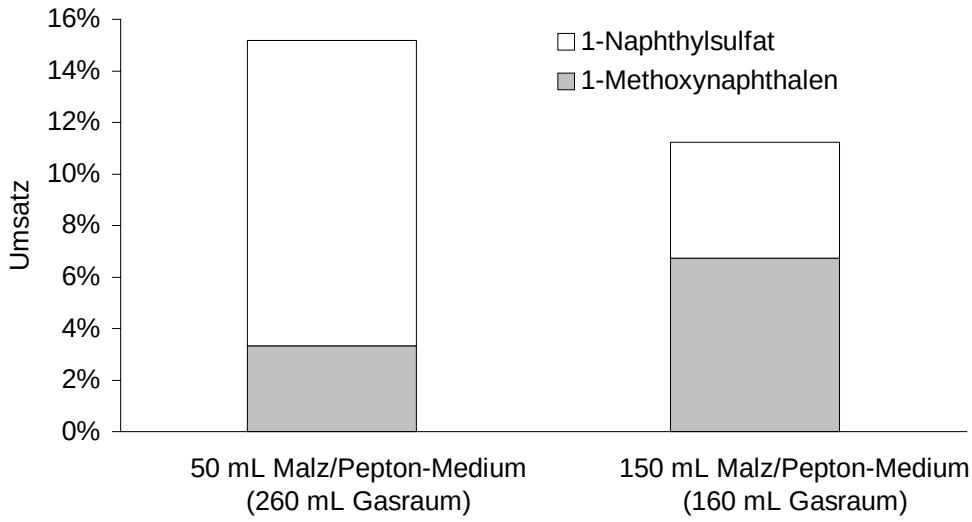


Abb. 27: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4:
Verhältnis der Metabolite 1-Naphthylsulfat und 1-Methoxynaphthalen in Abhängigkeit vom Volumen der Flüssigkultur bzw. dem Volumen der Gasphase;
die Umsätze beziehen sich auf das eingesetzte 1-Naphthol (0,05 mM) und wurden am 5. Tag nach der 1-Naphthol-Zugabe bestimmt

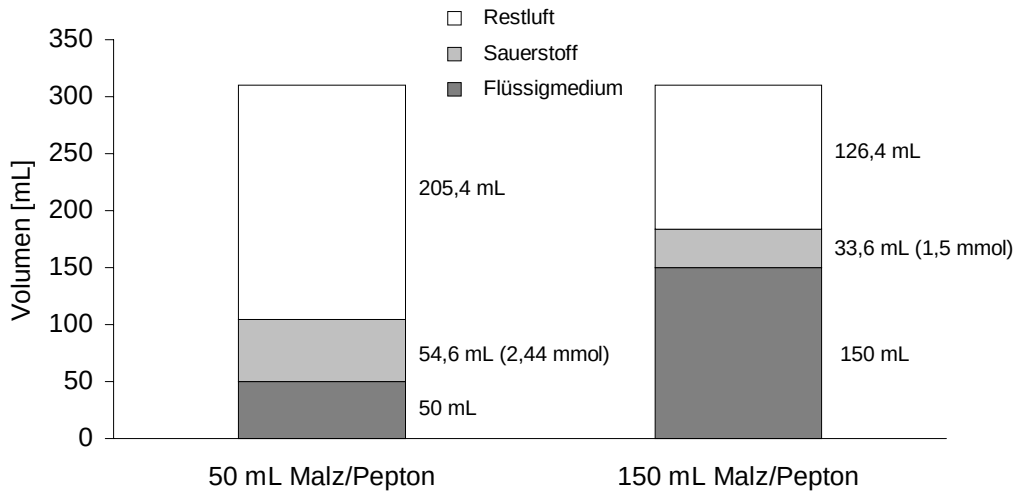


Abb. 28: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4:
Gegenüberstellung der Volumenverhältnisse in abgeschlossenen Kulturflaschen zu Versuchsbeginn; Gasphase unterteilt in Sauerstoff und Restluft (Stickstoff, Edelgase etc.)

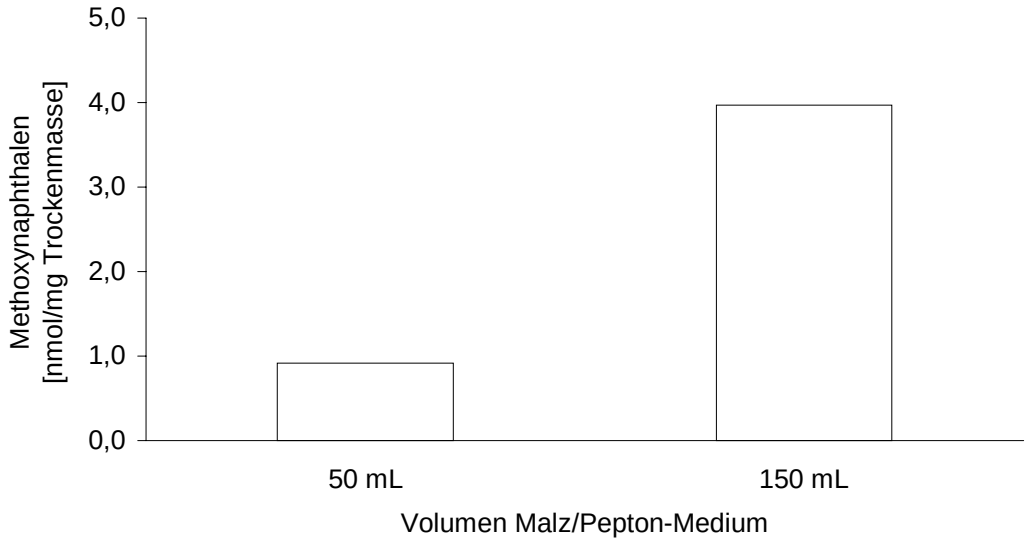


Abb. 29: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4:
Menge des Metaboliten 1-Methoxynaphthalen (bezogen auf die absolute Trockenmasse im Ansatz zum Zeitpunkt des Aufschlusses) in Relation zum Volumen der Flüssigkultur; Zugabe von 0,05 mM 1-Naphthol 48 h nach Inokulation, Aufschluss: nach 7 Tagen

Der Einfluss der Zusammensetzung des Flüssigmediums auf den Metabolismus von 1-Naphthol wurde durch die Kultivierung von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in jeweils 50 mL Mineralmedium, Medium aus Erlenblättern und in destilliertem Wasser bestimmt. Die PAK-Konzentration und die Kulturführung unterschieden sich nicht von den Versuchen in Malz/Pepton-Medium: 0,05 mM 1-Naphthol wurden 48 h nach der Inokulation dem Medium zugesetzt und die Ansätze nach weiteren 5 Tagen aufgeschlossen.

In 50 mL Mineralmedium konnten zwei Metabolite identifiziert werden: 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat. *H. lugdunensis* H4-2-4 setzte 0,76 % (SD: 0,01) des 1-Naphthols zu 1-Methoxynaphthalen und 0,14 % (SD: 0,04) zu 1-Naphthylsulfat um. Zum Zeitpunkt des Aufschlusses betrugen die Wiederfindungen in den Ansätzen mit *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 80 % (SD: 9,0) und in den Kontrollen 88 % (SD: 6,0) des eingesetzten 1-Naphthols. Das Trockengewicht zum Zeitpunkt des Aufschlusses betrug 0,96 g/L (SD: 0,05).

Nach der Kultivierung von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in 50 mL Komplexmedium aus Erlenblättern mit 0,05 mM 1-Naphthol konnten 1-Methoxynaphthalen (3,18 %; SD: 1,05) und 1-Naphthylsulfat (4,03 %; SD: 1,0) als Hauptmetabolite zum Zeitpunkt des Aufschlusses nachgewiesen werden. Die Wiederfindungen für 1-Naphthol lagen bei 80 % (SD: 3,0) für die Kontrollen und bei 68 % (SD: 2,0) für die Ansätze mit dem

aquatischen Hyphomyceten. Für das Trockengewicht wurde ein Wert von 0,60 g/L (SD: 0,1) bestimmt.
In Ansätzen, die in 150 mL destilliertem Wasser 1-Naphthol als alleinige C-Quelle enthielten, wurde 1-Methoxynaphthalen als einziger Metabolit nachgewiesen. Die Umsatzrate lag bei 0,31 % (SD: 0,1). Über den Versuchszeitraum erfolgte keine Zunahme der Biomasse.

Die Versuche mit *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in 50 mL Flüssigmedium (Malz/Pepton-Medium, Mineralmedium, Medium aus Erlenblättern) und 0,05 mM 1-Naphthol belegen eine Bildung der Metabolite in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Die höchsten Metabolisierungsraten für 1-Naphthol wurden in Malz/Pepton-Medium nachgewiesen. Für die Metabolite 1-Naphthylsulfat und 1-Methoxynaphthalen wurden in diesen Ansätzen die grössten absoluten Mengen zum Zeitpunkt des Aufschlusses gemessen (Tab. 14). Mit der Biomasse als Bezugsgrösse ergeben sich die höchsten Werte für das Medium aus Erlenblättern (Abb. 30). Im Mineralmedium waren Biomasseproduktion und Umsatz von 1-Naphthol geringer als in Malz/Pepton-Kulturen.
Die Versuche zum Metabolismus von 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4 sind in Tab. 14 zusammengefasst. Ein Metabolismus von 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4 konnte in allen untersuchten Medien nachgewiesen werden. Tab. 15 zeigt die identifizierten Verbindungen des Stoffwechsels von 1-Naphthol.

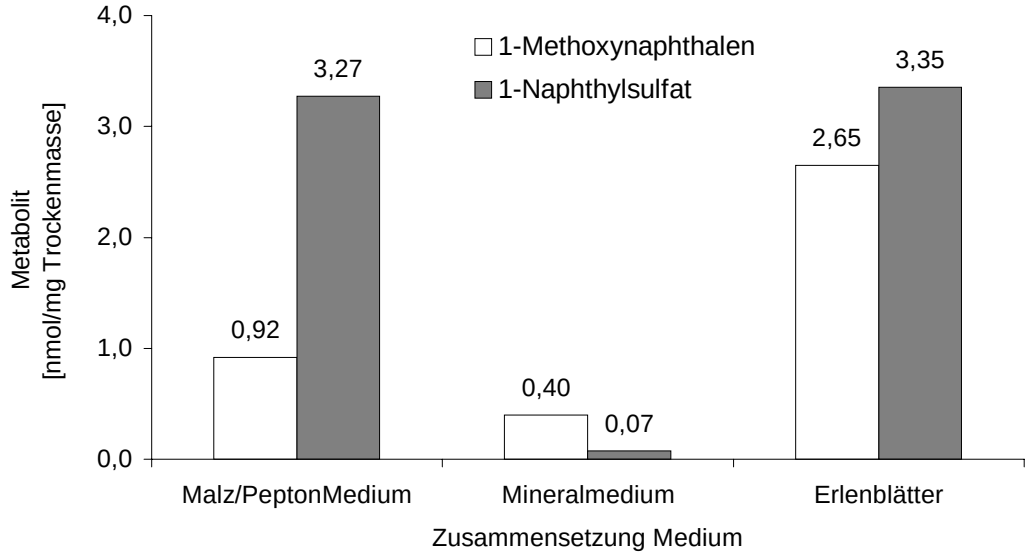
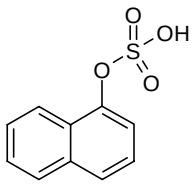
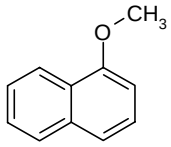
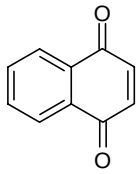


Abb. 30: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4:
Einfluss der Zusammensetzung des Mediums (50 mL) auf die Bildung der Metabolite 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat (bezogen auf die absolute Trockenmasse im Ansatz);
Zugabe von 0,05 mM 1-Naphthol 48 h nach Inokulation, Aufschluss: nach 7 Tagen

Tab. 14: Metabolismus von 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4: Übersicht über Flüssigmedien und identifizierte Metabolite; die angegebenen Umsätze beziehen sich auf das eingesetzte 1-Naphthol; n=3

Medium	1-Naphthol	Volumen		Wiederfindung				Identifizierte Metabolite			
		Medium	Luftraum	Kontrolle		Kultur		Name	Menge	Umsatz	
	[mM]	[mL]	[mL]	[%]	SD	[%]	SD		[nmol/Ansatz]	[%]	SD
Malz/Pepton	0,05	50	260	88	0,7	14	3,9	1,4-Naphthochinon	4,9	0,19	0,05
								1-Methoxynaphthalen	83,2	3,33	0,50
								1-Naphthylsulfat	296,2	11,85	1,06
		150	160	90	2,6	82	7,0	1,4-Naphthochinon	8,8	0,12	0,01
								1-Methoxynaphthalen	505,7	6,74	1,43
								1-Naphthylsulfat	337,4	4,50	0,08
		250	60	98	1,0	81	2,6	1,4-Naphthochinon	8,7	0,07	0,01
								1-Methoxynaphthalen	363,3	2,91	0,22
Mineral	0,05	50	260	88	6,0	80	9,0	1-Methoxynaphthalen	19,0	0,76	0,01
								1-Naphthylsulfat	3,5	0,14	0,04
Erlenblätter	0,05	50	260	80	3,0	68	2,0	1-Methoxynaphthalen	79,4	3,18	1,05
								1-Naphthylsulfat	100,6	4,03	1,00
Wasser	0,05	150	260	100	1,5	99	0,15	1-Methoxynaphthalen	23,0	0,31	0,10

Tab. 15: Anhand von HPLC-DAD, GC-EIMS und HPLC-ESI-MS identifizierte Metabolite des Stoffwechsels von 1-Naphthol in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Verbindung	M	Struktur	Nachweismethoden
1-Naphthylsulfat	224,24		HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS
1-Methoxynaphthalen	158,20		HPLC-DAD, GC-EIMS
1,4-Naphthochinon	158,16		HPLC-DAD, GC-EIMS

3.2.4 Untersuchungen zum Fluorenmetabolismus durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Der Metabolismus von Fluoren durch den aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Stamm H4-2-4) wurde in Malz/Pepton-Medium und Wasser untersucht.
Die Identifizierung und Quantifizierung der Metabolite erfolgte mittels HPLC (s. Kap. 2.5.3). Hierzu wurden die Retentionszeiten und UV-Spektren von Standardsubstanzen des Fluorens, 9-Fluorenols und 9-Fluorenons bestimmt. Alle untersuchten Verbindungen gingen während der Extraktion (s. Kap. 2.5.2) in die Essigesterphase über. Mit der HPLC-Methode zur Trennung der hydrophoben Verbindungen wurden folgende Retentionszeiten gemessen: 9-Fluorenol 16 min (Nachweisgrenze: 0,5 µg/mL); 9-Fluorenon 24,7 min (Nachweisgrenze: 0,05 µg/mL); Fluoren 30 min (Nachweisgrenze: 0,2 µg/mL). Die chromatographische Trennung der Standardsubstanzen ist in Abb. 48 (Anhang) dokumentiert.

Für die Versuche in Flüssigkultur wurde eine Fluorenkonzentration von 0,05 mM gewählt. Die Zugabe des PAK erfolgte 48 h nach der Inokulation und der Probenaufschluss nach weiteren 5 Tagen.

In 50 mL und 150 mL Malz/Pepton-Medium konnte eine Bildung von Fluorenmetaboliten durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nicht nachgewiesen werden.

Ist Fluoren in 150 mL destilliertem Wasser die einzige C-Quelle, so kommt es zur Bildung von 9-Fluorenol. *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 setzte innerhalb des Versuchszeitraumes 0,18 % (SD: 0,02) des eingesetzten Fluorens zu der hydroxylierten Verbindung um (Tab. 17). Der Metabolit wurde über die Retentionszeit der HPLC (Abb. 31) und das UV-Spektrum (Abb. 32) identifiziert. Der Nachweis wurde mittels GC-MS bestätigt. Das Massenspektrum von 9-Fluorenol und das zugehörige Chromatogramm sind im Anhang abgebildet (Abb. 50, Abb. 49). Tab. 16 zeigt die m/z-Werte des 9-Fluorenols und seiner Fragmente.

Tab. 16: Identifizierung von 9-Fluorenol mittels GC-EIMS;
Retentionszeit der Gaschromatographie und Daten der Massenspektrometrie

Metabolit	Retentionszeit [min]	Fragmentionen [m/z]
9-Fluorenol	7,73	182 [M^+] (92), 181 (100), 180 (77), 165 (46), 153 (73), 152 (92), 151 (57), 126 (17), 91 (33), 76 (75), 63 (27)

m/z: Massenzahl; Ionen in eckigen Klammern, relative Intensitäten (prozentual) in runden Klammern

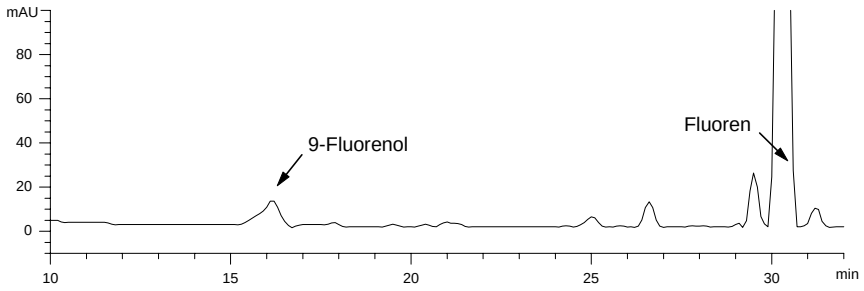


Abb. 31: Metabolismus von Fluoren durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;
HPLC-Chromatogramm zum Nachweis von 9-Fluorenol (Detektion: 280 nm)

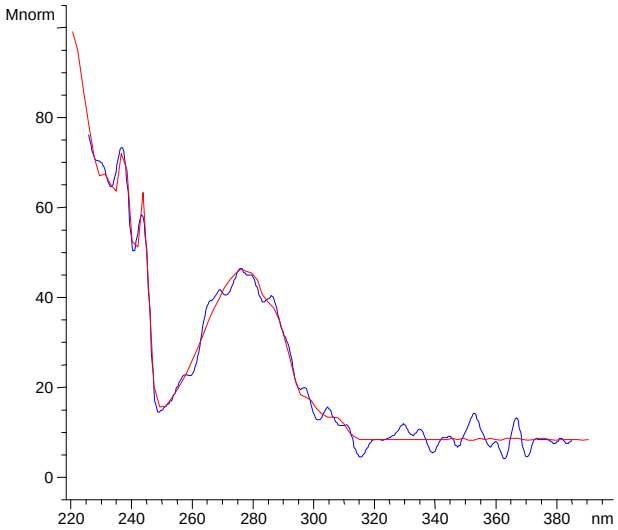


Abb. 32: Identifizierung von 9-Fluorenol über das UV-Spektrum als Metabolit des Stoffwechsels von Fluoren in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;
Spektrenvergleich mit Standardsubstanz (match-Faktor: 99,03 %)

Im Malz/Pepton-Medium wirkte die eingesetzte Fluorenkonzentration von 0,05 mM wachstumshemmend auf *Heliscus lugdunensis* H4-2-4. Am Tag des Aufschlusses wurde für die 150 mL-Ansätze ein Trockengewicht von 0,76 g/L (SD: 0,4; n=3) gemessen. Dieser Wert liegt ca. 20 % unter der Biomasseproduktion in der fluorenfreien Kontrolle (s. Kap. 3.2.1).
In Wasser mit 0,05 mM Fluoren erfolgte über den Versuchszeitraum keine Zunahme der Biomasse von *H. lugdunensis* H4-2-4.

Die Versuche zum Fluorenmetabolismus durch *H. lugdunensis* H4-2-4 sind in Tab. 17 zusammengefasst.

Tab. 17: Metabolismus von Fluoren durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4:
Übersicht über Flüssigmedien und identifizierte Metabolite;
die angegebenen Umsätze beziehen sich auf das eingesetzte Fluoren (n=3)

Medium	Fluoren	Volumen		Wiederfindung				identifizierte Metabolite		
		Medium	Luftraum	Kontrolle		Kultur		Name	Umsatz	
	[mM]	[mL]	[mL]	[%]	SD	[%]	SD		[%]	SD
Malz/Pepton	0,05	50	260	86	1,0	85	2,0			
		150	160	88	1,5	84	2,0			
Wasser	0,05	150	260	77	7,3	80	2,3	9-Fluorenol	0,18	0,02

3.2.5 Screening auf PAK-Metabolismus

Die Untersuchungen an *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 hatten einen PAK-Metabolismus durch diesen Stamm nachgewiesen. In einem Screening wurden die verbleibenden Stämme der aquatischen Hyphomyceten auf ihre Fähigkeit zum Metabolismus von Naphthalen, 1-Naphthol oder Fluoren geprüft. Die Untersuchungen sollten klären, ob Stämme mit einem ausgeprägteren PAK-Metabolismus als *H. lugdunensis* H4-2-4 vorhanden waren.
Für das Screening wurden die aquatischen Hyphomyceten in 150 mL Malz/Pepton-Medium kultiviert. Nach 48 h wurden die PAKs zugegeben. Die Konzentration im Flüssigmedium betrug 0,05 mM. Der Aufschluss der Ansätze erfolgte 7 Tage nach der Inokulation.
Keiner der untersuchten Stämme zeigte nach Applikation von Naphthalen eine Metabolitbildung.
Die Zugabe von 1-Naphthol führte zur Identifizierung von 1-Methoxynaphthalen in Kulturen von *H. lugdunensis* H3-2-5, *H. lugdunensis* H8-2-1 und *H. lugdunensis* H9-06-15. Es wurden keine weiteren Metabolite des Stoffwechsels von 1-Naphthol nachgewiesen. Aus den Chromatogrammen ging hervor, dass die Menge an gebildeten 1-Methoxynaphthalen geringer war als bei *Heliscus lugdunensis* H4-2-4. Die Untersuchungen an diesen Stämmen wurden daher nicht fortgesetzt.

Fluorenmetabolite konnten für den *Anguillospora*-Stamm GrJo 06-5 nachgewiesen werden: 0,83 % des eingesetzten Fluorens wurden zu 9-Fluorenol umgesetzt (Tab. 18). Im Vergleich zu *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 (Flüssigmedium: Wasser; s.o.) bildete *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 im selben Zeitraum ca. das 4,6-fache an 9-Fluorenol.
Anguillospora sp. GrJo 06-5 zeigte in Malz/Pepton-Medium eine geringere Biomasseproduktion als *H. lugdunensis* H4-2-4. Für die PAK-freien Kontrollansätze wurde zum Zeitpunkt des Aufschlusses ein Trockengewicht von 0,48 g/L (SD: 0,02; n=3) bestimmt. Die Zugabe von Fluoren hemmte das Wachstum: das Trockengewicht betrug 0,36 g/L (SD: 0,02; n=3). Die wachstumshemmende Wirkung von Fluoren (0,05 mM) in 150 mL Malz/Pepton-Kulturen für *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 und *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 sind in Abb. 33 dargestellt.

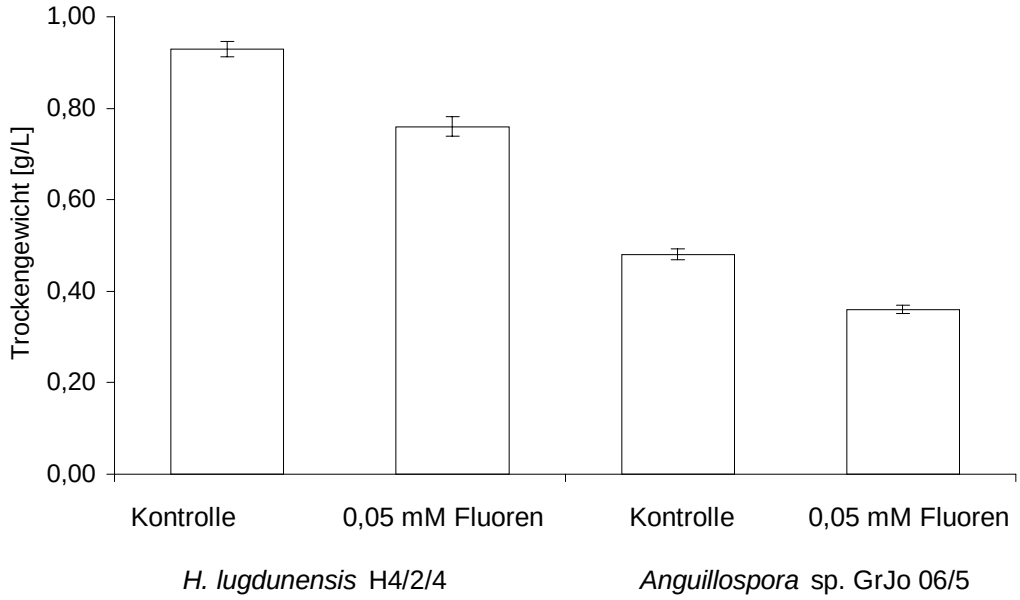


Abb. 33: Trockengewichte in 7 Tage alten Malz/Pepton-Kulturen (150 mL) von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 und *Anguillospora* sp. GrJo 06-5: PAK-freie Kontrollen und Ansätze mit 0,05 mM Fluoren; durchschnittliche relative Standardabweichung: 4,8 % (n=3)

In Tab. 18 sind die Daten zu den Versuchen des Fluorenstoffwechsels in *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 aufgelistet.

Tab. 18: Metabolismus von Fluoren durch *Anguillospora* sp. GrJo 06-5: Übersicht über Versuche in Malz/Pepton-Medium; die angegebenen Umsätze beziehen sich auf das eingesetzte Fluoren

PAK	Medium	Molarität	Volumen		Wiederfindung				identifizierte Metabolite		
		PAK	Medium	Luftraum	Kontrolle		Kultur		Name	Umsatz	
		[mM]	[mL]	[mL]	[%]	SD	[%]	SD		[%]	SD
Fluoren	Malz/Pepton	0,05	150	160	88	1,5	84	4,0	9-Fluorenol	0,83	0,10

3.3 Enzymatische Untersuchungen an *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Die enzymatischen Untersuchungen wurden am Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 durchgeführt. Der Nachweis von 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat hatte die Fähigkeit zur Bildung von Phase II-Metaboliten durch diesen Stamm belegt (s. Kap. 3.2.3). Durch die Versuche sollte die Aktivität weiterer Phase II-Enzyme - der UDP-Glucosyltransferase und der UDP-Glucuronyltransferase - in *H. lugdunensis* H4-2-4 nachgewiesen werden.

Die Enzymaktivitäten der UDP-Glucuronyltransferase und der UDP-Glucosyltransferase wurde nach 7-tägigem Kultivierung des Pilzes in Malz/Pepton-Medium bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt hat das Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in diesem Medium die Idiophase erreicht (s. Kap. 3.2.1).

3.3.1 UDP-Glucuronyltransferase

Für die UDP-Glucuronyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte Aktivität in der mikrosomalen Fraktion der Ultrazentrifugation gemessen werden. In der cytosolischen Fraktion – dem Überstand der Ultrazentrifugation – konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität des Enzyms in *H. lugdunensis* H4-2-4 wurde nach Anzucht in PAK-freiem Medium und nach Kultivierung mit 0,05 mM 1-Naphthol im Medium bestimmt (s. Kap. 2.7).
Die Zugabe von 1-Naphthol zu Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 führte zu einer Erhöhung der extrahierbaren Enzymaktivität um 100 % im Vergleich zu PAK-freien Ansätzen: die spezifische Aktivität für das Substrat 4-Nitrophenol (5mM) betrug nach Anzucht in 1-Naphthol-freiem Medium 0,076 nmol min^{-1} mg^{-1} (± 0,018; n=5), nach Applikation von 1-Naphthol wurden 0,15 nmol min^{-1} mg^{-1} (± 0,03; n=5) gemessen (Abb. 34).

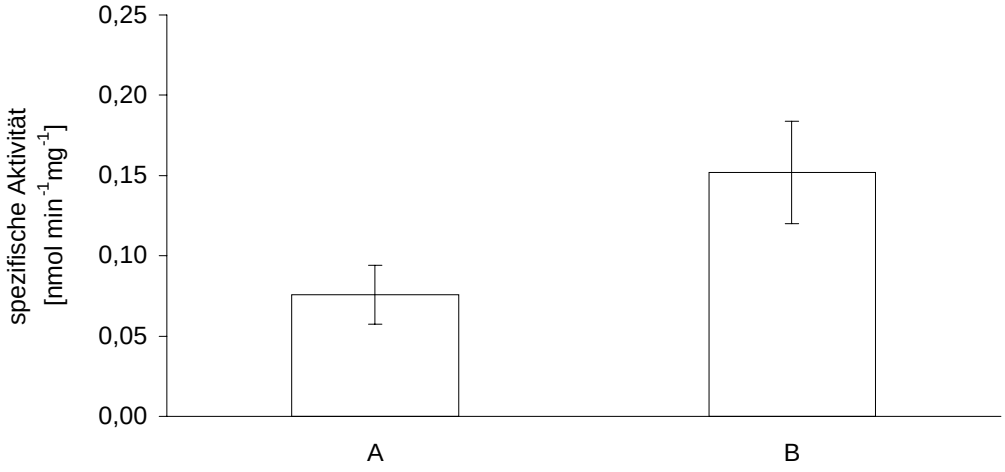


Abb. 34: Vergleich der spezifischen Aktivitäten mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferase (Substrat: 4-Nitrophenol) aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach Anzucht in organikafreiem und 1-Naphthol-haltigem Flüssigmedium:
A *H. lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium
B *H. lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium + 0,05 mM 1-Naphthol

Das pH-Optimum der Aktivität der mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferase wurde in 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer bestimmt. Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte (pH-Bereich 6,6-7,8) wurden Aliquots der mikrosomalen Proteinlösung zugegeben. Da die Enzymlösung in Extraktionspuffer (pH 7,4) vorlag, verschob sich der pH-Wert im Ansatz. Der tatsächliche pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode gemessen.
Die Abhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität vom pH-Wert ist in Abb. 35 dargestellt. Das pH-Optimum des Enzyms befindet sich bei pH 7,6. Bei höheren pH-Werten fällt die Aktivität bis pH 7,7 um 40 % ab. Unterhalb des pH-Optimums ist der Abfall der Enzymaktivität weniger steil, bei pH 7 wurden 60 % der Aktivität am Optimum gemessen.
Die UDP-Glucuronyltransferase weist für das Substrat 4-Nitrophenol eine sigmoide v/S-Charakteristik auf (Abb. 36). Da die UDP-Glucuronyltransferase ein Enzym mit multipler Substratbindung ist, wurde für die enzymkinetischen Untersuchungen die Konzentration des zweiten Substrates UDP-Glucuronsäure konstant gehalten.

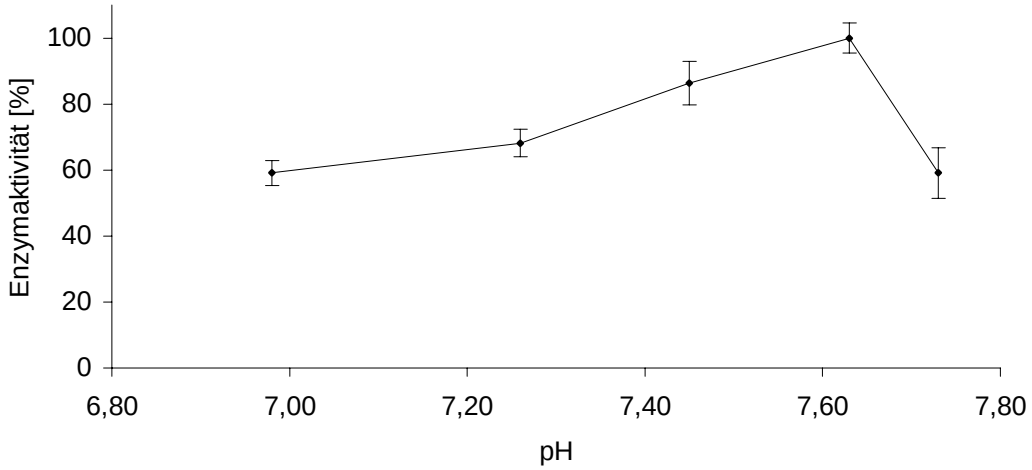


Abb. 35: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 vom pH-Wert;
die höchste enzymatische Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt;
Standardabweichung im Durchschnitt: 10,7 % (n=4)

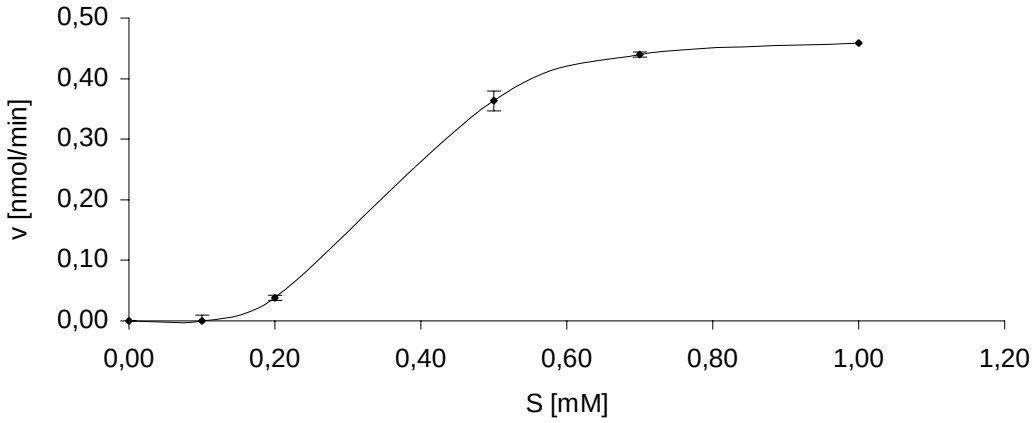


Abb. 36: v/S-Charakteristik der mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4; Substrat: 4-Nitrophenol; n=4

Aus der v/S-Auftragung wurde für das Substrat 4-Nitrophenol als charakteristische Grösse ein $S_{0,5}$-Wert von 0,38 mM bestimmt.

Ein direkte Glucuronidation von 1-Naphthol durch mikrosomale UDP-Glucuronyltransferase konnte nicht nachgewiesen werden. Die Endkonzentration von 1-Naphthol im enzymatischen Testansatz betrug 5 mM (s. Kap. 2.7.1). Bezogen auf das Assay-Volumen von 250 µL entspricht dieser Wert 1,25 µmol. Ein vollständiger Umsatz von 1-Naphthol entspricht ca. 400 µg 1-Naphthylglucuronid. Nach Resuspension in maximal 500 µL Methanol/Wasser wird eine Lösung von 0,8 mg/mL erhalten. Dieser Wert liegt deutlich über der Nachweisgrenze der HPLC für 1-Naphthylglucuronid von 0,2 µg/mL (s. Kap. 3.2.2).

Die cytosolische Fraktion zeigte keine Aktivität für die UDP-Glucuronyltransferase. Auch nach einer Erhöhung der Proteinkonzentration im Assay durch die Einengung der cytosolischen Fraktion mittels Dialyse und Lyophilisierung auf 20 % des ursprünglichen Volumens konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.
Die Messungen zur enzymatischen Aktivität der UDP-Glucuronyltransferase mussten im unmittelbaren Anschluss an die Mikrosomenpräparation erfolgen. Einfrieren der Mikrosomensuspension und späteres Auftauen führten zum Verlust der enzymatischen Aktivität.

3.3.2 UDP-Glucosyltransferase

Für die UDP-Glucosyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte enzymatische Aktivität in der cytosolischen Fraktion der Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. In der mikrosomalen Fraktion konnte keine Enzymaktivität gemessen werden.
Eine Zugabe von 1-Naphthol zu Kulturen des Pilzes führte nicht zu einer Erhöhung der extrahierbaren Aktivität der UDP-Glucosyltransferse.
Die spezifische Enzymaktivität nach Anzucht in PAK-freiem Malz/Pepton-Medium betrug $2{,}46 \pm 0{,}03$ nmol min^{-1} mg^{-1} (n=8; bei einem Proteingehalt von 1 mg/mL im Enzymassay).
Aufgrund der relativ hohen Verdünnung des Enzyms in der cytosolischen Fraktion wurde die Abhängigkeit der UDP-Glucosyltransferase-Aktivität von der Proteinmenge im Messansatz bestimmt. Abb. 37 zeigt die Enzymaktivität in Relation zum Proteingehalt im Assay. Die höchste gemessene Aktivität wurde als 100 % gesetzt.
Die Messungen zur enzymatischen Aktivität der UDP-Glucosyltransferase mussten im unmittelbaren Anschluss an die Ultrazentrifugation erfolgen. Einfrieren und späteres Auftauen der cytosolischen Fraktion führten zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität.

In sind Tab. 19 die Aktivitäten der untersuchten Phase II-Enzyme aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 zusammengefasst.

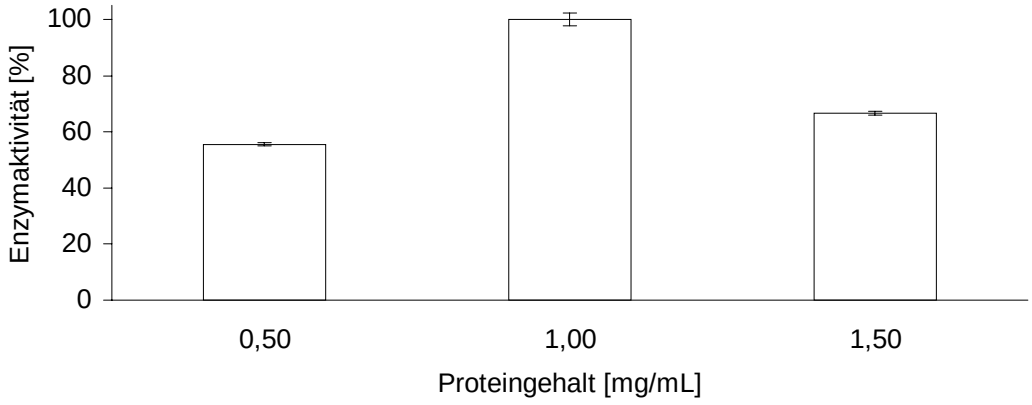


Abb. 37: Aktivität der cytosolischen UDP-Glucosyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Abhängigkeit vom Proteingehalt im Enzymassay;
die höchste Enzymaktivität wurde als 100 % gesetzt;
durchschnittliche Standardabweichung: 2,32 % (n=8)

Tab. 19: spezifische Aktivitäten von UDP-Glucuronyltransferase und UDP-Glucosyltransferase in *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Enzym	Spezifische Aktivität [nmol min^{-1} mg^{-1}]	
	Cytosol	Mikrosomen
UDP-Glucuronyltransferase	k.A.	0,076 ± 0,018 [a]
UDP-Glucosyltransferase	2,46 ± 0,03 [b]	k.A.

k.A.: keine Aktivität; a: n=5; b: n=8

4 Diskussion

Die natürliche Degradation von PAK erfolgt durch Bakterien und Pilze. Eine komplette Metabolisierung und Mineralisation von PAK ist für Bakterien typisch, der pilzliche PAK-Stoffwechsel ist in der Regel durch cometabolische Transformation und unspezifische Oxidation durch Radikale gekennzeichnet (KÄSTNER 2000). Pilze wachsen im Durchschnitt langsamer als Bakterien. Das apikale Wachstum der Hyphen der Pilze stellt jedoch gegenüber einzelligen Organismen, wie Bakterien und Hefen, einen kompetitiven Vorteil dar, da es die Kolonisierung unlöslicher Substrate ermöglicht. Zudem fördert die Ausscheidung extrazellulärer Enzyme die schnelle Ausbreitung im Substrat. Die Sekretion der Enzyme ermöglicht den Pilzen höhere Konzentrationen toxischer Verbindungen zu tolerieren, als bei einer Aufnahme dieser Verbindungen in die Zelle (BENNETT et al. 2002).

In der Natur sind Pilze an einer Vielzahl von degradativen Prozessen beteiligt. Sie können die pflanzlichen Hauptpolymere Cellulose und Lignin, aber auch eine Großzahl von weiteren organischen Verbindungen wie Wachse, Gummi, Vogelfedern oder tierisches Fleisch abbauen (BENNETT et al. 2002). Untersuchungen zur Eliminierung von organischen Schadstoffen (wie PAK) in Böden und Gewässern durch Pilze beschäftigen sich vorwiegend mit Actinomyceten oder Zygomyceten (CERNIGLIA et al. 1992). Vertreter dieser Pilzgruppen sind jedoch nicht in allen Lebensräumen anzutreffen: Anforderungen an das umgebende Milieu und Substratpräferenzen bestimmen das natürliche Vorkommen. So sind die effektivsten Ligninabbauer - holzbesiedelnde Weissfäulepilze - an die Verhältnisse im Boden nicht angepasst (RODRIGUEZ et al. 1996; BRAUN-LÜLLEMANN et al. 1999). Die Charakterisierung der biodegradativen Fähigkeiten von bisher weniger beachteten Pilzgruppen, wie bodenbesiedelnden Fungi imperfecti, aquatischen Hyphomyceten, anaeroben Pilzen und symbiotischen Mykorrhiza-Pilzen erweitert im Zusammenhang mit den bereits charakterisierten Pilzen und Bakterien die Optionen für die Bioremedation von belasteten Standorten.

4.1 Screening auf ligninolytische Aktivität

Lignine sind komplexe Biopolymere pflanzlicher Zellwände, deren aromatische Untereinheiten über nicht hydrolisierbare C-C und C-O-C Bindungen unregelmäßig miteinander verbunden sind. Die Polymerisation erfolgt durch Reaktionen freier Radikalintermediate der Grundbausteine. Lignin erhöht die Festigkeit und Wasserundurchlässigkeit der Zellwände und schützt Cellulose und Hemicellulose vor Phytopathogenen. In vaskulären Pflanzen bestehen 10 – 30 % der Biomasse aus Lignin (KIRK et al. 1978; HAMMEL 1995; WHETTEN und SEDEROFF 1995, LANG et al. 1997).
Der natürliche Abbau von Lignin (Ligninolyse) erfordert - bedingt durch Grösse, unregelmässige Struktur und nicht hydrolisierbare Bindungen des Makromoleküls - einen extrazellulären, unspezifischen und oxidativen Prozess. Ligninolytische Enzyme vermitteln über Radikale verlaufende Reaktionen und ermöglichen holzbesiedelnden Pilzen den Zugriff auf Cellulose und Hemicellulose. So sekretieren auf Holz lebende Weißfäulepilze Laccasen, manganabhängige Peroxidasen (MnP) und Lignin-Peroxidasen (LiP) (BUMPUS et al. 1985; KIRK und FARRELL 1987; LANG et al. 1997; LEONOWICZ et al. 2001; HATAKKA 2001; HOFRICHTER 2002). Weissfäulepilze gehören zu den effektivsten Ligninabbauern. Entsprechend der ausgeschiedenen ligninolytischen Enzyme können fünf Gruppen der Weissfäulepilze unterschieden werden (HATAKKA 1994):

- Mn-und-Lignin-Peroxidase-Gruppe (MnP-LiP)
- Lignin-Peroxidase-und-Laccase-Gruppe (LiP-Lacc)
- Mn-Peroxidase-und-Laccase-Gruppe (MnP-Lac)
- Mn-Lignin-Peroxidase-und-Laccase-Gruppe (MnP-LiP-Lacc)
- Streuzersetzer (Mn-Peroxidase und Laccase).

Lignin-Peroxidasen (LiP; E.C. 1.11.1.14; Diarylpropan O_2, H_2O_2 Oxidoreduktasen) sind monomere Glykoproteine (GLENN et al. 1983) mit einem Häm im aktiven Zentrum. Sie benötigen H_2O_2 für katalytische Aktivität (TIEN und KIRK 1984, 1988; FAKOUSSA und HOFRICHTER 1999). Der katalytische Zyklus wird durch eine Zwei-Elektronen-Oxidation des nativen Fe(III) Enzyms durch H_2O_2 zu LiP Komponente I eingeleitet. Eine Ein-Elektronen-Reduktion von LiP Komponente I durch eine aromatische Verbindung führt zur Bildung von LiP Komponente II und einem aromatischen Radikal. Eine weitere Reduktion von LiP Komponente II durch ein aromatisches Molekül ergibt die native Form

des Enzyms und der katalytische Zyklus ist geschlossen (TIEN et al. 1986; WARIISHI et al. 1991; MESTER und TIEN 2000).
Lignin-Peroxidasen weisen eine breite Substratspezifität für aromatische Verbindungen auf und können sowohl phenolische als auch nicht-phenolische Strukturen oxidieren. Phenolische Verbindungen werden in Radikale überführt und disproportionieren zu Chinonen (ODIER et al. 1988). Nicht-phenolische Substrate werden zu Aryl-Kationradikalen oxidiert. Der nachfolgende spontane Sauerstoff-Einbau in die Moleküle führt zu Bindungsspaltungen (SCHOEMAKER et al. 1985, LUNDELL et al. 1993; FAKOUSSA und HOFRICHTER 1999).

Mn-Peroxidasen (MnP; E.C. 1.11.1.13; Mn(II): H_2O_2 Oxidoreduktasen) ähneln in ihrer Struktur den Lignin-Peroxidasen: sie sind monomere Glykoproteine (NIE et al. 1999) mit einem Eisen-Protoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe im aktiven Zentrum (GLENN und GOLD 1985; FAKOUSSA und HOFRICHTER 1999; MESTER und TIEN 2000).
Der katalytische Zyklus der Mangan-Peroxidase beinhaltet, ähnlich der Lignin-Peroxidase, natives Enzym, Komponente I und Komponente II (WARIISHI et al. 1988; MESTER und TIEN 2000). Als Elektronendonor fungiert jedoch Mn(II), das sowohl Komponente I und II reduziert und dabei zu Mn (III) oxidiert wird. Die Mn(III)-Ionen werden durch Chelatierung mit organischen Säuren (z. B. Oxalat, Malonat, Lactat) stabilisiert (WARIISHI et al. 1992). Die chelatierten Mn(III) fungieren als Redox-Mediatoren und können phenolische (WARIISHI et al. 1992), methoxylierte (MARTÍNEZ et al. 1996), sowie Nitro- und Chloraromaten (HOFRICHTER et al. 1998) oxidieren.

Laccasen (E.C. 1.10.3.2.; p-Benzendiol:O_2-Oxidoreduktasen) sind eine inhomogene Enzymgruppe glykolisierter Proteine mit einer hohen Variabilität der Molekulargewichte (THURSTON 1994; MAYER und STAPLES 2002). Sie werden den blauen oder Multi-Cu-Oxidasen zugerechnet und weisen vier Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) im katalytischen Zentrum auf (REINHAMMAR und MALMSTRÖM 1981; MESSERSCHMIDT 1997). Laccasen oxidieren phenolische Substrate über Ein-Elektronen-Reaktionen zu Phenoxyl-Radikalen während O_2 zu H_2O reduziert wird. Weitere Reaktionen der instabilen Radikale können sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch erfolgen (REINHAMMAR und MALMSTRÖM 1981; MESSERSCHMIDT 1997). Laccasen bevorzugen Mono-, Di- und Polyphenole als Substrate (BUSWELL und ODIER 1987; FAKOUSSA und HOFRICHTER 1999) und können bei Anwesenheit von Mediatorsubstanzen (z.B. ABTS) auch nicht-phenolische aromatische Verbindungen oxidieren (JOHANNES und MAJCHERCZYK 2000).

Die geringe Spezifität der Enzyme des ligninolytischen Systems lässt auch organische Schadstoffe als mögliche Substrate vermuten. *Phanerochaete chrysosporium* - ein ligninolytischer Basidiomycet - kann Benz[a]pyren, DDT, chlorierte Aniline und polychlorierte Biphenyle mineralisieren. Die Fähigkeit zum Abbau der Xenobiotika korreliert hierbei eng mit der ligninolytischen Aktivität und ist vom Sekundärmetabolismus in der Idiophase des pilzlichen Wachstums abhängig (KIRK et al. 1978; ARJMAND und SANDERMANN 1985; EATON 1985; BUMPUS et al. 1985; HAMMEL 1995; DEOBALD und CRAWFORD 2002; BENNETT et al. 2002).
Ein Katabolismus von PAK in Weissfäulepilzen kann auch ohne Mitwirkung ligninolytischer Enzyme erfolgen (BUMPUS et al. 1985; EATON 1985; KENNEDY et al. 1990; DHAWALE et al. 1992; SCHÜTZENDÜBEL et al. 1999). Der idiophasische Metabolismus ähnelt unter diesen Bedingungen dem Abbauweg in nicht-ligninolytischen Pilzen und anderen Eukaryoten (POTHULURI et al. 1993; HAMMEL 1995; SCHÜTZENDÜBEL et al. 1999).
Ligninolyse wurde auch für andere Pilzgruppen, z. B. für im Boden vorkommende Fungi imperfecti, beschrieben (RODRIGUEZ et al. 1996; REGALADO et al 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte für 9 von 12 untersuchten Stämmen aquatischer Hyphomyceten ligninolytische Aktivität nachgewiesen werden (s. Kap. 3.1). Die Fähigkeit zur Ligninolyse kann auf die Anpassung an den natürlichen Lebensraum (kleine und mittlere Fliessgewässer) zurückgeführt werden. Im Habitat sind aquatische Hyphomyceten auf den Eintrag von Blättern und Zweigen ufernaher Gehölze als Nahrungsgrundlage angewiesen (ALLAN 1995). Sie dominieren den Blattabbau und konditionieren pflanzliche Biomasse für den Konsum durch Makroinvertebraten (SUBERKROPP und KLUG 1981; SUBERKROPP 1992; BÄRLOCHER 1992). Voraussetzungen hierfür sind Enzymsysteme, die den Zugriff auf die Wachstumssubstrate Cellulose und Hemicellulose ermöglichen (CHANDRASHEKAR und KAVERIAPPA 1988). Diese Polysaccharide bilden in Pflanzen eine Einheit mit dem Lignin (Lignocellulose) (WHETTEN und SEDEROFF 1995). In vivo erleichtert der cometabolische Ligninabbau den Zugriff auf Hemicellulose und Cellulose (LANG et al. 1997; HATAKKA 2001).
Die höchsten ligninolytischen Aktivitäten der aquatischen Hyphomyceten wurden überwiegend auf Vollmedium nachgewiesen (s. Kap. 3.1). Da Lignin nicht als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann, müssen in vitro Cellulose und Hemicellulose durch geeignete C-Quellen (z. B. Glucose) ersetzt werden (KIRK et al. 1978; DEOBALD und CRAWFORD 2002). Das verwendete Vollmedium (Malz, Pepton, Agar) enthält Kohlenstoff- und Energiequelle und ermöglicht so den Cometabolismus von Lignin.

Zwei der untersuchten Stämme zeigten nur auf Mangelmedium (Agar, Ammoniumnitrat) ligninolytische Aktivität. Ursache hierfür könnte die Limitierung eines essentiellen Nährstoffes sein. In filamentösen Pilzen korreliert die Produktion von Sekundärstoffen und Enzymen nicht mit dem Wachstum, sondern wird durch Nährstoffmangel ausgelöst (BENNETT et al. 2002). Die Enzyme des Sekundärstoffwechsels unterliegen somit Regulationseffekten wie Stickstoff- oder Katabolitrepression. So wird bei Vorhandensein zweier Substrate im Medium das Substrat, welches schnelleres Wachstum ermöglicht, bevorzugt (z. B. Glucose vor Lactose). Die Bildung von Enzymen, die zum Abbau des zweiten Substrates benötigt werden, unterliegt einer Repression. Nach dem Verbrauch des besser verwertbaren Substrats erfolgt eine Derepression der Enzymsynthese und der Abbau von Substrat zwei ist möglich (Diauxie; FRITSCHE 2002).
Das verwendete Mangelmedium enthielt zwar Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, aber der Grossteil der Stämme zeigte auf diesem Medium ein geringeres Wachstum im Vergleich zum Vollmedium. Als Kohlenstoffquelle ist der Agar - der überwiegend aus einem Polysaccharidgemisch von Agarose und Agaropectin besteht - geeignet. Die eingesetzte Ammoniumnitratkonzentration von 0,1 % entspricht 25 mM Stickstoff. Stickstoffkonzentration und C/N-Verhältnis beeinflussen die ligninolytische Aktivität eines Pilzes. In Flüssigkulturen fördern hohe Stickstoffkonzentrationen (20 mM N) das Wachstum von Weißfäulepilzen, führen aber zu einem verringertem Ligninabbau gegenüber einem stickstofflimitiertem Medium (2 mM N) (KIRK et al. 1978; FENN und KIRK 1981; RÜTTIMANN-JOHNSON et al. 1993). Demgegenüber wurde für bodenbesiedelnde Fungi imperfecti eine Ligninolyse unter hohen Stickstoffkonzentrationen beschrieben (RODRIGUEZ et al. 1996; REGALADO et al. 1997). Die Bedingungen im Boden - hohe Stickstoffkonzentration, hohe pH-Werte, niedriges C/N-Verhältnis - entsprechen nicht den optimalen Bedingungen für eine Ligninolyse durch Weißfäulepilze (KIRK und FARRELL 1987; ODIER und ARTAUD 1992; ENTRY und BACKMAN 1995).

Die grösste ligninolytische Aktivität aller untersuchten aquatischen Hyphomyceten besitzt der *Heliscus lugdunensis*-Stamm H4-2-4 vom Standort Stadtborn Hergisdorf. Auf allen untersuchten Ligninpräparaten konnte ligninolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die ausgeprägteste Ligninolyse wurde auf Lignin, das mit organischen Lösungsmitteln aus Holz extrahiert wurde (organosolv), nachgewiesen. Die chemische Struktur wird hierbei - im Vergleich zu anderen Ligninisolaten - am wenigsten modifiziert, so dass es eine grosse Ähnlichkeit zum ursprünglichen Lignin aufweist (DEOBALD und CRAWFORD 2002). Der Stamm H4-2-4 zeigte für dieses Präparat ligninolytische Aktivität auf Voll- und Mangelmedium.

Die ligninolytische Aktivität der untersuchten Stämme wird durch die Enzyme des ligninolytischen Systems vermittelt. So wurden für aquatische Hyphomyceten Laccase-Aktivitäten beschrieben. ABDEL-RAHEEM (1997) wies Laccase für aquatische Hyphomyceten aus dem Nil über einen Agarplattentest und mittels spektrometrischer Bestimmung im Kulturfiltrat nach. WELTER (2002) untersuchte u.a. aquatische Hyphomyceten aus schwermetallbelasteten Gewässern des Mansfelder Landes. Unter den Isolaten befanden sich - die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Stämme - *H. lugdunensis* H4-2-4 und *H. lugdunensis* H8-2-1. Beide Stämme zeigten im Agarplattentest mit ABTS (2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzothioazolin-6-sulfonsäure)) Laccase-Aktivität. Für *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde eine maximale enzymatische Aktivität von 26 U/L im Kulturfiltrat - nach Induktion mit 1 mM Vanillinsäure und 50 µM Kupfersulfat - bestimmt. Die Laccase-Aktivitäten sind geringer als in Weissfäulepilzen (5500 U/L in *Trametes versicolor*; COLLINS und DOBSON 1997) und Braunfäulepilzen (109 U/L in *Laetiporus sulfureus*; HÖFER 2000).

Die ligninolytische Aktivität von *H. lugdunensis* H4-2-4 korreliert mit den verfügbaren Daten zur Gewässerbelastung. Am ursprünglichen Standort (Stadtborn Hergisdorf) wurden überdurchschnittliche Schwermetallkonzentrationen in Wasser und Sediment gemessen (Anhang Tab. 22) (KRAUSS et al. 2001).
Einen Zusammenhang zwischen Gewässerbelastung und ligninolytischer Aktivität zeigten auch weitere untersuchte Stämme von *Heliscus lugdunensis*. Die Isolate stammen von Standorten, die sich in hydrochemischen Eigenschaften und Schwermetallbelastung (Anhang Tab. 21, Tab. 22) unterscheiden. Ligninolytische Aktivität konnte für die Stämme von den Standorten H3 und H4 nachgewiesen werden. Der Schwermetallgehalt ist in diesen Gewässern am höchsten. Geringe oder keine ligninolytische Aktivität zeigten die *Heliscus lugdunensis*-Stämme von H6 und H8. Die Schwermetallkonzentrationen in Wasser und Sediment der Standorte H6 und H8 liegen bis zu 3 Grössenordnungen unter den Werten von H3 und H4 (KRAUSS et al. 2001). Keine ligninolytische Aktivität konnte für den Kontroll-Stamm *Heliscus lugdunensis* BB aus einem unbelasteten kanadischen Fließgewässer nachgewiesen werden.
Heliscus lugdunensis H4-2-4 kann schwefelreiche Verbindungen (Thiolate) synthetisieren, welche eine Voraussetzung für eine erhöhte Schwermetall-Toleranz sein könnten (FRIEDENBERGER 1996; MIERSCH et al. 1997; PIERAU 1999). Ein hoher Schwermetallgehalt des Wassers kann - neben der toxischen Wirkung auf den aquatischen Hyphomyceten - zur Akkumulation der Metalle auf Blattoberflächen führen und so den Zugang zum Substrat erschweren (SCHULTHEIS und HENDRICKS 1999; SRIDHAR et al. 2001). Die ligninolytische Aktivität von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 könnte unter diesen Bedingungen einen Selektionsvorteil darstellen, da sie den Pilz zum Wachstum auf

anderen Substraten - wie Wurzeln von gewässernahen Bäumen oder eingetragenem Holz - befähigt (SRIDHAR et al. 2001).
Die Aktivität ligninolytischer Enzyme kann zudem von Schwermetallen beeinflusst werden. So sind $CuSO_4$, $MnSO_4$, $FeCl_3$, $ZnSO_4$ und $Cd(NO_3)_2$ Induktoren von Laccase-Aktivität im Weissfäulepilz *Pleurotus ostreatus* (PALMIERI et al. 2000; BALDRIAN und GABRIEL 2002). Die Aktivität des kupferhaltigen Enzyms Laccase wird im untersuchten Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 durch Kupfersulfat induziert (WELTER 2002). Die Aktivität von Mangan-Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* wird durch Cd erniedrigt und führt zu einem verringerten PAK-Abbau im Boden. Cu und Hg erhöhten dagegen die Aktivität dieses Enzyms (BALDRIAN et al. 2000; BALDRIAN und GABRIEL 2002). Demnach spielen Schwermetalle eine bedeutende Rolle in der Regulation der Aktivität ligninolytischer Enzyme.
Die ligninolytische Aktivität der untersuchten Stämme kann jedoch vorwiegend auf ihre natürliche Rolle im ursprünglichen Habitat zurückgeführt werden: aquatische Hyphomyceten verwerten eingebrachte pflanzliche Biomasse und konditionieren sie für den Konsum durch Makroinverbraten. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse zum ligninolytischen Screening unterstützt (s. Tab. 7). So zeigten die Stämme vom Standort H9 relativ hohe ligninolytische Aktivitäten, das Wasser ist hingegen durch den geringsten Schwermetallgehalt der untersuchten Standorte gekennzeichnet.

4.2 PAK-Metabolismus aquatischer Hyphomyceten

Die Untersuchungen zum PAK-Metabolismus in der vorliegenden Arbeit konzentrieren sich auf *Heliscus lugdunensis* H4-2-4. Der Stamm zeigte die höchste ligninolytische Aktivität der untersuchten aquatischen Hyphomyceten (s. Kap. 3.1). Eigenschaften dieses Stammes sind bereits dokumentiert, da Publikationen zu Wachstumsverhalten, Induktion schwefelreicher Peptide unter Schwermetallstress und Aktivitäten antioxidativer Enzyme vorliegen (FRIEDENBERGER 1996; PIERAU 1999; GROSS 2000).
Als Modellverbindungen wurden Naphthalen und Fluoren gewählt. Beide Verbindungen wurden in natürlichen Gewässern nachgewiesen und besitzen eine hohe Toxizität für aquatische Organismen (THOMAS et al. 1981; GRIMMER und POTT 1983; US EPA 1980a, b; CASELLAS et al. 1995; s.a. Kap. 1.2, 1.4).

Das klassische Modell des Xenobiotika-Stoffwechsels unterteilt den Metabolismus einer Verbindung in mehrere Phasen. In Phase I werden funktionelle Gruppen in das Molekül eingeführt. Die Funktionalisierung umfasst Oxidation, Reduktion und Hydrolyse der Verbindung und führt im allgemeinen zu einer Erhöhung der Hydrophilie. Die

Stoffwechselprodukte können toxischer (Aktivierung) oder weniger toxisch (Detoxifikation) als der Ausgangsstoff sein.
Als Phase II wird die Konjugation von Xenobiotika oder ihren Phase I - Metaboliten mit endogenen Verbindungen bezeichnet. Reaktionen der Phase II umfassen u. a. Konjugationen mit Glucuronsäure, Sulfaten oder Aminosäuren. Es entstehen wasserlösliche Produkte, die ausgeschieden werden können und somit zu einer Entgiftung führen. Weitere Reaktionspartner sind Methyl-, Ethyl- oder Acetylgruppen. Diese Konjugationsreaktionen führen zu einer Erhöhung der Lipophilie (SCHEUNERT 1994; OESCH und ARAND 1999).

4.2.1 Metabolismus von Naphthalen und 1-Naphthol in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Heliscus lugdunensis H4-2-4 bildete in Flüssigkultur (Malz/Pepton) nach Applikation von Naphthalen die Metabolite 1-Naphthol und 1,4-Naphthochinon (s. Kap. 3.2.2). Da der Hyphomycet nur geringe Mengen der Metabolite bildete, wurde in weiteren Versuchen 1-Naphthol als Ausgangsverbindung eingesetzt.
Nach Zugabe von 1-Naphthol zu Flüssigkulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnten 1,4-Naphthochinon, 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat als Metabolite nachgewiesen werden. Eine Metabolitbildung erfolgte in allen untersuchten Medien (s. Kap. 3.2.3).
1,4-Naphthochinon und 1-Naphthol sind, neben 2-Naphthol, 1,2-Naphthochinon, Naphthalen *trans*-1,2-dihydrodiol, 4-Hydroxy-1-tetralon und den Produkten von Konjugationsreaktionen, bekannte Metabolite des Naphthalenstoffwechsels in filamentösen Pilzen (CERNIGLIA und GIBSON 1977; CERNIGLIA et al. 1978; CERNIGLIA et al. 1982; ZHANG et al. 1996).
Die Bildung von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach Zugabe von Naphthalen zu Flüssigkulturen ist auf die Aktivität des Phase I-Enzyms Cytochrom P450 Monooxygenase zurückzuführen.
Die Cytochrom P450 Monooxygenase katalysiert die Bildung eines Epoxids aus Naphthalen. Das entstehende Naphthalen-1,2-oxid ist in wässriger Lösung instabil und wird entweder spontan zu Phenolen isomerisiert oder enzymatisch durch die Epoxid-Hydrolase in Naphthalen *trans*-1,2-Dihydrodiol überführt (CERNIGLIA et al. 1992). Ausgehend vom *trans*-Dihydrodiol entstehen 1,2-Dihydroxynaphthalen und 1,2-Naphthochinon (CERNIGLIA und GIBSON 1977).
Die spontane Isomerisierung, genannt NIH-Shift (DALY et al. 1972), führt zur Bildung von 1-Naphthol (95 %) und 2-Naphthol (5 %) (CERNIGLIA et al. 1978). Der

Metabolismus vom 1-Naphthol kann über 1,4-Dihydroxynaphthalen und 1,4-Naphthochinon zur Bildung von 4-Hydroxy-1-tetralon führen (CERNIGLIA und GIBSON 1977). Weitere bekannte Stoffwechselprodukte des 1-Naphthols sind Glucuronid- und Sulfat-Konjugate (CERNIGLIA et al. 1982; ZHANG et al. 1996).

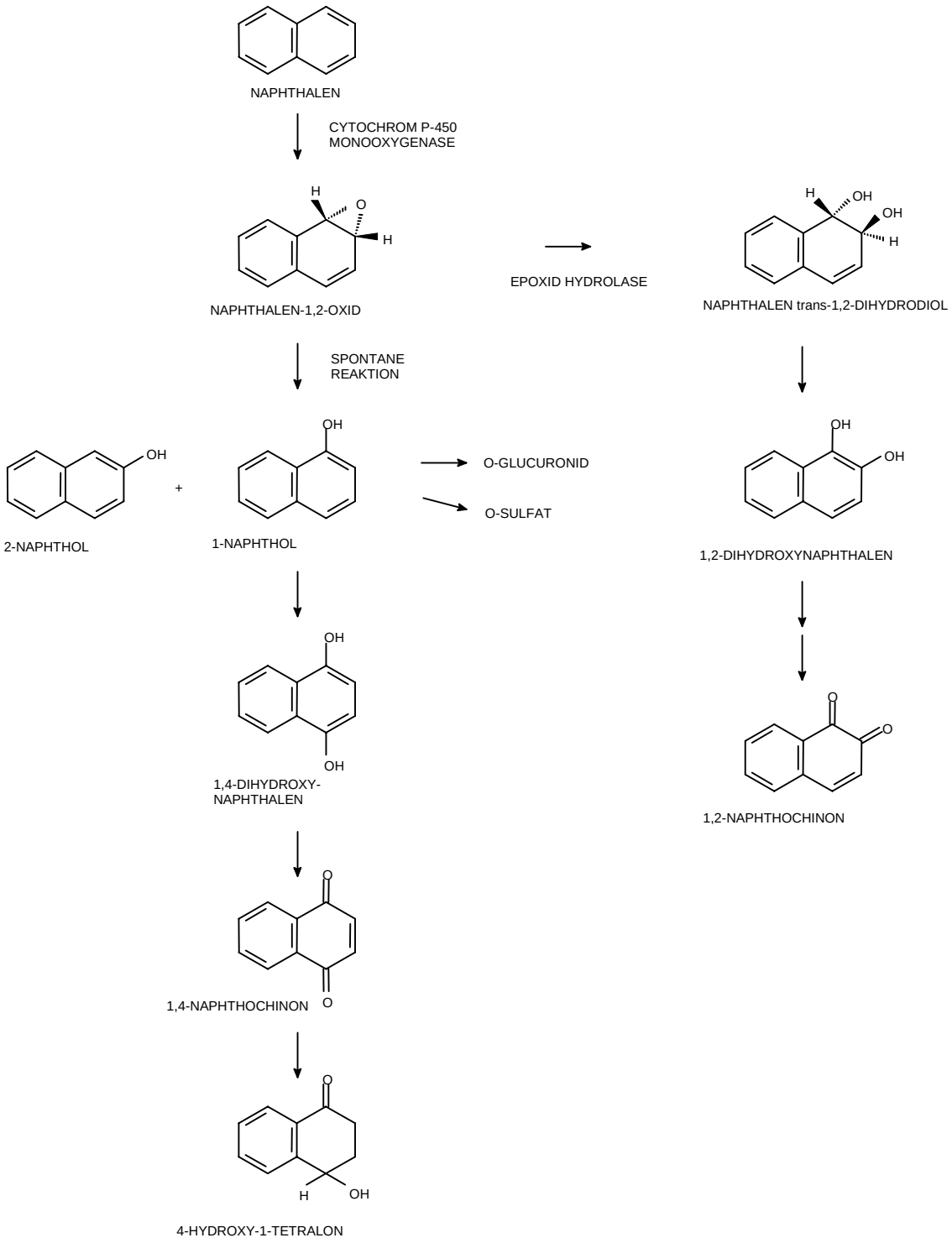


Abb. 38: Naphthalenmetabolismus in filamentösen Pilzen (nach CERNIGLIA et al. 1992)

Eine Übersicht über den Naphthalenmetabolismus in Pilzen zeigt Abb. 38.

Die Fähigkeit zur Bildung von 1-Naphthol aus Naphthalen ist unter den Pilzen weit verbreitet. Für den Grossteil der Pilze, die 1-Naphthol bilden, wurde auch 2-Naphthol nachgewiesen. Für Vertreter der Zygomyceten, Ascomyceten und Basidiomyceten konnten auch die weiteren Metabolite des Naphthalenabbaus (Naphthalen *trans*-1,2-dihydrodiol, 1,4-Naphthochinon, 4-Hydroxy-1-tetralon, 1,2-Naphthochinon) nachgewiesen werden. Die meisten der naphthalenmetabolisierenden Deuteromyceten dagegen scheinen auf die Bildung von 1-Naphthol und 2-Naphthol beschränkt zu sein. Für einige Ausnahmen wurden weitere Metabolite nachgewiesen: so ist *Candida lipolytica* zur Bildung von Naphthalen *trans*-1,2-dihydrodiol und 4-Hydroxy-1-tetralon befähigt (CERNIGLIA et al. 1992). Tab. 20 zeigt eine Übersicht über Pilze verschiedener Klassen und den nachgewiesenen Metaboliten des Naphthalenstoffwechsels.

Tab. 20: Übersicht über naphthalenmetabolisierende Pilze:
Systematik und nachgewiesene Metabolite (nach CERNIGLIA et al. 1992)

Klasse	Art	Metabolite						Referenz
		1-Naphthol	2-Naphthol	Naphthalen trans 1,2-dihydrodiol	1,2-Naphthochinon	1,4-Naphthochinon	4-Hydroxy-1-tetralon	
Zygomyceten	*Cunninghamella elegans*	x	x	x	x	x	x	1
	Cunninghamella japonica	x	x	x	x	x	x	1
	Syncephalastrum racemosum	x	x	x	x	x	x	1
Ascomyceten	*Claviceps paspali*	x	x	x	x	x	x	1
	Neurospora crassa	x	x	x	x	x	x	1
	Saccharomyces cerevisiae	x	x	x				2
	Sordaria fimicola	x	x					1
Basidiomyceten	*Psilocybe cubensis*	x	x	x	x	x	x	1
	Psilocybe strictipes	x	x	x	x	x	x	1
	Psilocybe stuntzii	x	x	x	x	x	x	1
	Panaeolus cambodginensis	x	x					1
	Panaeolus subbalteatus	x	x					1
Deuteromyceten	*Aspergillus niger*	x	x					1
	Aspergillus ochraceus	x						1
	Candida lypolytica	x	x	x			x	2,3
	Candida utilis	x						2
	Epicoccum nigrum	x	x					1
	Penicillium chrysogenum	x	x					1

Referenzen
[1] CERNIGLIA et al. 1978
[2] HOFMANN 1986
[3] CERNIGLIA und CROW 1981

Monooxygenase-Aktivitäten wurden auch für Bakterien nachgewiesen: 1-Naphthol ist ein Metabolit des Naphthalenstoffwechsels in diesen prokaryotischen Organismen (CERNIGLIA et al. 1984; CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; KELLEY et al. 1990; ANNWEILER et al. 2000).

Die Bildung von 1-Naphthylsulfat in 1-Naphthol-haltigen Kulturen des Untersuchungsobjektes *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 (s. Kap. 3.2.3) ist auf die Aktivität des Phase II-Enzyms PAPS-Sulfotransferase zurückzuführen. Die Sulfatkonjugation ist ein verbreiteter Detoxifikationsmechanismus für PAK in Pilzen und Säugetieren. Für Pilze wurden Sulfatkonjugate u.a. von Anthracen, Benz[a]anthracen, Benz[a]pyren, Pyren und Naphthalen beschrieben (CERNIGLIA und GIBSON 1978; CERNIGLIA 1982; CERNIGLIA et al. 1982, 1985; THAKKER et al. 1985; LANGE et al. 1994; WUNDER et al. 1997).
Im Zygomyceten *Cunninghamella elegans* wies die PAPS-Sulfotransferase, neben der Glutathion-S-Transferase, die höchste Aktivität der untersuchten Phase II-Enzyme auf (CERNIGLIA et al. 1982; ZHANG et al. 1996). Als Substrat für den Enzymtest wählten ZHANG et al. (1996) 1-Naphthol und wiesen so die direkte Konjugation des hydroxylierten Naphthalens durch das cytosolische Enzym nach.

Der Nachweis von 1-Methoxynaphthalen in Kulturen des untersuchten Stammes *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 (s. Kap. 3.2.3) stellt - im Zusammenhang mit dem pilzlichen Naphthalenmetabolismus - ein Novum dar.
Methoxylierte PAK-Metabolite in Pilzkulturen wurden bisher für *Penicillium glabrum* (WUNDER et al. 1997) und *Aspergillus niger* (SACK et al. 1997a) beschrieben. Der bodenbesiedelnde Stamm *Penicillium glabrum* TW 9424 bildete 1-Methoxypyren und 1,6-Dimethoxypyren als Produkte des Pyrenmetabolismus. Die Methoxypyrene wurden auch nach Inkubation mit 1-Hydroxypyren nachgewiesen. Katalysiert wurde die Reaktion von einer Methyltransferase mit S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Coenzym und Methylgruppen-Donor (WUNDER et al. 1997). Der *Aspergillus*-Stamm wurde aus einem Kohlenwasserstoff-belasteten Boden isoliert und bildete 1-Methoxyphenanthren und 1-Methoxypyren (SACK et al. 1997a).
Die O-Methylierung ist im pilzlichen Sekundärstoffwechsel verbreitet. Sekundäre Naturstoffe mit Methoxy-Substituenten sind z. B. fungizide Strobilurine (ANKE et al. 1990) und Oudemansine (ZAPF et al. 1995) aus Basidiomyceten und verschiedene biologisch aktive Anthrachinone aus *Aspergillus glaucus* (ANKE et al. 1980). Pilzliche O-Methyltransferasen wurden aus *Aspergillus parasiticus* (KELLER et al. 1993) und *Alternaria tenuis* (STINSON und MOREAU 1986) isoliert und charakterisiert. Beide Enzyme benötigten SAM zur Biosynthese von Mycotoxinen.

Eine Methylierung von Xenobiotika wurde für verschiedene Arten von Basidiomyceten der Gattung *Mycena* nachgewiesen. Die Methylierung von 2,3,5,6-Tetrachlorohydrochinon, einem Intermediat des Pentachlorophenol-Abbaus, führte zur Bildung von Tetrachloro-4-methoxyphenol (KREMER et al. 1992). Tetrachloro-4-methoxyphenol ist auch als Drosophilin A - einem Produkt des Sekundärstoffwechsels in Pilzen - bekannt (SCHWARZ et al. 1992).

Das marine Cyanobakterium *Agmenellum quadruplicatum* konnte in phenanthrenhaltigen Kulturen 1-Methoxyphenanthren bilden (NARRO et al. 1992). Weiterhin wurde das Wachstum von *Agmenellum quadruplicatum* durch 9-Methoxyphenanthren weniger gehemmt als durch 9-Hydroxyphenanthren. NARRO et al. vermuteten, dass die Methylierung der Hydroxylverbindung einen Entgiftungsmechanismus durch das Cyanobakterium darstellt.

Eine Entgiftung durch Konjugation, wie z. B. durch Sulfat-, Glucosid- oder Glucuronid-Bildung, geht in der Regel mit einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit einher. Die Methylierung von Hydroxylgruppen senkt jedoch die Wasserlöslichkeit der phenolischen Verbindung. Methoxylierte PAK scheinen jedoch nicht ausschliesslich als Endprodukte anzufallen, da WUNDER et al. (1997) nach der Applikation von 1-Methoxypyren eine Metabolisierung durch *Penicillium glabrum* nachweisen konnten. Als Metabolite wurden 1,6-Dimethoxypyren, 1-Hydroxypyren und 1-Pyrenylsulfat identifiziert. Drei weitere unidentifizierte Metabolite zeigten UV-Spektren, die nahezu identisch mit den Spektren von 1,6-Dihydroxypyren und 1,6-Dimethoxypyren waren. WUNDER et al. schlossen daraus auf weitere Hydroxylierungen und Substitutionen am C6-Atom von 1-Methoxypyren.

Verschiedene Studien zeigten, dass die Methylierung phenolischer Hydroxylgruppen die antibakteriellen und antifungalen Wirkungen der Ausgangsverbindung vermindern kann (ANKE et al. 1980; GUPTA et al. 1981; NARRO et al. 1992; BUSWELL und ERIKSSON 1994). O-Methylierung von *para*-Hydroxylgruppen verschiedener Benzoe- und Zimtsäuren dagegen erhöhte die antifungalen Effekte (BUSWELL und ERIKSSON 1994).

Ausgehend von diesen Beobachtungen und dem Wissen von der bedeutenden Rolle der O-Methylierung für die pilzliche Biosynthese sekundärer Naturstoffe (s.o.), könnte die Bildung von methoxylierten PAK vorrangig auf enzymatische Aktivitäten des Sekundärstoffwechsels und nicht auf eine Konjugationsreaktion im Zusammenhang mit der pilzlichen PAK-Entgiftung zurückgeführt werden (WUNDER et al. 1997). So beschrieben LANGE et al. (1995) für den Pilz *Crinipellis stipitaria* eine Induktion des Sekundärstoffwechsel durch PAK.

1,4-Naphthochinon wurde in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach Applikation von Naphthalen (s. Kap. 3.2.2) und 1-Naphthol (s. Kap. 3.2.3) nachgewiesen. Im Vergleich zu den anderen Metaboliten - insbesondere 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat - wurde 1,4-Naphthochinon in geringer Menge gebildet.
Eine Ursache hierfür könnte die Weiterführung des Katabolismus in Richtung 4-Hydroxy-1-tetralon sein. Diese Möglichkeit kann für Kulturen von *H. lugdunensis* H4-2-4 in 50 mL Malz/Pepton mit 0,05 mM 1-Naphthol (s. Tab. 14) in Betracht gezogen werden. In diesen Ansätzen konnten nicht alle Metabolite identifiziert werden. So war für 4-Hydroxy-1-tetralon keine Standardsubstanz verfügbar. Dieser Metabolit oder seine Konjugate sind im Abbauweg nach 1,4-Naphthochinon lokalisiert und könnten als mögliche Endprodukte des Abbaus von 1-Naphthol akkumulieren. So wiesen CERNIGLIA und GIBSON (1977) für den Naphthalenmetabolismus durch den Zygomyceten *Cunninghamella elegans* nach 24 h 1-Naphthol (67,9 % der Gesamtmenge der Metabolite) und 4-Hydroxy-1-tetralon (16,7 %) als Hauptmetabolite der Essigesterphase nach. Der Anteil von 1,4-Naphthochinon betrug 2,8 %.
Der Massenfluss des Stoffwechsels von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 könnte auch auf die Konjugatbildung ausgerichtet sein (s. Abb. 38), so dass der Abbauweg in Richtung 1,4-Naphthochinon nur einen geringen Anteil am Gesamtumsatz ausmacht. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Versuche mit 150 mL Malz/Pepton-Medium und 50 mL Medium aus Erlenblättern (s. Tab. 14) gestützt. Beide Versuchsansätze führten zur bevorzugten Bildung von 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat.

4.2.1.1 Untersuchungen mit ^{13}C-Naphthalen zur Mineralisierung von Naphthalen in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Nach Zugabe von 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen zu Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium konnte eine Anreicherung von ^{13}C weder im Kohlendioxid der Gasphase noch in möglichen Metaboliten beobachtet werden (s. Kap. 3.2.2.1.1, 3.2.2.1.2). *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 war somit unter den gewählten Kulturbedingungen nicht zur Mineralisierung von Naphthalen befähigt. Die Änderung des Isotopenverhältnisses im CO_2 der Gasphase zugunsten von ^{12}C könnte auf eine Isotopenfraktionierung des Kohlenstoffes aus dem Wachstumssubstrat Glucose zurückzuführen sein. Fraktionierung stabiler Kohlenstoffisotope durch Pilze wurde sowohl in der Natur (HENN und CHAPELA 2001; HOBBIE et al. 2001) als auch in Kultur (WILL et al. 1986; HENN und CHAPELA 2000; HENN et al. 2002) beobachtet. Diese Fraktionierung kann zu einer Änderung des Isotopenverhältnisses im respirierten CO_2 führen (HENN und CHAPELA 2000).

Eine Mineralisierung von PAK wurde für Bakterien und Weissfäulepilze beschrieben (BUMPUS et al. 1985; KÄSTNER et al. 1994; HAMMEL 1995; SACK et al. 1997c; HOFRICHTER et al. 1998; BOONCHAN et al. 2000; BRESSLER und FEDORAK 2000; KÄSTNER 2000; SULLIVAN et al. 2001; FERRERO et al. 2002).

Mineralisierung von PAK durch Weissfäulepilze wurde u.a. nachgewiesen für *Phanerochaete chrysosporium* (7,7 % Phenanthren zu CO_2 in 27 Tagen; BUMPUS 1989) und *Trametes versicolor* (13,8 % Phenanthren und 2,4 % Pyren zu CO_2 nach 63 Tagen in Flüssigkultur; 34,1 % Pyren zu CO_2 nach 63 Tagen auf Stroh; SACK et al. 1997c). Die Mineralisierung kann auf die Enzyme des ligninolytischen Systems (Lignin-, Mangan-Peroxidase, Laccase) zurückgeführt werden (s. Kap. 4.1). So wurde für die Mangan-Peroxidase aus *Nematoloma frowardii* eine Mineralisierung von Phenanthren und Pyren, bei Vorhandensein von Mediatoren, nachgewiesen (SACK et al. 1997b; HOFRICHTER et al. 1998). Eine Mineralisierung von PAK durch ligninolytische Enzyme ist jedoch eher die Ausnahme, die Bildung von Metaboliten überwiegt (KÄSTNER 2000).

Eine Mineralisation oder Oxidation von Naphthalen durch ligninolytische Enzyme ist nicht dokumentiert. Es wurde angenommen, dass Naphthalen aufgrund seines relativ hohen Redoxpotentials kein Substrat von Peroxidasen und Laccase ist (HAMMEL 1995; BOGAN und LAMAR 1995). Jedoch zeigen Untersuchungen, dass auch Verbindungen mit einem vergleichsweise hohen Redoxpotential durch Laccase-Mediator-Systeme (LMS) oxidiert werden können (MAJCHERCZYK et al. 1998; JOHANNES und MAJCHERCZYK 2000; MAJCHERCZYK und JOHANNES 2000; SAPARRAT et al. 2002). Mediatoren sind niedrigmolekulare Verbindungen, die Oxidationsreaktionen als elektronentransferierende Verbindungen vermitteln. MAJCHERCZYK und JOHANNES (2000) wiesen die Oxidation von Naphthalen durch ein chemisch generiertes Mediator-Radikal (1-Hydroxybenzotriazol) ohne Laccase-Beteiligung nach.

Der untersuchte Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 verfügt über ligninolytische Aktivität (s. Kap. 3.1). Die Laccase-Aktivität ist im Vergleich zu Weissfäulepilzen gering: Laccase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4: 14 U/L (WELTER 2002); Laccase aus dem Braunfäulepilz *Laetiporus sulfureus*: 109 U/L (HÖFER 2000); Laccase aus *Trametes versicolor*: 5500 U/L (COLLINS und DOBSON 1997). Aufgrund der geringen Aktivität der Laccase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 ist eine Mineralisierung von - auch höherkondensierten - PAK durch dieses Enzym nicht wahrscheinlich. Eine Oxidation von 3-, 4- und 5-kernigen PAK ist jedoch nicht auszuschliessen, da zudem bisher keine Erkenntnisse zu Lignin-Peroxidase und Mangan-Peroxidase aus *H. lugdunensis* H4-2-4 vorliegen.

Laccase-Aktivitäten wurden auch für Bakterien nachgewiesen (ALEXANDRE und ZULIN 2000; DIAMANTIDES et al. 2000). Die Mineralisierung von PAK in Bakterien ist jedoch vorwiegend auf Stoffwechselwege zurückzuführen, die durch substratspezifische Enzyme gekennzeichnet sind. Eine Mineralisierung wird hierbei über die Nutzung der PAK als Kohlenstoff- und Energiequelle erreicht. Im Verlauf dieses Prozesses kommt es zur Bildung von CO_2 und Wasser (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; KÄSTNER 2000).

Der Katabolismus von Naphthalen in Bakterien gehört zu den bestuntersuchten PAK-Stoffwechselwegen. Stoffwechselintermediate und beteiligte Enzyme wurden identifiziert und charakterisiert (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; KÄSTNER 2000). Die Metabolisierung wird durch einen Naphthalen-Dioxygenase-Multienzymkomplex eingeleitet, der die Bildung von cis-1,2-Dihydroxy-1,2-Dihydronaphthalen katalysiert. Diese Verbindung wird in 1,2-Dihydroxynaphthalen überführt (JEFFREY et al. 1975; ENSLEY et al. 1982; KAUPPI et al. 1998), das als Substrat für ringspaltende Enzyme dient. Über Salicylsäure und Catechol (DAVIES und EVANS 1964) und die nachfolgende ortho- oder meta-Spaltung fliesst der PAK-Katabolismus in den Hauptstoffwechsel ein (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989). Neben der Naphthalen-Dioxygenase können auch Monooxygenasen den Abbau von Naphthalen einleiten (KELLEY et al. 1990). In den letzten Jahren wurde verstärkt der PAK-Metabolismus anaerober Bakterien untersucht. Der Naphthalenkatabolismus wird hierbei durch eine Carboxylierung - die zur Bildung von 2-Naphthoesäure führt - eingeleitet. Der weitere Abbau verläuft über substituierte Cyclohexane und nicht über monoaromatische Strukturen (ZHANG und YOUNG 1997; ZHANG et al. 2000; ANNWEILER et al. 2002).

Zu Bakterien, die Naphthalen als alleiniges Substrat nutzen können, zählen Pseudomonaden, *Rhodococcus opacus* und thermophile Bakterien (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; ANNWEILER et al. 2000; KÄSTNER 2000; UZ et al. 2000; DAANE et al. 2001; FERRERO et al. 2002).

Für den pilzlichen Naphthalenmetabolismus wurde eine Dioxygenase-Aktivität bisher nicht beschrieben. Die einzigen eukaryontischen Organismen, die dieses Enzym aufweisen, sind Mikroalgen (SEMPLE et al. 1999).

Die Analyse der Kulturen auf Metabolite mittels GC/C-IRMS belegen, dass der untersuchte Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 unter den gewählten Kulturbedingungen in Mineralmedium nicht zum Naphthalenkatabolismus befähigt ist. Die Messungen des CO_2-Gehaltes belegen jedoch einen Einfluss des Naphthalens auf den Stoffwechsel von *H. lugdunensis* H4-2-4. Die Zugabe von 0,2 mM des PAK führte zu einer erhöhten CO_2-Produktion (im Vergleich zur naphthalenfreien Kontrolle; Abb. 19). Als Ursache kann eine Schädigung des Pilzes angesehen werden, die zu einer erhöhten

Stoffwechsel-Aktivität führte. Beleg hierfür ist die Hemmung des Wachstums von *H. lugdunensis* H4-2-4 unter Naphthalenkonzentrationen dieser Grössenordnung (s. Kap. 3.2.1).

4.2.2 Einfluss von Kulturparametern auf den Metabolismus von Naphthalen und 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Der PAK-Abbau durch Bakterien und Pilze in aquatischen und terrestrischen Ökosystemen wird u.a. durch die Versorgung mit Sauerstoff, den pH-Wert, die Temperatur, dem Angebot an Nährstoffen, der Sediment-Toxizität, den jahreszeitlichen Einflüssen, der Bioverfügbarkeit der PAK und ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften beeinflusst (CERNIGLIA 1984; WANG et al. 1990; ATLAS 1991; MANILAL und ALEXANDER 1991; BREURE et al. 1992; GUERIN und BOYD 1992).
In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Flüssigmedien auf das Wachstum und den Metabolismus von Naphthalen und 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4 bestimmt (s. Kap. 3.2)

Die Degradation vieler organische Verbindungen durch filamentöse Pilze ist von der Bio-Verfügbarkeit einer weiteren C-Quelle abhängig (CERNIGLIA und CROW 1981; BUMPUS 1989; BENNETT et al. 2002).
Auch für den untersuchten Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte eine Erhöhung des Umsatzes von 1-Naphthol durch das Vorhandensein einer weiteren C-Quelle nachgewiesen werden. In Wasser wurde nach Applikation von 1-Naphthol die geringste Menge an Metaboliten gebildet. Grössere Mengen an Metaboliten wurden in Medien mit Kohlenstoff-Quellen (neben dem 1-Naphthol) gemessen (Tab. 14). Das Komplexmedium Malz/Pepton enthielt als C-Quelle das Disaccharid Maltose und ermöglichte den grössten Biomassezuwachs der untersuchten Nährlösungen. Eine schnelle Biomasse-Zunahme kann eine Erhöhung der Biodegradation bewirken, da der Abbau von Xenobiotika durch Pilze nicht nur von der Schadstoffkonzentration, sondern auch vom Verhältnis von Schadstoff zu Biomasse abhängig ist. Eine Zunahme der Biomasse bei unveränderter Schadstoffkonzentration führt zu einer geringeren Schadstoffmenge je Zelle und kann der Biodegradation förderlich sein (LINDSTROM und BROWN 1989; ALLEMAN et al. 1992).
Als ein weiteres Substrat für die Versuche mit *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurden Erlenblätter eingesetzt. In den natürlichen Habitaten sind Blätter das bevorzugte Substrat aquatischer Hyphomyceten, der Stoffwechsel ist an die Verwertung der Blätter angepasst (SUBERKROPP und KLUG 1976, 1981; BÄRLOCHER 1980, 1982; CHAMIER und

DIXON 1982; DIX und WEBSTER 1995). RAYNER und BODDY (1988) wiesen nach, dass Pilze durch die Adaption an ein spezielles Substrat (z. B.: Holz) die Biodegradation in einem Habitat dominieren können.

Für den Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte eine Relation zum Sauerstoffangebot nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.3). So ist die Bildung der Metabolite 1-Methoxynaphthalen und 1-Naphthylsulfat in Malz/Pepton-Kulturen vom Volumen der Gasphase und des Mediums abhängig. Eine Erhöhung des Sauerstoffangebotes im Verhältnis zum Medium - und der Biomasse - verschiebt das Metabolitspektrum zu 1-Naphthylsulfat und unidentifizierten Metaboliten (s. Kap. 3.2.3). Eine unidentifizierte Verbindung mit der Molekülmasse von 239 fragmentiert während der Massenspektrometrie. Das Fragment besitzt eine Masse (80), die einem Sulfat-Rest entspricht. Der unidentifizierte Metabolit könnte demnach ein Sulfatkonjugat sein. Das grössere Fragment weist eine Masse von 159 auf, was auf eine Struktur mit Naphthalen und zwei substituierten Sauerstoffatomen schliessen lässt. Mögliche Ausgangsverbindungen für die Sulfatisierung, die dieser Struktur entsprechen, sind 1,4-Dihydroxynaphthalen (M 160,17), 1,4-Naphthochinon (M 158,16) und 4-Hydroxy-1-tetralon (M 162,19). 1,4-Naphthochinon ist einer Konjugation durch Sulfotransferasen nicht zugänglich, da es keine Hydroxylgruppe enthält. 4-Hydroxy-1-tetralon ist ein Hauptmetabolit des Naphthalenstoffwechsels in filamentösen Pilzen (CERNIGLIA und GIBSON 1977; CERNIGLIA et al. 1982), aber die Molekülmasse weist eine relativ grosse Differenz zur Masse des Fragments auf. Ein weiterer Metabolit, der im Zusammenhang mit dem Naphthalenmetabolismus vorgeschlagen wurde, ist Naphthalen-1,4-endoperoxid (SCHÄFER-RIDDER et al. 1976). Die Reduktion dieser Verbindung würde 1,4-Dihydroxy-1,4-dihydronaphthalen (M 162,19) ergeben. Diese Verbindung wurde bisher nicht nachgewiesen, eine Metabolisierung zu 4-Hydroxy-1-tetralon ist jedoch vorstellbar. Die wahrscheinlichste Verbindung für eine Sulfat-Konjugation ist 1,4-Dihydroxynaphthalen. Diese Verbindung wurde von CERNIGLIA und GIBSON (1977) als Übergangsverbindung des pilzlichen Naphthalenmetabolismus postuliert. Eine Sulfatierung von 1,4-Dihydroxynaphthalen würde zur Bildung von 4-Hydroxy-1-Naphthylsulfat führen. Eine ESI-MS des Sulfats würde ein konjugiertes Enolat-Anion $[M-H]^-$ mit der Massezahl von 239 (Abb. 39) ergeben und somit dem gemessenen m/z-Wert entsprechen. Die Annahme, dass 1,4-Dihydroxynaphthalen als Ausgangsverbindung der Konjugation diente, wird durch den Nachweis von 1,4-Naphthochinon (s. Kap. 3.2.3) unterstützt. Diese Verbindung ist im Napthalenstoffwechsel nach 1,4-Dihydoxynaphthalen lokalisiert.

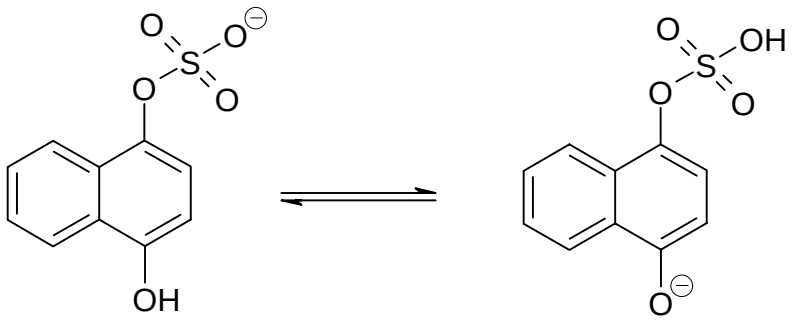


Abb. 39: konjugiertes Enolat-Anion von 4-Hydroxy-1-Naphthylsulfat

Die bevorzugte Bildung von 1-Naphthylsulfat, 1-Methoxynaphthalen und dem vorgeschlagenen Metaboliten 4-Hydroxy-1-Naphthylsulfat aus 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4 entspricht den Erkentnissen zum PAK-Stoffwechsel filamentöser Pilze. Mikromyceten bilden hydroxylierte PAKs als Einleitung zur Detoxifikation durch Konjugationsreaktionen (mitunter auch Aktivierung der Verbindung) und nicht für nachfolgende Ringspaltungen und Kohlenstoffaufnahme wie der Großteil der Bakterien (CERNIGLIA 1984; CERNIGLIA et al. 1992; SUTHERLAND 1992).

4.2.3 Metabolismus von Fluoren in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 und *Anguillospora* sp. GrJo 06-5

Fluorenmetabolite konnten für *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 und *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 nachgewiesen werden.

Heliscus lugdunensis H4-2-4 bildete 9-Fluorenol, wenn Fluoren als einzige C-Quelle in Wasser vorlag (s. Kap. 3.2.4). Die Wiederfindung von ca. 80 % der ursprünglichen Fluorenmenge im Kontrollansatz stimmt mit Literaturangaben - bei nahezu identischer Probenaufbereitung - überein (GARON et al. 2000: 80 %). Es wurden keine weiteren Metabolite identifiziert, wie z. B. dass erwartete 9-Fluorenon. 9-Fluorenon ist (neben 9-Fluorenol) ein Hauptmetabolit des Fluorenstoffwechsels in filamentösen Pilzen (POTHULURI et al. 1993; BEZALEL et al. 1996; GARON et al. 2000). Die Bildung von 9-Fluorenol in *Cunninghamella elegans* erfolgt durch die Oxidation von Fluoren am Kohlenstoffatom C-9. Die Reaktion wird von einer Monooxygenase katalysiert. 9-Fluorenol wird zu 9-Fluorenon und 2-Hydroxy-9-Fluorenon umgesetzt (POTHULURI et al. 1993) (Abb. 40).

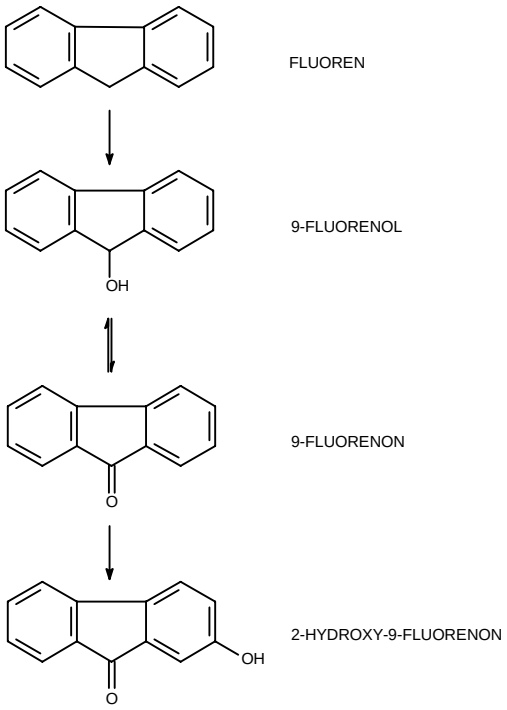


Abb. 40: Fluorenmetabolismus durch *Cunninghamella elegans* (POTHULURI et al. 1993)

Die Bildung von 9-Fluorenol und 9-Fluorenon wurde für nicht-ligninolytische und ligninolytische Pilze dokumentiert (BEZALEL et al. 1996; GARON et al. 2000).
Eine Mineralisation von Fluoren wurde für nicht-ligninolytische Pilze bisher nicht nachgewiesen (POTHULURI et al. 1993; GARON et al. 2000). Für ligninolytische Pilze konnten BOGAN und LAMAR (1996) eine Korrelation zwischen Fluorenabnahme und Transkription von Mangan-Peroxidase in *Phanerochaete laevis* nachweisen. Weiterhin vermitteln Laccase-Mediator-Systeme (LMS) eine Oxidation von Fluoren (MAJCHERCZYK und JOHANNES 2000; JOHANNES und MAJCHERCZYK 2000).
Der untersuchte Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 zeigte ligninolytische Aktivität (s. Kap. 3.1), so dass der weitere Abbau der Monooxygenase-Produkte des Fluorens nicht auszuschliessen ist. Die ausgeglichene Massenbilanz spricht jedoch gegen diese Annahme (Tab. 17).

Neben *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde in Kulturen von *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 in Malz/Pepton-Medium 9-Fluorenol nach Appplikation von Fluoren nachgewiesen. Es wurden keine weiteren Metabolite identifiziert (s. Kap. 3.2.5).

Die Fähigkeit zur Bildung von 9-Fluorenol und 9-Fluorenon wurde für Pilzstämme der Ascomyceten, Basidiomyceten, Deuteromyceten und Zygomyceten nachgewiesen (GARON et al. 2000). Zu den effektivsten Fluorenabbauern gehören Vertreter der Gattung

Cunninghamella. So metabolisieren *Cunninghamella elegans* und *Cunninghamella echinulata* in einem synthetischen Flüssigmedium mit Glucose als C-Quelle über 90 % des verfügbaren Fluorens (Ausgangskonzentration: 0,03 mM) in 48 h (GARON et al. 2000). Neben diesen Zygomyceten sind auch unter den Deuteromyceten effiziente Fluorenabbauer. GARON et al. 2000 untersuchte 16 Stämme dieser Gattung und fand die grösste Fluorenabnahme (nach 120 h; Fluoren-Konzentration: 0,005 g/L) in Kulturen von *Aspergillus terreus* (67 % ± 2), *Colletotrichum dematium* (64 % ± 2), *Drechslera spicifera* (93 % ± 6) und *Embellisia annulata* (93 % ± 3). Ein Stamm zeigte keine Fluorenabnahme (*Rhodotorula rubra*).

9-Fluorenol und 9-Fluoren können ebenfalls als Metabolite des Fluorenstoffwechsels in Bakterien auftreten (BRESSLER und FEDORAK 2000). Bakterien verfügen über verschiedene Abbauwege, so kann *Arthrobacter* sp. Stamm F101 Fluoren über drei verschiedene Abbauwege metabolisieren (Anhang Abb. 51) (CASELLAS et al. 1997). Zwei der Abbauwege werden - ähnlich dem Naphthalenabbau - durch Dioxygenase-Reaktionen eingeleitet. Der dritte Stoffwechselweg beginnt mit einer Monooxygenase-vermittelten Reaktion am Kohlenstoffatom C9 (CASELLAS et al. 1997). Bakterien können Fluoren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (GRIFOLL et al. 1994; BRESSLER und FEDORAK 2000).

Aus Fluoren kann durch Spaltung des C5-Ringes Biphenyl entstehen. Ein Katabolismus dieser Verbindung wurde für verschiedene Bakterien beschrieben und ähnelt dem Abbau von Dibenzofuran (SELIFONOV et al. 1993; GRIFOLL et al. 1994; TRENZ et al. 1994).

Heliscus lugdunensis H4-2-4 bildete 9-Fluorenol in Wasser, im Malz/Pepton-Medium dagegen nicht. Mögliche Erklärungen für dieses Verhalten sind: In Malz/Pepton-Medium hat *H. lugdunensis* H4-2-4 Zugriff auf leicht zugängliche Kohlenstoff- und Energiequellen. SCHMIDT und ALEXANDER (1985) zeigten, dass bei Vorhandensein zweier C-Quellen, Mikroorganismen die am leichtesten assimilierbare und am höchsten konzentrierte Verbindung nutzen (s.a. FRITSCHE 2002). Andererseits erfolgt in filamentösen Pilzen der Abbau vieler organischer Verbindungen cometabolisch (CERNIGLIA und CROW 1981; BUMPUS 1989; BENNETT et al. 2002). So könnte der Nachweis von 9-Fluorenol in Malz/Pepton-Kulturen von *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 auf einen Cometabolismus zurückgeführt werden.

In Wasser - mit Fluoren als einzigem Zusatz - ist *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mit Nahrungsmangel und Toxizität des PAK konfrontiert. Die Metabolitbildung könnte auf den Versuch des Pilzes das Fluoren als Kohlenstoffquelle zu erschliessen und/oder eine Entgiftung des PAK durch Hydroxylbildung zurückzuführen sein. Hydroxylierte PAK sind im Allgemeinen weniger toxisch als die unsubstituierten Ausgangsverbindungen (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; POTHULURI et al. 1992b). Eine

wachstumshemmende Wirkung von Fluoren unter den eingesetzten Konzentrationen konnte sowohl für *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 als auch *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 nachgewiesen werden (Abb. 33).

Für *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 und *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte zwar 9-Fluorenol, aber kein 9-Fluorenon nachgewiesen werden. In nahezu allen bisher durchgeführten Untersuchungen an Mikromyceten wurden jedoch bei nachgewiesenem Fluorenmetabolismus beide Verbindungen identifiziert (POTHULURI et al. 1993; BEZALEL et al. 1996; GARON et al. 2000). Ausnahmen sind *Phanerochaete chrysosporium*–Stämme, deren ligninolytisches System weitere Abbauwege ermöglicht (KUHAD et al. 1997; GARON et al. 2000). So wurde für *P. chrysosporium* CMPG 638 9-Fluorenon, aber kein 9-Fluorenol nachgewiesen (GARON et al. 2000). Deuteromyceten, Ascomyceten und Zygomyceten bildeten stets beide Metabolite. In Deuteromyceten wurde nach 2-tägiger Kultivierung in einem synthetischen Medium 9-Fluorenol in höherer Konzentration nachgewiesen als 9-Fluorenon. Ascomyceten und Zygomyceten wiesen zu diesem Zeitpunkt ein ausgeglichenes Verhältnis der Metabolite auf (GARON et al. 2000). Das Verhältnis der Metabolite ist abhängig von der Abbaufähigkeit des Pilzes und der Zeit. *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 zeigte mit zunehmender Versuchsdauer eine stetige Zunahme von 9-Fluorenon. Nach 120 h waren 69 % des Fluorens metabolisiert, wobei 62 % als 9-Fluorenon vorlagen (POTHULURI et al. 1993). Ausgehend von diesem Wissen sind weitere Untersuchungen an *Anguillospora* sp. GrJo 06-5 und *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in verschiedenen Flüssigmedien notwendig, um den Stoffwechsel von Fluoren durch diese Stämme genauer zu charakterisieren.

4.3 Enzymatische Untersuchungen an *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

Der Nachweis von PAK-Konjugaten (s.o.) belegte einen Phase II-Metabolismus in *H. lugdunensis* H4-2-4. Neben Sulfotransferasen und Methyltransferasen werden Biotransformationen durch Glucuronyltransferasen, Glucosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen und N-Acetyltransferasen vermittelt. Für *H. lugdunensis* H4-2-4 wurden die Enzymaktivitäten für UDP-Glucuronyltransferasen und UDP-Glucosyltransferasen bestimmt. Glucuronyl- und Glucosylkonjugate sind neben sulfatierten Metaboliten die am häufigsten nachgewiesenen Phase II-Metabolite in Pilzen (WACKETT und GIBSON 1982; CERNIGLIA et al. 1985; SUTHERLAND et al. 1991; MÜNCNEROVÁ und AUGUSTIN 1994; ZHANG et al. 1996).

4.3.1 UDP-Glucuronyltransferase (EC 2.4.1.17)

Für *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte eine mikrosomale Aktivität der UDP-Glucuronyltransferase nachgewiesen werden.
Glucuronyltransferasen übertragen aktivierte Glucuronsäure (UDP-GA) u.a. auf Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino- und SH-Gruppen. Der Aufbau von UDP-GA erfolgt aus Glucose-1-phosphat. Die Glucuronidation repräsentiert in tierischen Systemen einen Hauptweg der Entfernung von lipophilen Xenobiotika und Endobiotika. In Säugern sind genetische Grundlagen, Unterfamilien, Lokalisation in Zelle und Gewebe, Enzymmechanismen und Substratspezifitäten der Glucuronidation gut untersucht (KING et al. 2000). Für den pilzlichen PAK-Metabolismus wurden Glucuronidkonjugate von Naphthalen, Anthracen, Benzo[a]anthracen und Benzo[a]pyren nachgewiesen (CERNIGLIA und GIBSON 1979; CERNIGLIA et al. 1982; HAMMEL et al. 1991; WACKETT und GIBSON 1982). ZHANG et al. (1996) und BEZALEL et al. (1997) veröffentlichten Publikationen zu den beteiligten Enzymen.

Die Kultivierung von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium mit 0,05 mM 1-Naphthol führte zu Erhöhung der mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität um ca. 100 % gegenüber der Anzucht in PAK-freiem Medium (spezifische Aktivität: 0,15 nmol min^{-1} mg^{-1} Protein) (Abb. 34). Eine Bildung von 1-Naphthylglucuronid in Flüssigmedium konnte nicht nachgewiesen werden. Auch nach einer direkten Inkubation der resuspendierten Mikrosomen mit 1-Naphthol konnte eine Konjugation nicht beobachtet werden.
Für *Cunninghamella elegans* konnten ZHANG et al. 1996 eine direkte Glucuronidierung von 1-Naphthol in der mikrosomalen Fraktion nachweisen. Die spezifische Aktivität der UDP-Glucuronyltransferase in einem Natriumdihydrogenphosphat-Puffer von pH 7,4 betrug 0,13 nmol min^{-1} mg^{-1} Protein (Substrat: [1-^{14}C]1-Naphthol). In Flüssigkulturen von *Cunninghamella elegans* wiesen CERNIGLIA et al. (1982) die Bildung von 1-Naphthylglucuronid nach.

Eine direkte Glucuronidierung von 1-Naphthol in der Mikrosomenpräparation aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund kann auf den Stoffwechsel und die Eigenschaften der UDP-Glucuronyltransferase aus *H. lugdunensis* H4-2-4 und/oder die analytischen Verfahren zurückgeführt werden. Untersuchungen an Säugern zeigen, dass UDP-Glucuronyltransferasen im Allgemeinen für endogene Substrate eine hohe und für Xenobiotika eine breite Substratspezifität besitzen. Im Speziellen gibt es jedoch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Formen des Enzyms. So werden in tierischen Systemen zwei Gen-Familien unterschieden, wobei

die katalytischen Fähigkeiten der Glucuronyltransferasen sowohl zwischen, als auch in den Gen-Familien differieren (KING et al. 2000). Die Xenobiotika 1-Naphthol und 4-Nitrophenol sind Substrate menschlicher UDP-Glucuronyltransferase der UGT1A1-Familie, werden aber nicht vom Enzym des UGT2B7-Gens der UGT2-Familie glucuronidiert. Weiterhin wurden Isoformen beschrieben, die entweder 1-Naphthol oder 4-Nitrophenol umsetzten. Auch für endogene Substrate, wie z. B. Bilirubin, sind Unterschiede dokumentiert (KING et al. 2000).
Sollte 1-Naphthol kein Substrat der UDP-Glucuronyltransferase aus *H. lugdunensis* H4-2-4 sein, dann könnte die erhöhte Aktivität des Enzymes - nach Wachstum des Pilzes unter Einfluss von 1-Naphthol – auf eine unspezifische Stressantwort zurückgeführt werden. 1-Naphthol könnte auch die Aktivität des Enzymes aufgrund von Strukturanalogien zu möglichen Substraten induzieren. Ein weitere Möglichkeit wäre die Bevorzugung von Sulfatierung und/oder O-Methylierung durch den Pilz (s. Kap. 4.2.2). Da sich die Substratspektren von Sulfotransferasen und UDP-Glucuronyltransferasen überschneiden, wird der Xenobiotika-Metabolismus auch durch die kinetischen Parameter dieser Enzyme beeinflusst. In der Regel weisen Sulfotransferasen eine hohe Affinität zum Substrat auf, aber ihre Umsatzkapazität ist eingeschränkt. Dementsprechend wird in tierischen Systemen eine Verbindung bei hoher Konzentration bevorzugt glucuroniert und bei niedrigen Konzentrationen sulfatiert (OESCH und ARAND 1999). Die Funktion der UDP-Glucuronyltransferase ist nicht auf den Xenobiotika-Metabolismus beschränkt. Eine nachgewiesene Aktivität für dieses Enzym könnte auf Stoffwechselprozesse zurückgeführt werden, die unabhängig vom PAK-Metabolismus sind (KING et al. 2000).

ZHANG et al. (1996) wiesen für *Cunninghamella elegans* neben mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferase auch im Cytosol eine Aktivität dieses Enzyms nach. Die spezifische Aktivität im Cytosol betrug 0,09 nmol min^{-1} mg^{-1} Protein und lag damit bei ca. 70 % der mikrosomalen Aktivität in diesem Organismus. Der ligninolytische Pilz *Pleurotus ostreatus* zeigte ebenfalls cytosolische (0,26 nmol min^{-1} mg^{-1} Protein) und mikrosomale (4,25 nmol min^{-1} mg^{-1} Protein) Aktivität des Enzyms (BEZALEL et al. 1997). In tierischen Systemen ist die Aktivität auf die mikrosomale Fraktion beschränkt, da die UDP-Glucuronyltransferasen membrangebundene Enzyme auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums sind (TEPHLY und BURCHELL 1990).
Für den untersuchten Stamm *H. lugdunensis* H4-2-4 konnte keine cytosolische Aktivität der Glucuronyltransferase nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen für tierische Systeme überein, unterscheidet sich aber von den Resultaten für den Zygomyceten *Cunninghamella elegans* und den Weissfäulepilz *Pleurotus ostreatus* (s.o.).

Die UDP-Glucuronyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 weist eine sigmoide v/S-Charakteristik auf. Dieser Verlauf ist für Enzyme mit multipler Substratbindung, den allosterischen Enzymen, typisch. Der $S_{0,5}$-Wert für das Substrat 4-Nitrophenol betrug 0,38 mM.

UDP-Glucuronyltransferasen aus tierischem Gewebe zeigen eine negative Kooperation für die beiden Substrate (WINSNES 1972; VESSEY et al. 1973; KING et al. 2000), d.h. die Bindung des ersten Substratmoleküls erschwert die Bindung des zweiten Substratmoleküls. Für UDP-Glucuronyltransferasen aus Mikromyceten wurden bisher keine detaillierten kinetischen Untersuchungen publiziert.

Eine negative Kooperation der Substratbindung kann aufgrund der sigmoiden v/S-Charakteristik für die UDP-Glucuronyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 angenommen werden. Eine andere Form der allosterischen Regulation ist jedoch nicht auszuschliessen.

4.3.2 UDP-Glucosyltransferase

Für das Untersuchungsobjekt *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte eine Aktivität der UDP-Glucosyltransferase für die cytosolische Fraktion (2,46 nmol min^{-1} mg^{-1} Protein; Substrat: 4-Nitrophenol) nachgewiesen werden. In der mikrosomalen Fraktion wurde keine Enzymaktivität detektiert.

Spezifische Aktivitäten der UDP-Glucosyltransferase wurden für die Pilze *Cunninghamella elegans* (ZHANG et al. 1996) und *Pleurotus ostreatus* (BEZALEL et al. 1997) dokumentiert. Für den Zygomyceten *Cunninghamella elegans* konnten ZHANG et al. Enzymaktivität (0,27 nmol min^{-1} mg^{-1}; Substrat: 1-Naphthol) in der cytosolische Fraktion nachweisen. Der Weissfäulepilz *Pleurotus ostreatus* zeigte Enzymaktivitäten für cytosolische (0,96 nmol min^{-1} mg^{-1}; Substrat: 1-Naphthol) und mikrosomale Fraktion (4,21 nmol min^{-1} mg^{-1}; Substrat: 1-Naphthol).

Glucosidkonjugate von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen als Produkte pilzlicher Phase II-Reaktionen wurden u.a. für Phenanthren, Fluoranthen und Pyren nachgewiesen (CASELLAS et al. 1996; POTHULURI et al. 1990; CERNIGLIA et al. 1986).

Für den Naphthalenstoffwechsel in Pilzen wurde bisher eine Bildung von Naphthylglucosid nicht beschrieben. ZHANG et al. (1996) und BEZALEL et al. (1997) wiesen zwar eine direkte Glucosidierung von 1-Naphthol in Mikrosomenpräparationen aus *Cunninghamella elegans* und *Pleurotus ostreatus* nach, aber in Kultur scheint 1-Naphthol durch pilzliche UDP-Glucosyltransferase nicht konjugiert zu werden

(CERNIGLIA et al. 1982; HOFMANN 1986; CERNIGLIA et al. 1992; MÜNCNEROVÁ und AUGUSTIN 1994).

Die verfügbaren Publikationen lassen vermuten, dass für eine Glucosidierung die Art des PAK und der Stoffwechsel des jeweiligen Mikromyceten ausschlaggebend sind. In Kultur scheinen einige PAK keine Substrate der UDP-Glucosyltransferase zu sein. So wurden bisher keine Glucosidierungen für den pilzlichen Metabolismus von Naphthalen, Anthracen, Benz[a]anthracen oder Benzo[a]pyren nachgewiesen. Für diese PAK wurden Sulfat- und Glucuronidkonjugate dokumentiert. Glucoside, jedoch weder Glucuronide noch Sulfate, wurden für den Stoffwechsel von Phenanthren und Fluoranthen beschrieben. 1-Fluoronaphthalen wird zu Glucosid-, Glucuronid- und Sulfatkonjugaten metabolisiert. Für Pyren wurden Sulfat- und Glucosidprodukte identifiziert (CERNIGLIA et al. 1992; SUTHERLAND et al. 1995; WUNDER et al. 1997).

Dieser Überblick über den Phase II-Metabolismus in Pilzen zeigt, dass - mit einigen Ausnahmen - in Kultur entweder Glucuronierungen/Sulfatierungen oder Glucosidierungen von PAK erfolgen. Naphthalen scheint ein PAK sein, der in Kultur sulfatiert/glucuroniert, aber nicht glucosidiert wird. Dies würde das Fehlen von 1-Naphthylglucosid trotz UDP-Glucosyltransferase-Aktivität in *Cunninghamella elegans* und *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 erklären. Die Nachweise von 1-Naphthylglucuronid und 1-Naphthylsulfat für *Cunninghamella elegans* (CERNIGLIA et al. 1978; CERNIGLIA et al. 1982; HOFMANN 1986) und von 1-Naphthylsulfat für *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 (s. Kap. 3.2.3) stehen ebenfalls im Einklang mit dieser Annahme.

4.4 Beurteilung des Xenobiotika-Stoffwechsels von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 aus ökologischer Sicht

Der untersuchte *Heliscus lugdunensis*-Stamm H4-2-4 wurde aus einem Gewässer mit einem überdurchschnittlichen Schwermetallgehalt isoliert. Das Sediment am ursprünglichen Standort weist grosse Mengen an Arsen, Kupfer, Blei und Zink auf. Für Wasserproben wurden der niedrigste pH-Wert, die höchste Leitfähigkeit, die höchste Sulfat-Konzentration und die höchste PAK-Konzentration aller untersuchten Standorte bestimmt (Tab. 21, Tab. 22) (KRAUSS et al. 2001). Die PAK-Konzentration im Wasser betrug 2,9 µg/L. Die geringste untersuchte Naphthalenkonzentration in *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 - Kulturen von 0,05 mM entspricht 6,4 mg/L (s. Kap. 3.2.2). Die vergleichsweise geringe PAK-Menge im Standort H4 betrug dennoch ca. das 50-fache der für die Standorte H6 (0,06 µg/L) und H8 (0,06 µg/L) gemessenen Werte (Tab. 21).

Bei einer dauerhaften PAK-Exposition kann eine Anpassung der Mikroorganismen im Habitat an die Schadstoff-Belastung erfolgen. Die Adaptation führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber den toxischen Wirkungen der PAK. Die Nutzung der organischen Schadstoffe als Substrat kann infolge des Anpassungsprozesses zunehmen (CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; ABED et al. 2002; SHI et al. 2002). In der Regel werden die schadstoffverwertenden Bakterien und Pilze selektiert und angereichert (SPAIN et al. 1980; SPAIN und VAN VELD 1983; CERNIGLIA und HEITKAMP 1989; APRIL et al. 2000; ABED et al. 2002; SHI et al. 2002). Die Anzahl kohlenwasserstoffverwertender Mikroorganismen und ihr Anteil unter den heterotrophen Organismen zeigen somit Grad und Dauer der Belastung an (COLWELL und WALKER 1977; HERBES und SCHWALL 1978; ATLAS 1981; FLOODGATE 1984; HEITKAMP et al. 1987; APRIL et al. 2000; ABED et al. 2002).
Für das Untersuchungsobjekt *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 kann demnach die Fähigkeit zum PAK-Metabolismus und die relativ hohe ligninolytische Aktivität auf die Verhältnisse am ursprünglichen Standort zurückgeführt werden. Dies wird besonders deutlich durch den Vergleich mit *Heliscus*-Stämmen von weiteren Standorten. Die isolierten Stämme stammen aus verschiedenen Gewässern und zeigten u.a. unterschiedliche ligninolytische Aktivitäten. Da alle Stämme der gleichen Art angehören, kann als Ursache für die Unterschiede die Anpassung an die ursprünglichen Habitate angesehen werden.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit erbrachte den Nachweis einer beschränkten Fähigkeit zum Organika-Stoffwechsel durch aquatische Hyphomyceten. Der Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 konnte Naphthalen, 1-Naphthol und Fluoren in Flüssigkultur metabolisieren. Die nachgewiesenen Metabolite belegen für diesen Stamm einen PAK-Stoffwechsel, der den bisherigen Erkenntnissen für Mikromyceten entspricht: im Vordergrund steht nicht der vollständige Abbau der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, sondern die Konjugation funktioneller Gruppen, die zu einer Detoxifikation (mitunter auch Aktivierung) der Ausgangsverbindungen führen. In Abb. 41 ist die Ausrichtung auf den Phase II-Metabolismus für den untersuchten Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 am Beispiel von 1-Naphthol dargestellt.

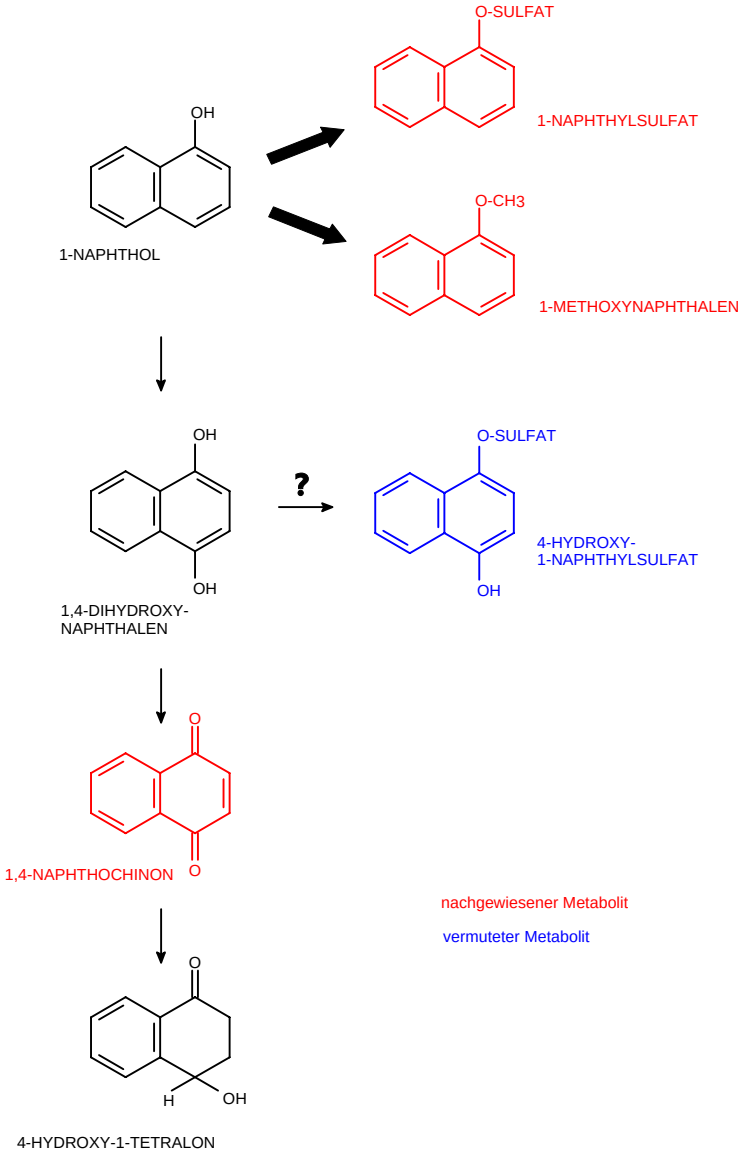


Abb. 41: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4; bevorzugte Reaktionsschritte sind über die Pfeilstärke hervorgehoben

Für die Bioremediation PAK-belasteter Gewässer ist *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nicht geeignet. Der Bildung von PAK-Konjugaten durch den Hyphomyceten ist ein vollständiger Katabolismus, wie z. B. durch Bakterien vermittelt, vorzuziehen.

Zumindest in mehrfach belasteten Gewässern könnte *Heliscus lugdunensis* H4-2-4, aufgrund seiner Schwermetall-Toleranz und der Fähigkeit zum Wachstum unter PAK-Einfluss, durch die Konditionierung pflanzlicher Biomasse native mikrobielle Populationen stimulieren. Als Methode für Untersuchungen zu dieser Thematik bieten sich Versuche mit gemischten mikrobiellen Gemeinschaften in Fermentoren an. In diesem

Zusammenhang würden respiratorische Messungen die Erkenntnisse zum Einfluss von Sauerstoff auf den Xenobiotika-Stoffwechsel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 vertiefen.
Weitere Studien zu den Enzymen des Xenobiotika-Stoffwechsels würden einen umfassenden Vergleich mit Bakterien und bisher charakterisierten Basidiomyceten und Zygomyceten ermöglichen. So würde eine Isolierung und Charakterisierung der Cytochrom P450 Monooxygenase klären, inwieweit die initialen Schritte des Xenobiotika-Stoffwechsels durch aquatische Hyphomyceten vermittelt werden können. Der Nachweis von ligninolytischer Aktivität und die Charakterisierung von Laccase in aquatischen Hyphomyceten könnte durch Studien mit ausgewählten Mediatoren und höherkondensierten PAK vertieft werden.
Die Unterschiede der untersuchten Stämme hinsichtlich ligninolytischer Aktivität und Organika-Abbaupotential lassen vermuten, dass ein gezieltes Screening auf PAK-metabolisierende Hyphomyceten in den Gewässern des Mansfelder Landes zur Isolation von Stämmen mit einem grösseren Fähigkeit zum Xenobiotika-Stoffwechsel als *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 führen kann.

5 Zusammenfassung

Von 12 untersuchten Stämmen aquatischer Hyphomyceten zeigten 9 Stämme ligninolytische Aktivität. Die höchste ligninolytische Aktivität wurde für den Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nachgewiesen.

Der Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 metabolisierte PAK in Flüssigkultur.
Die Bildung der Metabolite durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurde durch die Zusammensetzung des Mediums und das Kulturvolumen beeinflusst.
Die Zugabe von Naphthalen zu einer Kultur von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium führte zur Bildung von 1-Naphthol und 1,4-Naphthochinon.
Heliscus lugdunensis H4-2-4 metabolisierte 1-Naphthol in allen untersuchten Medien. Als Metabolite wurden 1-Naphthylsulfat, 1-Methoxynaphthalen und 1,4-Naphthochinon identifiziert. Bei einem weiteren Metaboliten handelt es sich vermutlich 4-Hydroxy-1-Naphthylsulfat. Die höchsten Metabolisierungsraten von 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4 wurden in Malz/Pepton-Medium und einem Medium aus homogenisierten Erlenblättern nachgewiesen.
Die Applikation von Fluoren zu suspendiertem Myzel von *H. lugdunensis* H4-2-4 in Wasser führte zur Bildung von 9-Fluorenol.

Für den Stamm *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 wurden enzymatische Aktivitäten der Phase II-Enzyme UDP-Glucuronyltransferase und UDP-Glucosyltransferase nachgewiesen. Die Zugabe von 1-Naphthol zu Flüssigkulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 führte zu einer erhöhten Enzymaktivität der UDP-Glucuronyltransferase.

Der Stoffwechsel von 1-Naphthol in *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 ist auf die Bildung von Konjugaten ausgerichtet.

Ein Metabolismus von Fluoren wurde für den Stamm *Anguillospora* sp. GrJo-06 in Malz/Pepton-Medium nachgewiesen. Als Metabolit entsteht 9-Fluorenol.

Die ligninolytische Aktivität und der PAK-Metabolismus von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 korrelieren mit der Schadstoffbelastung am ursprünglichen Standort.

6 Literatur

ABDEL-RAHEEM A.M. 1997
Laccase activity of lignicolous aquatic hyphomycetes isolated from the river Nile in Egypt.
Mycopathologia 139: 145-150

ABED R.M.M., SAFI N.M.D., KÖSTER J., DE BEER D., EL-NAHHAL Y., RULLKÖTTER J., GARCIA-PICHEL F. 2002
Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds.
Appl. Environ. Microbiol. 68: 1674-1683

ABEL T.H., BÄRLOCHER F. 1984
Effects of cadmium on aquatic hyphomycetes.
Appl. Environ. Microbiol. 48: 245-251

ALEXANDRE G., ZHULIN I.B. 2000
Laccases are widespread in bacteria.
Tibtech 18: 2-41

ALLAN J.D. 1995
Stream ecology.
Chapman & Hall London

ALLEMAN B.C., LOGAN B.E., GILBERTSON R.L. 1992
Toxicity of pentachlorophenol to six species of white rot fungi as a function of chemical dose.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 4048-4050

ANDERSON J.W., NEFF J.M., COX B.A., TATEM H.E., HIGHTOWER G.M. 1974
Characteristics of dispersions and watersoluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish.
Mar. Biol. 27: 75-88

ANKE H., KOLTHOUM I., ZÄHNER H., LAATSCH H. 1980
Metabolic products of microorganisms 185. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. I. Occurence, isolation, identification and antimicrobial activity.
Arch. Microbiol. 126: 223-230

ANKE T., WERLE A., BROSS M., STEGLICH W. 1990
Antibiotics from basidiomycetes. XXXIII. Oudemansin X, a new antifungal E-β-methoxycrylate from *Oudemansiella radicata* (Relhan ex Fr.).
Sing. J. Antibiot. 42: 1010-1011

ANNWEILER E., MICHAELIS W., MECKENSTOCK R.U. 2002
Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway.
Appl. Environ. Microbiol. 68: 852-858

ANNWEILER E., RICHNOW H.H., ANTRANIKIAN G., HEBENBROCK S., GARMS C., FRANKE S., FRANCKE W., MICHAELIS W. 2000
Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 518-523

APRIL T.M., FOGHT J.M., CURRAH R.S. 2000
Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada.
Can. J. Microbiol. 46: 38-49

ARJMAND M., SANDERMANN H. JR. 1985
Mineralization of chloroaniline/lignin conjugates and of free chloroanilines by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium.*
J. Agric. Food Chem. 33: 1055-1060

ATLAS R.M. 1981
Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective.
Microbial. Rev. 45: 180-209

ATLAS R.M. 1991
Microbial hydrocarbon degradation – Bioremediation of oil spills.
J. Chem. Technol. Biotechnol. 52: 149-156

ATSDR 1995
Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicology Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Update U.S. Department of Health and Human Services

BALDRIAN P., GABRIEL J. 2002
Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus.*
FEMS Microbiol. Lett. 206: 69-74

BALDRIAN P., IN DER WIESCHE C., GABRIEL J., NERUD F., ZADRAZIL F. 2000
Influence of cadmium and mercury on activity of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 2471-2478

BÄRLOCHER F. 1980
Leaf-eating invertebrates as competitors of aquatic hyphomycetes.
Oecologia 47: 303-306

BÄRLOCHER F. 1982
Conidium production from leaves and needles in four streams.
Can. J. Bot. 60: 1487-1494

BÄRLOCHER F. 1992
The Ecology of Aquatic Hyphomycetes.
Springer Berlin

BECK A.J., ALCOCK R.E., WILSON S.C., WANG M.J., WILD S.R. 1995
Long-term persistence of organic chemicals in sewage sludge-amended agricultural land: A soil quality perspective.
Adv. Agron. 55: 345-391

BENNETT J.W., WUNCH K.G., FAISON B.D. 2002
Use of fungi in biodegradation.
In: Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. (Eds) Manual of Environmental Microbiology: 960-971
ASM Press Washington, D.C.

BERMINGHAM S., FISHER P.J., MARTIN A., MARRIOTT M., LAPPIN-SCOTT H. 1998
The effect of the herbicide Mecoprop on *Heliscus lugdunensis* and its influence on the preferential feeding of *Gammarus pseudolimnaeus.*
Microb. Ecol. 35: 199-204

BERMINGHAM S., MALTBY L., COOKE R.C. 1996a
Effects of a coal mine effluent on aquatic hyphomycetes. I. Field study.
J. Appl. Ecol. 33: 1311-1321

BERMINGHAM S., MALTBY L., COOKE R.C. 1996b
Effects of a coal mine effluent on aquatic hyphomycetes. I. Laboratory toxicity experiments.
J. Appl. Ecol. 33: 1322-1328

BEZALEL L., HADAR Y., FU P.P., FREEMAN J.P., CERNIGLIA C.E. 1996
Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 2554-2559

BEZALEL L., HADAR Y., CERNIGLIA C.E. 1997
Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 2495-2501

BOGAN B.W., LAMAR R.T. 1995
One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Environ. Microbiol. 61: 2631-2635

BOGAN B.W., LAMAR R.T. 1996
Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 1597-1603

BOLDRIN B.A., TIEHM A., FRITZSCHE C. 1993
Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 1927-1930

BOONCHAN S., BRITZ M.L., STANLEY G.A. 2000
Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 1007-1019

BRAUN-LÜLLEMANN A., HÜTTERMANN A, MAJCHERCZYK A. 1999
Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 127-132

BRESSLER D.C., FEDORAK P.M. 2000
Bacterial metabolism of fluorene, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole.
Can. J. Microbiol. 46: 397-409

BREURE A.M., STERKENBURG A., VOLKERING F., VAN ANDEL J.G. 1992
Bioavailability as a rate-controlling step in soil decontamination processes.
In: Proceedings in Soil Decontamination using Biological Processes: 147-154
Dechema, Frankfurt (Main)

BUMPUS J.A. 1989
Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Environ. Microbiol. 55: 154-158

BUMPUS J.A., TIEN M., WRIGHT D., AUST S.D. 1985
Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus.
Science 228: 1434-1436

BURCHELL B. 1981
Identification and purification of multiple forms of UDP glucuronyltransferase.
In: Hodgson E., Bend J.R., Philpot R.M. (Eds) Reviews in Biochemical Toxicology, Bd. 3: 1-32
Elsevier, New York

BUSWELL J.A., ERIKSSON K.-E. 1994
Effect of lignin-related phenols and their methylated derivates on the growth of eight white-rot fungi.
World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 169-174

BUSWELL J.A., ODIER E. 1987
Lignin biodegradation.
CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6: 1-59

CARROLL G.C., WICKLOW S.C. 1992
The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem.
2nd ed. Marcel Decker, Inc., New York

CASELLAS R.P., CROW S.A., HEINZE T.M., DECK J., CERNIGLIA C.E. 1996
Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi.
J. Ind. Microbiol. 16: 205-215

CASELLAS M., FERNANDEZ P., BAYONA J.M., SOLANAS A.M. 1995
Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain).
Chemosphere 30: 725-740

CASELLAS M., GRIFOLL M., BAYONA J.M., SOLANAS A.M. 1997
New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. Strain F101.
Appl. Env. Microbiol. 63: 819-826

CERNIGLIA C.E. 1982
Initial reactions in the oxidation of anthracene by *Cunninghamella elegans*.
J. Gen. Microbiol. 128: 2055-2061

CERNIGLIA C.E. 1984
Microbial transformation of aromatic hydrocarbons.
In: Atlas R.M. (Ed) Petroleum microbiology: 99-128
Macmillan Publishing Co., New York

CERNIGLIA C.E. 1992
Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Biodegradation 3: 351-368

CERNIGLIA C.E. 1997
Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremedation.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19: 324-333

CERNIGLIA C.E., VAN BAALEN C., GIBSON D.T. 1980a
Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM.
J. Gen. Microbiol. 116: 485-494

CERNIGLIA C.E., GIBSON D.T., VAN BAALEN C. 1980b
Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae.
J. Gen. Microbiol. 116: 495-500

CERNIGLIA C.E., CAMPBELL W.L., FREEMAN J.P., EVANS F.E. 1989
Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*.
Appl. Env. Microbiol. 55: 2275-2279

CERNIGLIA C.E., CROW S.A. 1981
Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeast.
Arch. Microbiol. 129: 9-13

CERNIGLIA C.E., FREEMAN J.P., EVANS F.E. 1984
Evidence for an arene oxide-NIH shift pathway in the transformation of naphthalene to 1-naphthol by *Bacillus cereus.*
Arch. Microbiol. 138: 283-286

CERNIGLIA C.E., FREEMAN J.P., MITCHUM R.K. 1982
Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons.
Appl. Env. Microbiol. 43: 1070-1075

CERNIGLIA C.E., GIBSON D.T. 1977
Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans.*
Appl. Env. Microbiol. 34: 363-370

CERNIGLIA C.E., GIBSON D.T. 1978
Metabolism of naphthalene by cell extracts of *Cunninghamella elegans*.
Arch. Biochem. Biophys. 1986: 121-127

CERNIGLIA C.E., GIBSON D.T. 1979
Oxidation of benzo[a]pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*.
J. Biol. Chem. 254: 12174-12180

CERNIGLIA C.E., HEBERT R.L., SZANISZLO P.J., GIBSON D.T. 1978
Fungal transformation of naphthalene.
Arch. Microbial. 117: 135-143

CERNIGLIA C.E., HEITKAMP M.A. 1989
Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment.
In: Varanasi U. (Ed) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: 41-68.
CRC Press, Boca Raton, Florida

CERNIGLIA C.E., KELLY D.W., FREEMAN J.P., MILLER D.W. 1986
Microbial metabolism of pyrene.
Chem.-Biol. Interact. 57: 203-216

CERNIGLIA C.E., SHUTTLEWORTH K.L. 2002
Methods for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading microorganisms and procedures for determination of biodegradation intermediates and environmental monitoring of PAHs. In: Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. (Eds) Manual of Environmental Microbiology: 972-986
ASM Press Washington, D.C.

CERNIGLIA C.E., SUTHERLAND J.B., CROW S.A. 1992
Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons.
In: Winkelmann G. (Ed) Microbial Degradation of Natural Products: 193-217
VCH, Weinheim

CERNIGLIA C.E., WHITE G.L., HEFLICH R.H. 1985
Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Arch. Microbiol. 50: 649-655

CHAMIER A.-C., DIXON P.A. 1982
Pectinases in leaf degradation by aquatic hyphomycetes I: the field study. The colonization-pattern of aquatic hyphomecetes on leaf packs in a Surrey stream.
Oecologia 52: 109-115

CHANDRASHEKAR K.R., KAVERIAPPA K.M. 1988
Production of extracellular enzymes by aquatic hyphomycetes.
Folia Microbiol. 33: 55-58

CHANDRASHEKAR K.R., KAVERIAPPA K.M. 1989
Effects of pesticides on the growth of aquatic hyphomycetes.
Toxicol. Lett. 48: 311-315

COLBY J., STIRLING D.I., DALTON H. 1977
The soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): its abilities to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds.
Biochem. J. 165: 395-402

COLLINS P.J., DOBSON A.D.W. 1997
Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 3444-3450

COLWELL R.R., WALKER J.D. 1977
Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment.
Crit. Rev. Microbiol. 5: 423-445

DAGLEY S. 1971
Catabolism of aromatic compounds by microorganisms.
Adv. Microb. Physiol. 6: 1-46

DALTON H., GOLDING B.T., WATERS B.W., HIGGINS R., TAYLOR J.A. 1981
Oxidations of cyclopropane, methylcyclopropane and arenes with the mono-oxygenase system from *Methylococcus capsulatus*.
J. Chem. Soc. Chem. Commun.: 482-483

DALY J., JERINA D.M., WITKOP B. 1972
Arene oxides and the NIH shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds.
Experientia 28: 1129-1149

DANZ M., MÜLLER D., RÄTHE H. 1992
Fluorenone and 2-benzoylfluorenone: different short-term effects on drug-metabolizing liver enzymes and on cell proliferation.
Exp. Toxicol. Pathol. 44: 259-261

DARVILLE R.G., WILHM J.L. 1984
The effect of naphthalene on oxygen consumption and hemoglobin concentration in *Chironomus attenuatus* and an oxygen consumtion and life cycle of *Tanytarus dissimilis*.
Environ. Toxicol. Chem. 3: 135-141

DAVIES J.I., EVANS W.C. 1964
Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads.
Biochem. J. 91: 251-261

DEOBALD L.A., CRAWFORD D.L. 2002
Lignocellulose biodegradation.
In: Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. (Eds) Manual of Environmental Microbiology: 925-933
ASM Press Washington, D.C.

DHAWALE S.W., DHAWALE S.S., DEAN-ROSS D. 1992
Degradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 3000-3006

DIAMANTIDIS G., EFFOSSE A., POTIER P., BALLY R. 2000
Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizosphere bacterium *Azospirillum lipoferum*.
Soil Biol. Biochem. 1: 919-927

DIPPLE A., CHENG S.C., BIGGER C.A.H. 1990
Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens.
In : Pariza M.W., Aeschbacher H.U., Felton J.S., Sato S. (Eds) Mutagens and Carcinogens in the Diet: 109-127
Wiley-Liss, New York

DIX N.J., WEBSTER J. 1995
Fungal ecology.
Chapman & Hall, London

EATON D.C. 1985
Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*.
Enzyme Microb. Technol. 7: 194-196

ENSLEY B.D., GIBSON D.T., LABORDE L.A. 1982
Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygen component.
J. Bacteriol. 149: 948-954

ENTRY J.A., BACKMAN C.B. 1995
Influence of carbon and nitrogen on cellulose and lignin degradation in forest soils.
Can. J. For. Res. 25: 1231-1236

FAKOUSSA R.M., HOFRICHTER M. 1999
Biotechnology and microbiology of coal degradation.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 25-40

FENN P., KIRK T.K. 1981
Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*
Arch. Microbiol. 130: 59-65

FERRERO M., LLOBET-BROSSA E., LALUCAT J., GARCÍA-VALDÉS E., ROSSELLÓ-MORA R., BOSCH R. 2002
Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region.
Appl. Environ. Microbiol. 68: 957-962

FERNANDEZ P., GRIFOLL M., SOLANAS A.M., BAYONA J.M., ALBAIGÉS J. 1992
Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal marine sediments.
Environ. Sci. Technol. 26: 817-829

FLOODGATE G. 1984
The fate of petroleum in marine ecosystems.
In: Atlas R.M. (Ed) Petroleum Microbiology: 355-398
Macmillan Publishing Co., New York

FRIEDENBERGER M. 1996
Untersuchungen zur Bildung schwefelreicher Peptide in den Zellen des aquatischen Pilzes *Heliscus lugdunensis* (Sacc. & Therry) unter Schwermetalleinfluss.
Diplomarbeit
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie

FRITSCHE W. 2002
Mikrobiologie. 3., überarbeitete Auflage
Spekrum Akademischer Verlag Heidelberg

FRÜHAUF M. 1999
Das Mansfelder Land – Kontrastraum zwischen landschaftlichen "Highlights", Umweltbelastung und sozialen sowie wirtschaftlichen Problemen.
Hercynia N. F. 32: 161-190

GARON D., KRIVOBOK S., SEIGLE-MURANDI F. 2000
Fungal degradation of fluorene
Chemosphere 40: 91-97

GIBSON D.T., KOCH J.R., KALLIO R.E. 1968
Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene.
Biochemistry 7: 2653-2661

GIBSON D.T., SUBRAMANIAN V. 1984
Microbial degradation of aromatic hydrocarbons.
In: Gibson D.T. (Ed) Microbial Degradation of Organic Compounds: 181-252
Marcel Dekker, New York

GIGER W., BLUMER M. 1974
Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet and mass spectrometry.
Anal. Chem. 46: 1663-1671

GLENN J.K., GOLD M.H. 1985
Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Biochem. Biophys. 242: 329-341

GLENN J.K., MORGAN M.A., MAYFIELD M.B., KUWAHARA M., GOLD M.H. 1983
An extracellular H_2O_2-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.
Bioch. Biophys. Res. Commun. 114: 1077-1083

GRIFOLL M., SELIFONOV S.A., CHAPMAN P.J. 1994
Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274.
Appl. Environ. Microbiol. 60: 2438-2449

GRIFOLL M., SELIFONOV S.A., GATLIN C.V., CHAPMAN P.J. 1995
Action of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic hydrocarbons.
Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723

GRIFOLL M., SOLANAS A.M., BAYONA J.M. 1992
Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of Besos and Llobregat rivers (Barcelona, Sapin).
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 23: 19-25

GRIMMER G., POTT F. 1983
Occurence of PAH.
In: Grimmer G. (Ed) Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: 61-128
CRC Press, Boca Raton, Florida

GROSS N. 2000
Untersuchungen zu Wachstum und physiologisch-chemischer Leistung des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Therry.
Diplomarbeit
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie

GSCHWEND P.M., HITES R.A. 1981
Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the northeastern United States.
Geochim. Cosmochim. Acta 45: 2359-2367

GUERIN W.F., BOYD S.A. 1992
Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species.
Appl. Environ. Microbiol. 54: 1142-1152

GÜNTHER T., SACK U., HOFRICHTER M., LÄTZ M. 1998
Oxidation of PAH and PAH-derivates by fungal and plant oxidoreductases.
J. Basic Microbiol. 38: 113-122

GUPTA J.K., HAMP S.G., BUSWELL J.A., ERIKSSON K.-E. 1981
Metabolism of trans-ferulic acid by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*.
Arch. Microbiol. 128: 349-354

HAMMEL K.E. 1995
Organopollutant degradation by ligninolytic fungi.
In: Young L.Y., Cerniglia C.E. (Eds) Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals: 331-346.
Wiley-Liss, New York

HAMMEL K.E., GREEN B., GAI W.Z. 1991
Ring fission of anthracene by a eukaryote.
Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10605-10608

HATAKKA A. 1994
Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation.
FEMS Microbiol. Rev. 13: 125-135

HATAKKA A. 2001
Biodegradation of lignin.
In: Hofrichter M., Steinbüchel A. (Eds) Biopolymers, lignin, humic substances and coal, vol. 1.: 129-180
VCH, Weinheim

HEITKAMP M.A., FREEMAN J.P., CERNIGLIA C.E. 1987
Naphthalene biodegradation in environmental microsomes: Estimates of degradation rates and characterization of metabolites.
Appl. Environ. Microbiol. 53: 129-136

HEITKAMP M.A., FREEMAN J.P., MILLER D.W., CERNIGLIA C.E. 1988
Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp: Identification of ring oxidation and ring fission products.
Appl. Environ. Microbiol. 54: 2556-2565

HENN M.R., CHAPELA I.H. 2000
Differential C isotope discrimination by fungi during decomposition of C_3- and C_4-derived sucrose.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 4180-4186

HENN M.R., CHAPELA I.H. 2001
Ecophysiology of ^{13}C and ^{15}N isotopic fractionation in forest fungi and the roots of the saprotrophic-mycorrhizal divide.
Oecologia 118: 353-360

HENN M.R., GLEIXNER G., CHAPELA I.H. 2002
Growth-dependent stable carbon isotope fractionation by basidiomycete fungi: $\delta^{13}C$ pattern and physiological process.
Appl. Environ. Microbiol. 68: 4956-4964

HERBES S.E., SCHWALL L.R. 1978
Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments.
Appl. Environ. Microbiol. 35: 306-316

HERDER-LEXIKON DER BIOLOGIE 1994
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

HIEBER M., GESSNER M.O. 2002
Contribution of stream detrivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estates.
Ecology 83: 1026-1038

HITES R.A., LA FLAMME R.E., WINDSOR J.G. 1980
Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine/aquatic sediments: their ubiquity.
In: Petrakis L., Weiss F.T. (Eds) Petroleum in the Marine Environment: 289-311
Adv. Chem. Ser., American Chemical Society, Washington D.C.

HOBBIE E.A., WEBER N.S., TRAPPE J.M. 2001
Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence.
New Phytol. 150: 601-610

HÖFER C. 2000
Oxidation von Mn^{2+} durch Laccasen verschiedener Basidiomyceten - Bedeutung der Reaktion für die Bildung von Wasserstoffperoxid sowie die Interaktion mit Peroxidasen am Beispiel der Manganabhängigen Peroxidase.
Dissertation
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

HOFMANN K.H. 1986
Oxidation of naphthalene by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*.
J. Basic Microbiol. 26: 109-111

HOFRICHTER M. 2002
Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).
Enzyme Microb. Techn. 30: 454-466

HOFRICHTER M., SCHEIBNER K., SCHNEEGAß I., FRITSCHE W. 1998
Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*.
Appl. Env. Microbiol. 64: 399-404

HOLLAND H.L. 1994
Models for the regiochemistry and stereochemistry of microbial hydroxylation and sulfoxidation.
Catal. Today 22: 427-350

HSIEH Y., THOMSON M.B., WARD C.H. 1980
Toxicity of water-soluble extracts of No. 2 fuel oil to the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*.
Dev. Ind. Microbiol. 21: 401-409

INGOLD C.T. 1975
An illustrated guide to aquatic and waterborne hyphomycetes (Fungi imperfecti) with notes on their biology.
Freshwater Biol. Assoc. Sci. Publ. No. 30

JACOB J., KARCHER W., BELLIARDO J.J., WAGSTAFFE P.J. 1986
Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance.
Fresenius, Z. Anal. Chem. 323: 1-10

JEFFREY A.M., Yeh H.J.C., JERINA D.M., PATEL R.T., DAVEY J.F., GIBSON D.T. 1975
Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*.
Biochemistry 14: 575-584

JEFFRIES T.W., CHOI S., KIRK T.K. 1981
Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Env. Microbiol. 42: 290-296

JOHANNES C., MAJCHERCZYK A. 2000
Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 524-528

JOHNSON A.C., LARSEN D. 1985
The distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Penobscot Bay (Maine, USA) in relation to possible sources and to other sites worldwide.
Mar. Environ. Res. 15: 1-16

JONES K.C., STRATFORD A., WATERHOUSE K.S., VOGT N.B. 1989
Organic contaminants in Welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons.
Environ. Sci. Technol. 13: 540-550

KALF D.F., CROMMENTUIJN T., VAN DE PLASSCHE E.J. 1997
Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).
Ecotoxicol. Environ. Saf. 36: 89-97

KÄSTNER M. 2000
Degradation of aromatic and polyaromatic compounds.
In: Rehm H.J., Reed G. (Eds) Biotechnology. Volume 11b: Environmental Processes II: 211-239
VCH, Weinheim

KÄSTNER M., JAMMALI M.B., MAHRO B. 1994
Enumeration and characterization of the microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).
Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 267-273

KÄSTNER M., STOTTMEIER U. 2000
Organische Schadstoffe in Böden und Gewässern.
In: Fritsche W., Zerling L. (Eds) Umwelt und Mensch - Langzeitwirkungen und Schlußfolgerungen für die Zukunft. Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Band 59, Heft 5: 31- 44

KAUFMAN D.D. 1978
Degradation of pentachlorophenol in soil, and by soil microorganisms.
In: Rao K.R. (Ed) Pentachlorophenol, Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology: 27-37
Plenum-Press New York

KAUPPI B., LEE K., CARREDANO E., PARALES R.E., GIBSON D.T., EKLUND H., RAMASWAMY S. 1998
Structure of an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase.
Structure 6: 571-586

KEITH L.H., TELLIARD W.A. 1979
Priority pollutants. I. A perspective view.
Environ. Sci. Technol. 13: 416-423

KELLER N.P., DISCHINGER J.H.C., BHATNAGAR D., CLEVELAND T.E., ULLAH A.H.J. 1993
Purification of a 40-kilodalton methyltransferase active in the aflatoxin biosynthetic pathway.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 479-484

KELLEY I., FEEMAN J.P., CERNIGLIA C.E. 1990
Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp.
Biodegradation 1: 283-290

KENNEDY D.W., AUST S.D., BUMPUS J.A. 1990
Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767).
Appl. Environ. Microbiol. 56: 2347-2353

KING C.D., RIOS G.R., GREEN M.D., TEPHLY T.R. 2000
UDP-Glucuronyltransferases.
Curr. Drug Metab. 1: 143-161

KIRK T.K., CONNORS W.J., ZEIKUS J.G. 1976
Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi.
Appl. Environm. Microbiol. 32: 192-194

KIRK T.K., FARRELL R.L. 1987
Enzymatic combustion. The microbial degradation of lignin.
Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505

KIRK T.K., SCHULTZ E., CONNORS W.J., LORENZ L.F., ZEIKUS J.G. 1978
Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Microbiol. 117: 277-285

KLECKA G.M., MAIER J.M. 1988
Kinetics of microbial growth on mixtures of pentachlorophenol and chlorinated aromatic compounds.
Biotechnol. Bioeng. 31: 328-335

KOCH R., WAGNER B.O. (Eds) 1989
Umweltchemikalien.
VCH, Weinheim

KRAUSS G., BÄRLOCHER F., KRAUSS G.-J. 2002b
Effects of pollution on aquatic hyphomycetes.
Fungal Diversity, im Druck

KRAUSS G., BÄRLOCHER F., SCHRECK P., KRANICH W., MIERSCH J., DERMIETZEL J., WENNRICH R., KRAUSS G.-J. 1998
Aquatic hyphomycetes at extremely polluted sites in the Mansfelder Land area.
In: Becker P.M. (Ed) Microbiology of polluted aquatic ecosystems: 76-83
UFZ Series, UFZ Leipzig-Halle

KRAUSS G., BÄRLOCHER F., WENNRICH R., GLÄSSER W., KRAUSS G.-J. 2001
Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany.
Nova Hedwigia 72: 419-428

KRAUSS G., SRIDHAR K.R., JUNG K., WENNRICH R., EHRMAN J., BÄRLOCHER F. 2002a
Aquatic hyhomycetes in polluted groundwater habitats of Central Germany.
Microbial Ecology, im Druck

KREMER S., ANKE H., STERNER O. 1992
Metabolism of chlorinated phenols by members of the genus *Mycena* (*Basidiomycetes*).
In: International symposium: Soil Decontamination Using Biological Processes (Karlsruhe): 298-304
Dechema, Frankfurt (Main)

KUHAD R.C., SINGH A., ERIKSSON K.E.L. 1997
Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls.
In: Scheper T. (Ed) Advances in biochemical engineering Biotechnology 57: 45-126
Springer, Berlin

LAFLAMME R.E., HITES R.A. 1978
The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediment.
Geochim. Cosmochim. Acta 42: 289-303

LANG E., ELLER G., ZADRAZIL F. 1997
Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms.
Microb. Ecol. 34: 1-10

LANGE B., KREMER S., STERNER O., ANKE H. 1994
Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of trans-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK364.
Appl. Environ. Microbiol. 60: 3602-3606

LANGE B., KREMER S., STERNER O., ANKE H. 1995
Induction of secondary metabolism by environmental pollutants: metabolization of pyrene and formation of 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin by *Crinipellis stipitaria* JK 364.
Z. Naturforsch. 50c: 806-812

LEONOWICZ A., CHO N.S., LUTEREK J., WILKOLAZKA A., WOJTAS-WASILEWSKA M., MATUSZEWSKA A., HOFRICHTER M., WESENBERG D., ROGALSKI J. 2001
Fungal laccase: properties and activity on lignin.
J. Basic. Microbiol. 41: 185-227

LINDSTROM J.C., BROWN E.J. 1989
Supplemental carbon use by microorganisms degrading toxic organic compounds and the concept of specific toxicity.
Hazard. Waste Hazard. Mater. 6: 195-200

LOWRY D.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDELL R.L. 1951
Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275

LUNDELL T., SCHOEMAKER H., HATAKKA A., BRUNOW G. 1993
New mechanism of the c-α-c-β cleavage in non-phenolic arylglycerol β-aryl ether lignin substructures catalyzed by lignin peroxidase.
Holzforschung 47: 219-224

MADSON E.L., SINCLAIR J.L., GHIORSE W.C. 1991
In situ biodegradation: microbiological patterns in a contaminated aquifier.
Science 252: 830-833

MAJCHERCZYK A., JOHANNES C., HÜTTERMANN A. 1998
Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*.
Enzyme Microb. Technol. 22: 335-341

MAJCHERCZYK A., JOHANNES C. 2000
Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase.
Biochim. Biophys. Acta 1474: 157-62

MALTBY L., BOOTH R. 1991
The effect of coal–mine effluent on fungal assemblages and leaf breakdown.
Wat. Res. 25: 247-250

MANILAL V.B., ALEXANDER M. 1991
Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 401-405

MARTÍNEZ M.J., RUIZ-DUENAS F.J., GUILLÉN F., MARTÍNEZ Á.T. 1996
Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*.
Eur. J. Biochem. 237: 424-432

MARVANOVA L. 1996
Freshwater Hyphomycetes: a survey with remarks on tropical taxa.
In: Janadhanan K.K., Rajendran C., Natarajan K., Hawsworth D.L. (Eds) Tropical Mycology: 169-226
Science Publishers Inc., USA

MATHEIS G., JAHN S., MARQUARDT R., SCHRECK P. 1999
Mobilization of heavy metals in mining and smelting heaps, Kupferschiefer District, Mansfeld, Germany.
Chron. Rech. Min. 534: 3-12

MATSUI M., NAGAI F., AOYAGI S. 1979
Strain differences in rat liver UDP-glucuronosyltransferase activity towards androsterone.
Biochem. J. 179: 483-487

MAYER A.M., STAPLES R.C. 2002
Laccase: new functions for an old enzyme.
Phytochemistry 60: 551-565.

MEANS J.G., WOOD S.G., HASSETT J.J., BANWART W.L. 1980
Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils.
Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528

MENZIE C.A., POTOCKI B.B., SANTODONATO J. 1992
Exposure to carcinogenic PAHs in the environment.
Environ. Sci. Technol. 26: 1278-1284

MERIAN E. 1991
Metals and their compounds in the environment.
VCH, Weinheim

MESSERSCHMIDT A. 1997
Spatial structures of ascorbate oxidase, laccase and related proteins: implication for catalytic mechanism.
In: Messerschmidt A. (Ed) Multicopper Oxidases: 23-80
World Scientific, Singapore

MESTER T., TIEN M. 2000
Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants.
Int. Biodeterior. Biodegrad. 46: 51-59

MIERSCH J., BÄRLOCHER F., BRUNS I., KRAUSS G.J. 1997
Effects of cadmium, copper and zinc on growth and thiol content of aquatic hyphomycetes.
Hydrobiologia 346: 77-84

MIERSCH J., TSCHIMEDBALSHIR M., BÄRLOCHER F., GRAMS Y., PIERAU B., SCHIERHORN A., KRAUSS G.J. 2001
Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*.
Mycol. Res. 105: 883-889

MILLER E.C., MILLER J.A. 1981
Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules.
Cancer 47: 2327-2345

MONNA L., OMORI T., KODAMA T. 1993
Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 285-289

MÜNCNEROVÁ D., AUGSTIN J. 1994
Fungal metabolism and the detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review.
Bioresour. Technol. 48: 97-106

NARRO M.L., CERNIGLIA C.E., VAN BAALEN C., GIBSON D.T. 1992
Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 1351-1359

NIE G., READING N.S., AUST S.D. 1999
Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Biochem. Biophys. 365: 328-334

ODIER E., ARTAUD I. 1992
Degradation of Lignin.
In: Winkelmann G. (Ed) Microbial Degradation of Natural Products: 162-191.
VCH, Weinheim

ODIER E., MOZUCH M.D., KALYANARAMAN B., KIRK T.K. 1988
Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose:quinone oxidoreductase.
Biochemie 70: 847-852

OESCH F., ARAND M. 1999
Xenobiotic Metabolism.
In: Marquardt H., Schäfer S.G., McClellan R.O., Welsch F. (Eds) Toxicology: 83-107.
Academic Press, Orlando, Florida

PALMIERI G., GIARDINA P., BIANCO C., FONTANELLA B., SANNIA G. 2000
Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 920-924

PIERAU B. 1999
Charakterisierung von zwei Stämmen des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Sacc. & Therry) unter Schwermetallstress.
Diplomarbeit
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie

POTHULURI J.V., FREEMAN J.P., EVANS F.E., CERNIGLIA C.E. 1990
Fungal transformation of fluoranthene.
Appl. Environ. Microbiol. 56: 2974-2983

POTHULURI J.V., FREEMAN J.P., EVANS F.E., CERNIGLIA C.E. 1992a
Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 3654-3659

POTHULURI J.V., HEFLICH R.H., FU P.P., CERNIGLIA C.E. 1992b
Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 937-941

POTHULURI J.V., FREEMAN J.P., EVANS F.E., CERNIGLIA C.E. 1993
Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 1977-1980

RAMDAHL T. 1985
PAH emissions from combustion of biomass.
In: Bjorseth A., Ramdahl T. (Eds) Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: 61-85
Marcel Dekker, New York

RAVIRAJA N.S., SRIDHAR K.R., BÄRLOCHER F. 1998
Breakdown of *Ficus* and *Eucalyptus* leaves in an organically polluted river in India: fungal diversity and ecological functions.
Freshw. Biol. 39: 537-545

RAYNER A.D.M., BODDY L. 1988
Fungal Decompostion of Wood: Its Biology and Ecology.
John Wiley & Sons, Chichester

READ S.J., MOSS S.T., JONES E.B.G. 1992a
Germination and development of attachment structures by conidia of aquatic hyphomycetes: light microscope studies.
Can. J. Bot. 70: 831-837

READ S.J., MOSS S.T., JONES E.B.G. 1992b
Germination and development of attachment structures by conidia of aquatic hyphomycetes: a scanning electron microscope study.
Can. J. Bot. 70: 838-845

REGALADO V., RODRÍGUEZ A., PERESTELO F., CARNICERO A., DE LA FUENTE G., FALCÓN M.A. 1997
Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 3716-3718

REINHAMMAR B., MALMSTRÖM B.G. 1981
"Blue" copper-containing oxidases.
In: Spiro T.G. (Ed) Copper proteins (Metal ions in biology 3): 109-149
Wiley-Liss, New York

RICHARDSON M.I., GANGOLLI G. 1993
The dictionary of substances and their effects.
3rd Edn. London: Royal Society of Chemistry.

RIPPEN G. (Ed) 1994
Handbuch Umweltchemikalien.
Ecomed-Verlag, Landsberg

ROCKNE K.J., CHEE-SANFORD J.C., SANFORD R.A., HEDLUND B.P., STALEY J.T., STRAND S.E. 2000
Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 1595-1601

RODRIGUEZ A., PERESTELO F., CARNICERO A., REGALADO V., PEREZ R., DE LA FUENTE G., FALCON M.A. 1996
Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti.
FEMS Microbiol. Ecol. 21: 213-219

RÜTTIMANN-JOHNSON C., SALAS L., VICUNA R., KIRK T.K. 1993
Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 1792-1797

SACK U., HEINZE T.M., DECK J., CERNIGLIA C.E., CAZAU M.C., FRITSCHE W. 1997a
Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 2906-2909

SACK U., HOFRICHTER M., FRITSCHE W. 1997b
Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*.
FEMS Microbiol. Lett. 152: 227-234

SACK U., HEINZE T.M., DECK J., CERNIGLIA C.E., MARTENS R., ZADRAZIL F., FRITSCHE W. 1997c
Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 3919-3925

SACK U., MARTENS R., FRITSCHE W. 1995
Abbau von Phenanthren durch Pilze.
In: Dechema Jahrestagungen 1995, Wiesbaden, Band II (Umwelttechnik): 85-86
Dechema, Frankfurt (Main)

SAPARRAT M.C.N., GUILLEN F., ARAMBARRI A. M., MARTINEZ A. T., MARTINEZ M. J. 2002
Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida.*
Appl. Environ. Microbiol. 68: 1534-1540

SCHÄFER-RIDDER M., BROCKER U., VOGEL E. 1976
Naphthalene 1,4-endoperoxide.
Angew. Chem. 15: 228-229

SCHEUNERT I. 1994
Mikrobieller Abbau organischer Schadstoffe im Boden.
Chemie in unserer Zeit 2: 68-78

SCHMIDT S.K., ALEXANDER M. 1985
Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations.
Appl. Environ. Microbiol. 49: 822-827

SCHOCKEN M.J., GIBSON D.T. 1984
Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acetylnaphthene.
Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-16

SCHOEMAKER H.E., HARVEY P.J., BOWEN R.M., PALMER J.M. 1985
On the mechanism of enzymatic lignin breakdown.
FEBS Lett. 183: 7-12

SCHOENY R., CODY T., WARSHAWSKY D., RADIKE M. 1988
Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species.
Mutat. Res. 197: 289-302

SCHRECK P. 1997
Environmentally sustainable disposal of radioactive sludge rich in heavy metals from copper shale smelting in Central Germany.
In: Engineering geology and the environment 2: 2145-2149
Balkema, Rotterdam, Brookfield

SCHRECK P. 1998
Environmental impact of uncontrolled waste disposal in mining and industrial areas in central Germany.
Environ. Geol. 35: 66-72

SCHULTHEIS A.S., HENDRICKS A.C. 1999
The role of copper accumulations on leaves in the inhibition of leaf decomposition in a mountain stream.
J. Freshw. Ecol. 14: 31-40

SCHÜTZENDÜBEL A., MAJCHERCZYK A., JOHANNES CH., HÜTTERMANN A. 1999
Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*.
Int. Biodeterior. Biodegrad. 43: 93-100

SCHWANTES H.O. 1996
Biologie der Pilze.
Eugen Ulmer, Stuttgart

SCHWARZ M., MARR J., KREMER S., STERNER O., ANKE H. 1992
Biodegradation of xenobiotic compounds by fungi: metabolism of 3,4-dichloraniline by *Schizophyllum* species and *Auriculariopsis ampla* and induction of indigo production.
In: International symposium: Soil Decontamination Using Biological Processes (Karlsruhe): 459-464
Dechema, Frankfurt (Main)

SEIGLE-MURANDI F., TOÈ A., BENOIT-GUYOD J.-L., STEIMAN R., KADRI M. 1995
Depletion of pentachlorophenol by deuteromycetes isolated from soil.
Chemosphere 31: 2677-2686

SELIFONOV S.A., GRIFOLL M., GURST J.E., CHAPMAN P.J. 1993
Isolation and characterization of (+)-1,1α-dihydroxy-1-hydrofluoren-9-one formed by angular dioxygenation in the bacterial catabolism of fluorene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 67-76

SEMPLE K.T., CAIN R.B., SCHMIDT S. 1999
Biodegradation of aromatic compounds by microalgae.
FEMS Microbiol. Lett. 170: 291-300

SHI W., BECKER J., BISCHOFF M., TURCO R.F., KONOPKA A.E. 2002
Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination.
Appl. Environ. Microbiol. 68: 3859-3866

SIMS R.C., OVERCASH M.R. 1983
Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil plants systems.
Residue Rev. 88: 1-68

SIMS J.L., SIMS R.C., MATTHEWS J.E. 1990
Approach to bioremediation of contaminated soil.
Haz. Waste Haz. Mater. 7: 117-149

SITTING M. 1985
Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens: 630-632
Noyes Publications, New Jersey

SLIGAR S.G. 1999
Nature's universal oxygenases: the cytochromes P450.
In: Ballou D.P. (Ed) Essays in Biochemistry. Metalloproteins. Vol. 34: 71-83

SPAIN J.C., PRITCHARD P.H., BOURQUIN A.W. 1980
Effects of adaption on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments.
Appl. Environ. Microbiol. 40: 726-734

SPAIN J.C., VAN VELD P.A. 1983
Adaption on natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure.
Appl. Environ. Microbiol. 45: 428-435

SRIDHAR K.R., KRAUSS G., BÄRLOCHER F., WENNRICH R., KRAUSS G.-J. 2000
Fungal diversity in heavy metal polluted waters in central Germany.
Fungal Diversity 5: 119-129

SRIDHAR K.R., KRAUSS G., BÄRLOCHER F., RAVIRAJA N.S., WENNRICH R., BAUMBACH R., KRAUSS G.-J. 2001
Decomposition of alder leaves in two heavy metal-polluted streams in central Germany.
Aquat. Microb. Ecol. 26: 73-80

STINSON E.E., MOREAU R.A. 1986
Partial purification and some properties of an alternariol-O-methyltransferase from *Alternaria tenuis*.
Phytochemistry 25: 2721-2724

STRUBLE V.G., HARMON H.J. 1983
Molecular basis for inhibition of mitochondrial respiration by naphthalene.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31: 644-648

SUBERKROPP K. 1992
Interactions with invertebrates.
In: Bärlocher F. (Ed) The Ecology of aquatic hyphomycetes: 118-134
Springer, Berlin

SUBERKROPP K. 1998
Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter.
Mycol. Res. 102: 998-1002

SUBERKROPP K., CHAUVET E. 1995
Regulation of leaf breakdown by fungi in streams: Influences of water chemistry.
Ecology 76: 1433-1445

SUBERKROPP K., KLUG M.J. 1976
Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream.
Ecology 57: 707-719

SUBERKROPP K., KLUG M.J. 1981
Degradation of leaf litter by aquatic hyphomycetes.
In: Wicklow D.T., Carroll G.C. (Eds) The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem: 761-776
Marcel Dekker, New York

SULLIVAN E.R., ZHANG X., PHELPS C., YOUNG L.Y. 2001
Anaerobic mineralization of stable-isotope-labeled 2-methylnaphthalene.
Appl. Environ. Microbiol. 67: 4353-4357

SUTHERLAND J.B. 1992
Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi.
J. Ind. Microbiol. 9: 53-62

SUTHERLAND J.B., FREEMAN J.P., SELBY A.L., FU P.P., MILLER D.W., CERNIGLIA C.E. 1990
Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*.
Arch. Microbiol. 154: 260-266

SUTHERLAND J.B., FREEMAN J.P., EVANS F.E., CERNIGLIA C.E. 1991
Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Environ. Microbiol. 57: 3310-3316

SUTHERLAND J.B., RAFII F., KHAN A.A., CERNIGLIA C.E. 1995
Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation.
In: Young L.Y., Cerniglia C.E. (Eds) Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals: 269-306
Wiley-Liss, New York

SUTHERLAND J.B., SELBY A.L., FREEMAN J.P., EVANS F.E., CERNIGLIA C.E. 1991
Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Environ. Microbiol. 57: 3310-3316

TEPHLY T.R., BURCHELL B. 1990
UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes.
Trends Pharmac. Sci. 11: 276-279

THAKKER D.R., YAGI H., LEVIN W., WOOD A.W., COONEY A.H., JERINA D.M. 1985
Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolite activation to ultimate carcinogens.
In: Anders M.W. (Ed) Bioactivation of Foreign Compounds: 177-242
Academic Press, Orlando, Florida

THOMAS P., WOFFORD H.W., NEFF J.M. 1981
Biochemical stress responses of striped mullet (*Mugil cephalus*) to fluorene analogs.
Aquat. Toxicol. 1: 329-342

THOMPSON M.J., BALLINGER L.N., CROSS S.E., ROBERTS M.S. 1996
High-performance liquid chromatographic determination of phenol, 4-nitrophenol, β-naphthol and a number of their glucuronide and sulphate conjugates in organ perfusate.
J. Chromatogr. 677: 117-122

THURSTON C.F. 1994
The structure and function of fungal laccases.
Microbiology 140: 19-26

TIEN M., KIRK T.K. 1984
Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2-requiring oxygenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2280-2284

TIEN M., KIRK T.K. 1988
Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*.
Methods in Enzymol. 161: 238-249

TIEN M., KIRK T.K., BULL C., FEE J.A. 1986
Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxy-benzyl alcohol catalyzed by ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds.
J. Biol. Chem. 261: 1687-1693

TRENZ S.P., ENGESSER K.H., FISCHER P., KNACKMUSS H.-J. 1994
Degradation of fluorene by *Brevibacterium* sp. strain DPQ 1361: a novel C-C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one.
J. Bacteriol. 176: 789-795

TRINKWASSERVERORDNUNG TrinkwV 2001
BGBl. I Nr. 24 vom 21.05.2001 S. 959ff.

UMWELTSANIERUNG (in der Region Mansfeld/Sangerhausen) 1996
Herausgeber: Ministerium für Raumordnung, Landwirtschaft und Umwelt Sachsen-Anhalts, Magdeburg.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 1980a
Naphthalene: ambient water quality criteria.
Washington, D.C.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 1980b
Naphthalene, health and environmental effects profile No. 131.
Office of Solid Waste, Washington, D.C.

UZ I., DUAN Y.P., OGRAM A. 2000
Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213.
FEMS Microbiol. Lett. 185: 231-238

VESSEY D.A., GOLDENBERG J., ZAKIM D. 1973
Kinetic properties of microsomal UDP-glucuronyltransferase. Evidence for cooperative kinetics and activation by UDP-N-acetylglucosamine.
Biochim. Biophys. Acta 309: 58-63

VROUMSIA T., STEIMAN R., SEIGLE-MURANDI F., BENOIT-GUYOD J.-L. 1999
Effects of culture parameters on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) by selected fungi.
Chemosphere 39: 1397-1405

WACKETT L.P., GIBSON D.T. 1982
Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*.
Biochem. J. 205: 117-122

WALTERS K.J., GASSNER G.T., LIPPARD S.J., WAGNER G. 1999
Structure of the soluble methane monooxygenase regulatory protein B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7877-7882

WANG X., YU X., BARTHA R. 1990
Effect of bioremediation on polycyclic hydrocarbon residues in soil.
Environ. Sci. Technol. 24: 1086-1089

WARIISHI H., AKILESWARAN L., GOLD M.H. 1988
Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of oxidized states and the catalytic cycle.
Biochemistry 27: 5365-5370

WARIISHI H., HUANG J., DUNFORD H.B., GOLD M.H. 1991
Reactions of lignin peroxidase compounds I and II with veratryl alcohol.
J. Biol. Chem. 266: 20694-20699

WARIISHI H., VALLI K., GOLD M.H. 1992
Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.
J. Biol. Chem. 267: 23688-23695

WARSHAWSKY D., CODY T., RADIKE M., REILMAN R., SCHUMANN B., LADOW K., SCHNEIDER J. 1995
Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light.
Chem.-Biol. Interact. 97: 131-148

WARSHAWSKY D., RADIKE M., JAYASIMHULU K., CODY T. 1988
Metabolism of benzo[a]pyrene by a dioxygenase system of the fresh green alga *Selenastrum capricornutum*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 152: 540-544

WATANABE H.K., HOSKINS B., HO I.K. 1986
Selective inhibitory effect of organophosphates on UDP-glucuronyltransferase activities in rat liver microsomes.
Biochem. Pharmac. 35: 455-460

WEBSTER J. 1987
Convergent evolution and the functional significance of spore shape in aquatic and semi-aquatic fungi. In: Rayner A.D.M., Brasier C.M., Moore D. (Eds) Evolutionary Biology of the Fungi. British Mycological Society Symposium 12: 191-201
University Press, Cambridge

WEBSTER J. 1992
Anamorph-teleomorph relationships.
In: Bärlocher F. (Ed) The Ecology of Aquatic hyphomycetes: 99-117
Springer, Berlin

WEISSENFELS W.D. 1990
Mikrobieller Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in definierten Submerskulturen und kontaminierten Böden.
Dissertation
Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms Universität Münster

WEISSENFELS W.D. 1998
Bewertung von Gefährdungspotential und mikrobiologischer Sanierbarkeit PAK-kontaminierter Böden. In: Handbuch der Altlastensanierung, 12. Erg.Lfg. 2. Auflage.
Erich Schmidt-Verlag

WHETTEN R., SEDEROFF R. 1995
Lignin biosynthesis.
The Plant Cell 7: 1001-1013

WILD S.R., BERROW M.L., JONES K.C. 1991
The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge amended agricultural soils.
Environ. Pollut. 72: 141-157

WILL O.H., III., TIESZEN L.L., KELLEN M., GERLACH T. 1986
Stable carbon isotope discrimination in the smut fungus *Ustilago violeca*.
Exp. Mycol. 10: 83-88

WINSNES A. 1972
Properties of different forms of hepatic UDP glucuronyltransferse.
Biochim. Biophys. Acta 284: 394-405

WISE S.A., BENNER B.A., BURD G.D., CHESTER S.N., REBBERT R.E., SCHANTZ M.M. 1988
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal standard reference material.
Anal. Chem. 60: 887-894

WUNDER T., MARR J., KREMER S., STERNER O., ANKE H. 1997
1-Methoxypyrene and 1,6-dimethoxypyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Arch. Microbiol. 167: 310-316

ZAPF S., WERLE A., ANKE T., KLOSTERMEYER D., STEFFAN B., STEGLICH W. 1995
9-Methoxystrobuline – Bindeglieder zwischen Strobilurinen und Oudemansinen.
Angew. Chem. 107: 255-257

ZHANG D., YANG Y., LEAKEY J.E.A., CERNIGLIA C.E. 1996
Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics.
FEMS Microbiol. Lett. 138: 221-226

ZHANG X., SULLIVAN E.R., YOUNG L.Y. 2000
Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate-reducing consortium.
Biodegradation 11: 117-124

ZHANG X., YOUNG L.Y. 1997
Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia.
Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4759-4764

7 Anhang

Tab. 21: Hydrogeologische und hydrochemische Daten von Bächen und Haldensickerwässern im „Mansfelder Land“ (aus KRAUSS et al. 2001)

Standort	H 3	H 4	H 6	H 8	H 9
Koordinaten	x 4464926 y 5711742	x 4463985 y 5712061	x 4474021 y 5708094	x 4467731 y 5711315	x 4479421 y 5705882
Wassertemperatur [°C]	20,1	6,5	13,0	11,2	13,6
pH	7,6	6,2	8,1	8,0	8,7
Leitfähigkeit [mS/cm]	3,45	8,55	2,41	3,19	1,29
EH [mV] Redoxpotential	200	257	152	177	167
O_2 Konzentration [mg/L]	8,6	9,2	9,8	9,7	9,7
DOC* [mg/L] ± 3,5 %	11,10	14,50	9,10	7,90	9,10
PAK* [µg/L] ± 3 %	1,20	2,90	0,06	0,06	0,11
Sulfat* [mg/L] ± 1,5 %	1360	6750	570	850	460
Ammonium* [mg/L] ± 1,5 %	1,40	0,04	0,56	0,04	0,10
Nitrat* [mg/L] ± 2 %	63	76,4	59	81	0,9
Phosphat* [mg/L] ± 2 %	0,27	0,16	0,45	1,60	0,92

* Durchschnittswerte von drei Paralellen (Probentiefe: 15 - 25 cm)

Koordinaten entsprechen dem kartographischen Transvers Mercator (Bessel) System

Tab. 22: Schwermetallgehalte (Durchschnittswerte; n=3) von Bächen und Haldensickerwässern im „Mansfelder Land“: Konzentrationen im Wasser in mg/L und im Sediment in mg/kg (in Klammern); aus KRAUSS et al. 2001

	H 3	H 4	H 6	H 8	H 9
As	0,007 (5000)	0,003 (6800)	0,001 (64)	0,006 (290)	n.m. (16)
Cd	0,13 (63)	2,80 (29)	n.m. (6)	n.m. (9)	n.m. (n.m.)
Cr	n.m. (150)	n.m. (75)	n.m. (59)	n.m. (n.b.)	n.m. (n.b.)
Cu	0,27 (10900)	13,25 (50200)	n.m. (740)	n.m. (460)	n.m. (53)
Fe	0,25 (7,80)	0,05 (2,10)	0,17 (2,60)	0,80 (3,60)	0,07 (0,70)
Hg	n.m. (75)	n.m. (2)	n.m. (2)	n.m. (2)	n.m. (n.b.)
Mn	2,30 (540)	19,10 (180)	0,10 (771)	0,40 (420)	0,20 (1050)
Ni	0,09 (76)	2,20 (400)	n.m. (26)	n.m. (720)	n.m. (4)
Pb	0,80 (49000)	1,90 (24500)	n.m. (372)	n.m. (720)	n.m. (56)
Zn	56 (25960)	2600 (16660)	0,40 (2060)	1,00 (3100)	0,10 (590)

n.m.: nicht messbar, n.b.: nicht bestimmt

Tab. 23: gemessener CO_2-Gehalt der Gasphase über Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Abhängigkeit von der Zeit

t	Pilzkultur + Naphthalen (A)		Kontrolle (B)	
[h]	CO_2 [ppm/100 mL]	RSD [%]	CO_2 [ppm/100 mL]	RSD [%]
0	4398442	2,65	4004416	1,54
24	9824416	2,34	8237143	0,33
48	14779221	2,76	11347792	1,85
72	18972987	2,76	13442338	0,61
96	22937662	3,17	16009870	1,09
240	32921558	3,50	21235325	0,51

A *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium mit 0,2 mM Naphthalen

B Kontrolle: *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium

Tab. 24: gemessenes Isotopenverhältnis $^{13}C/^{12}C$ im CO_2 der Gasphase über Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Abhängigkeit von der Zeit

t	Pilzkultur + Naphthalen (A)		Kontrolle (B)	
[h]	delta 17 corr $^{13}C/^{12}C$	RSD [%]	delta 17 corr $^{13}C/^{12}C$	RSD [%]
0	-17,25	1,57	-17,37	2,88
24	-22,46	0,22	-19,33	3,41
48	-24,66	0,12	-19,95	5,06
72	-25,65	1,44	-20,07	3,69
96	-26,26	1,03	-19,97	4,71
240	-28,43	1,09	-20,30	4,04

A *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium mit 0,2 mM ^{13}C-1-Naphthalen

B Kontrolle: *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium

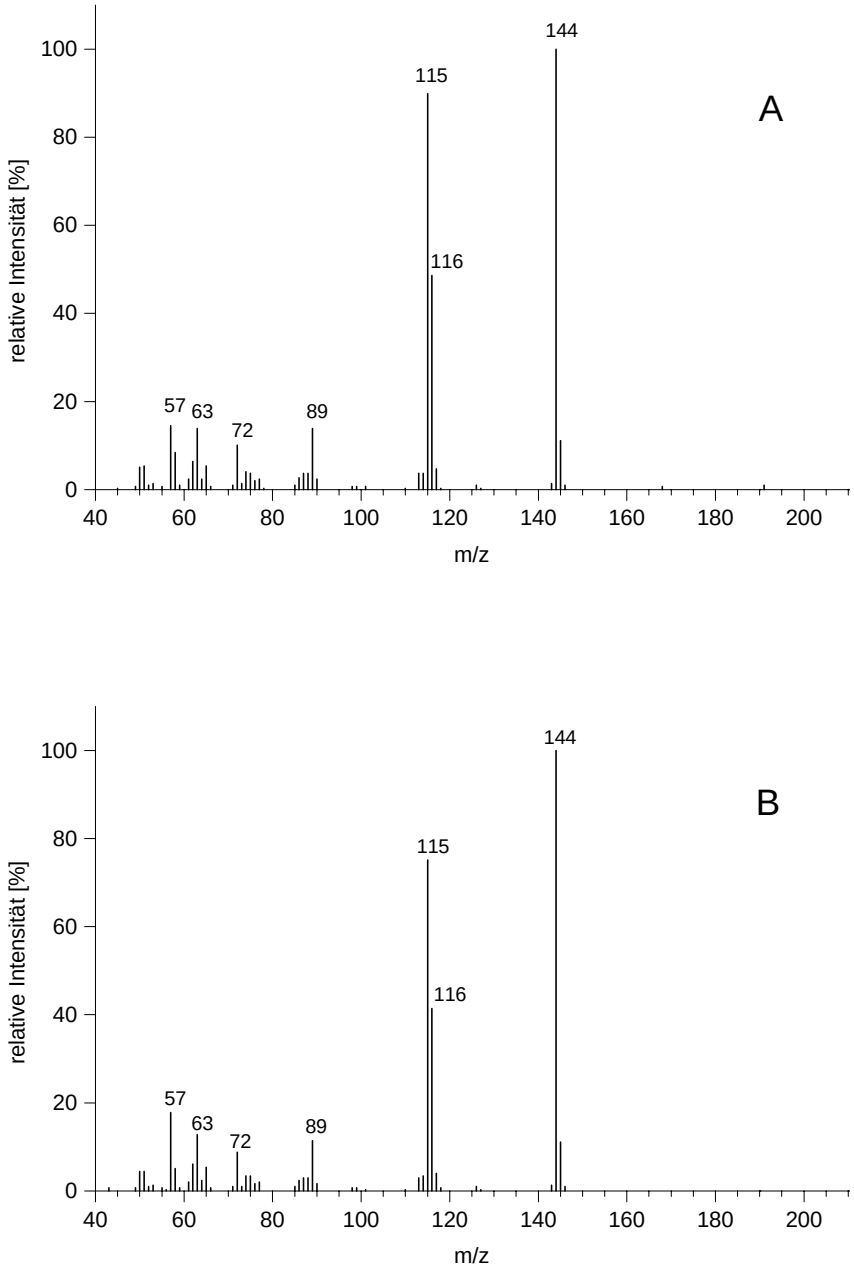


Abb. 42: Identifizierung von 1-Naphthol als Metabolit des Naphthalenstoffwechsels von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mittels Massenspektrometrie;
A 70 eV EIMS von 1-Naphthol aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4
B 70 eV EIMS der reinen Standardverbindung

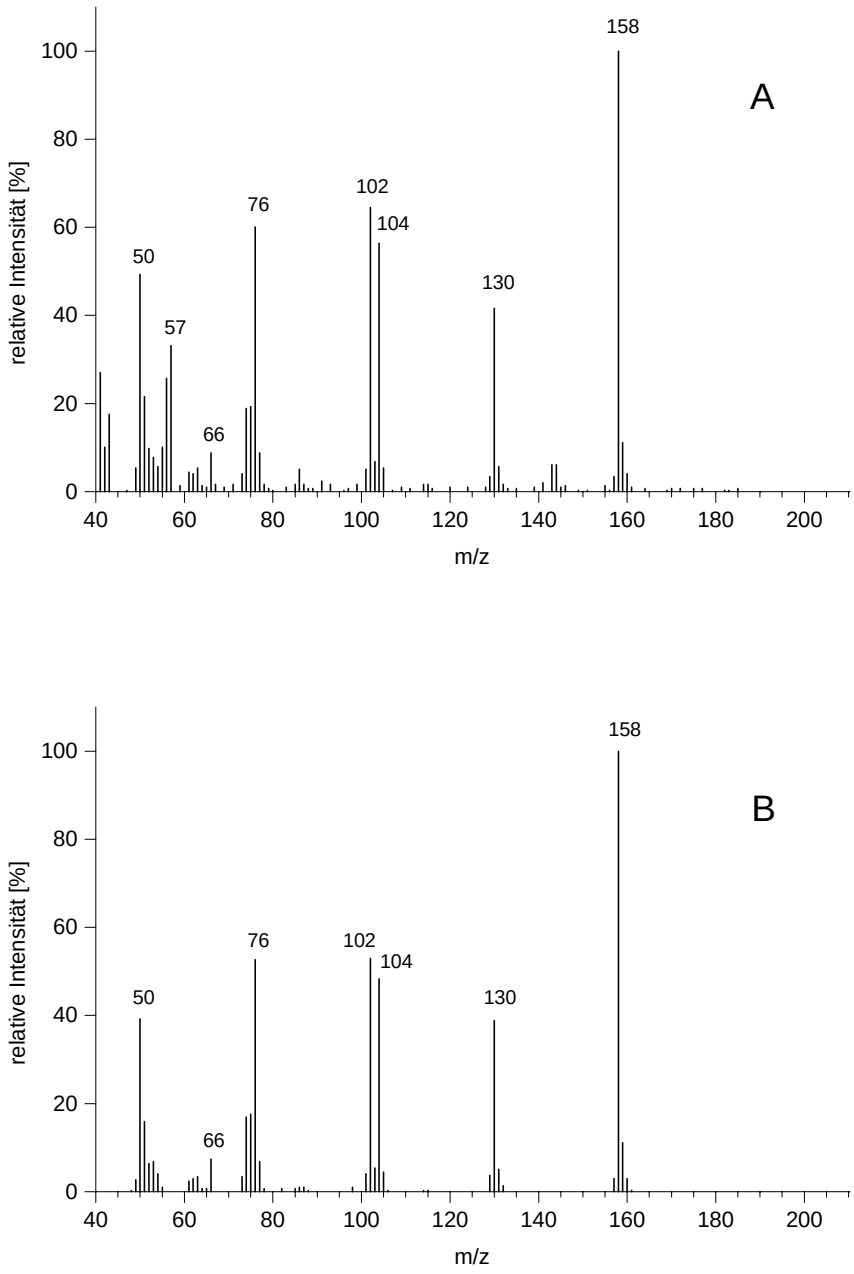


Abb. 43: Identifizierung von 1,4-Naphthochinon als Metabolit des Naphthalenstoffwechsels von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 mittels Massenspektrometrie;

A 70 eV EIMS von 1,4-Naphthochinon aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

B 70 eV EIMS der reinen Standardverbindung

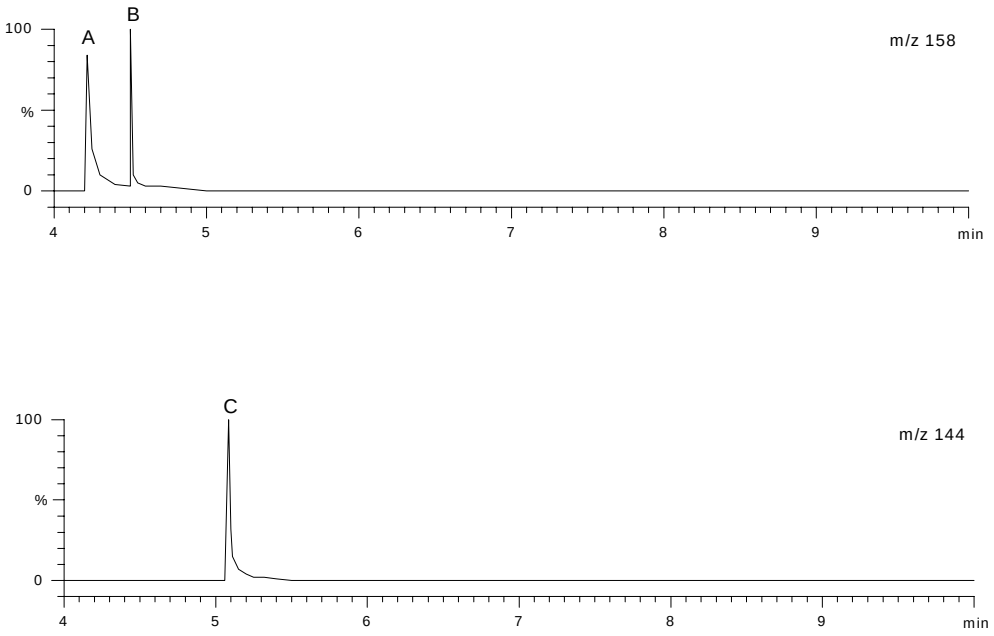


Abb. 44: GC-Chromatogramme (Massenspuren) zur GC-EIMS von Metaboliten des 1-Naphthols in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;

A	1,4-Naphthochinon	(4,21 min)
B	1-Methoxynaphthalen	(4,50 min)
C	1-Naphthol (Ausgangssubstanz)	(5,08 min)

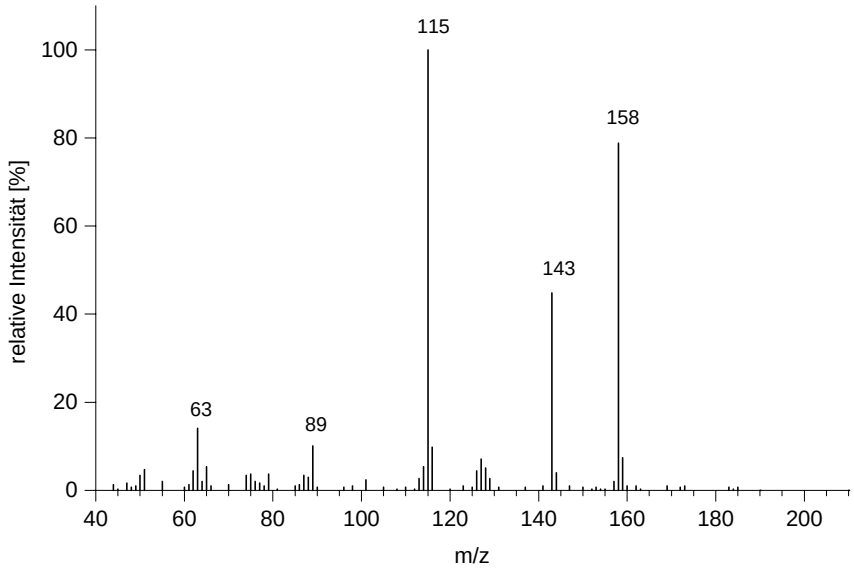


Abb. 45: 70 eV EIMS von 1-Methoxynaphthalen aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 5-tägigem Wachstum in 1-Naphthol-haltigem Malz/Pepton-Medium

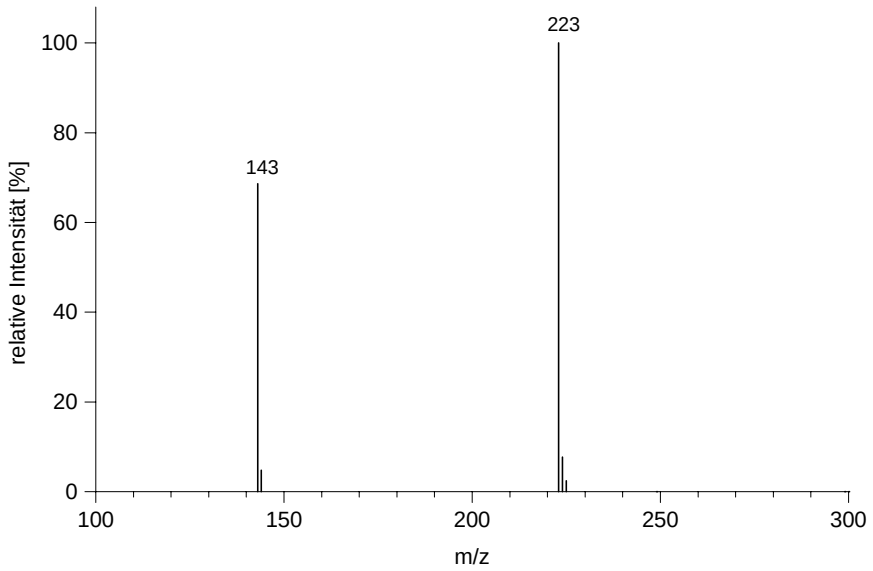


Abb. 46: ESI-MS negativer Ionen von 1-Naphthylsulfat aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 5-tägigem Wachstum in 1-Naphthol-haltigem Malz/Pepton-Medium

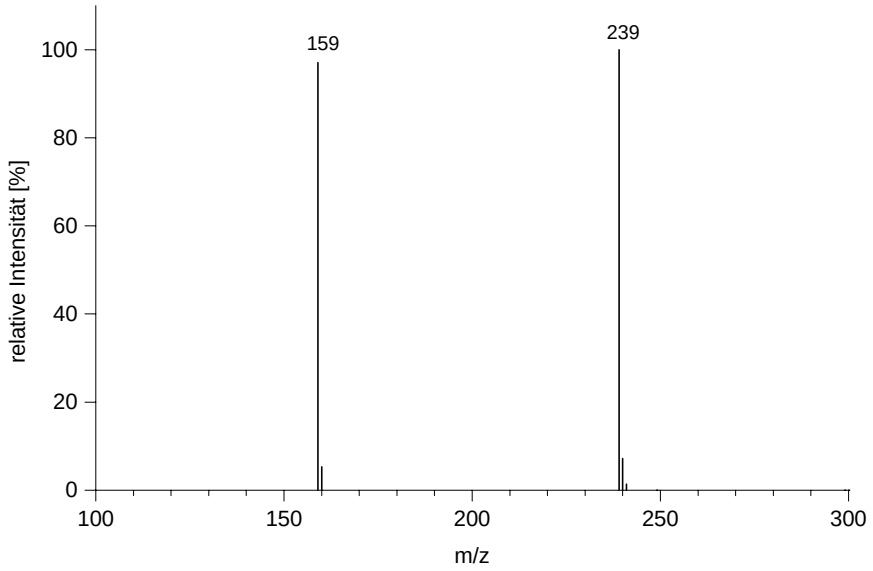


Abb. 47: ESI-MS negativer Ionen eines unidentifizierten Metaboliten aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 5-tägigem Wachstum in 50 mL 1-Naphthol-haltigem Malz/Pepton-Medium

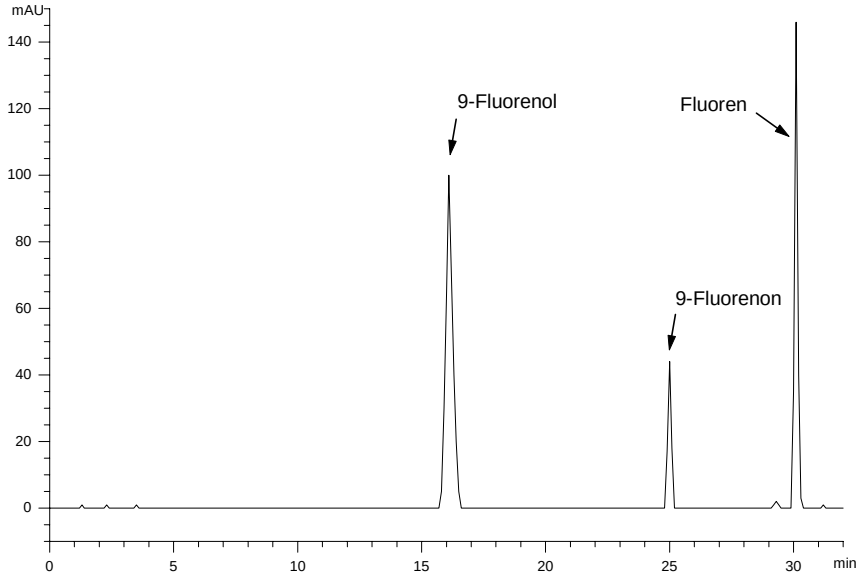


Abb. 48: HPLC-Chromatogramm von Standardsubstanzen des Fluorenstoffwechsels;

Controller:	MERCK-HITACHI L5000 LC
Pumpe:	MERCK-HITACHI 655A-11
Detektor:	DAD HP 1050
	Fluoreszenz HP 1046 A
Säule:	MERCK LiChrospher RP18 (250 × 4; 5)
Vorsäule:	RP18
Fluss:	0,8 mL/min
Detektion:	280 nm

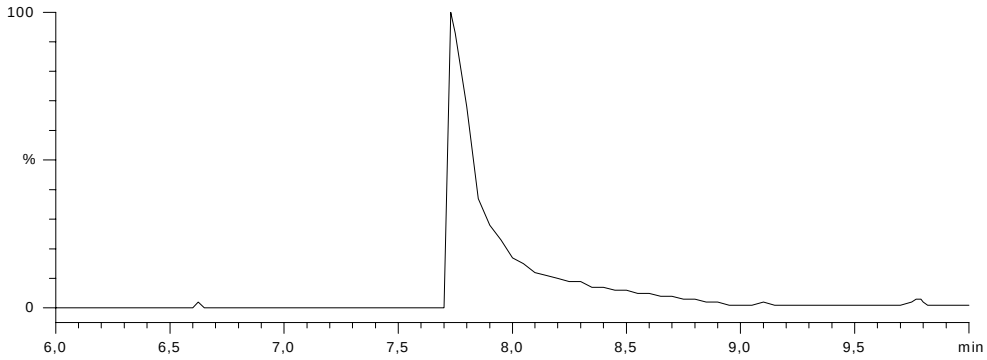


Abb. 49: GC-Chromatogramm zur GC-EIMS von Fluorenmetaboliten in Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4;
Nachweis von 9-Fluorenol (7,73 min)

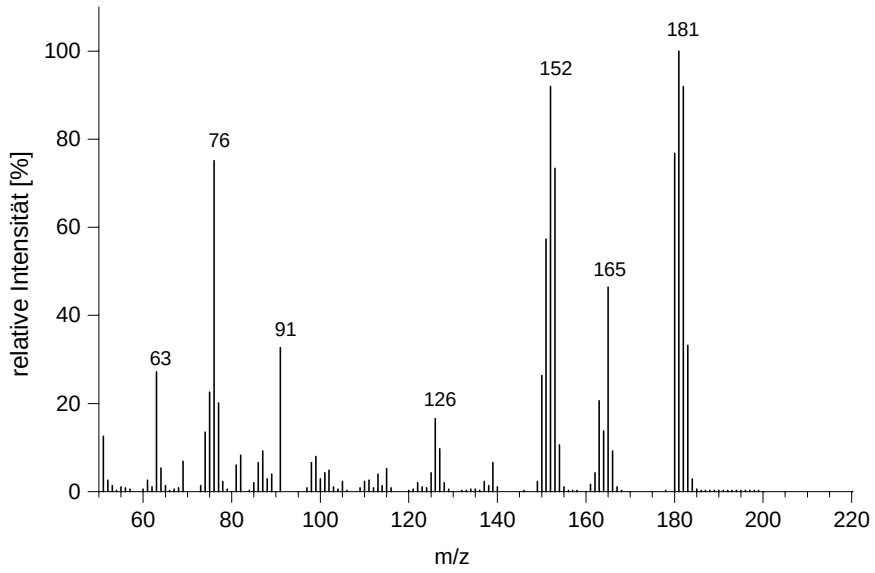


Abb. 50: 70 eV EIMS von 9-Fluorenol aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4

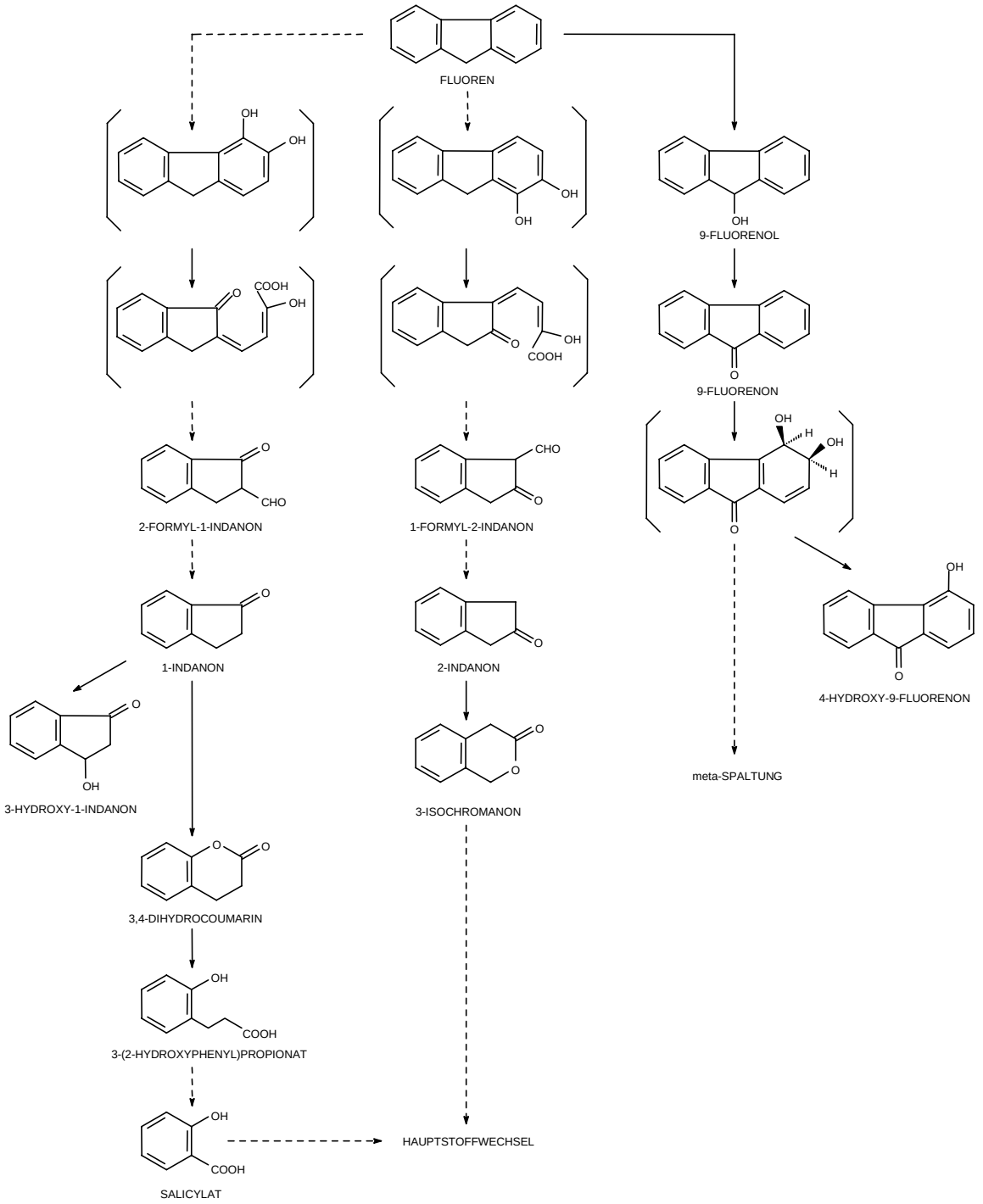


Abb. 51: Abbau von Fluoren durch *Arthrobacter* sp. Stamm F101 (nach CASELLAS et al. 1997); Gestrichelte Linien repräsentieren mehrere aufeinander folgende Reaktionen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformeln der PAK der EPA-Liste 4
Abb. 2: Übersicht über den mikrobiellen Katabolismus von PAK... 8
Abb. 3: Wachsende Hyphen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 29
Abb. 4: Naphthalenkristalle auf einer Agarplatte (links) und im Agar (rechts)... 30
Abb. 5: Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 auf Agarkultur mit Naphthalenkristallen... 31
Abb. 6: Randzone eines Impfstückes (*H. lugdunensis* H4-2-4) auf naphthalenhaltigem Agar... 31
Abb. 7: Wachstum von *H. lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium (150 mL)... 32
Abb. 8: Suspendiertes Myzel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 24-stündigem Wachstum in... 33
Abb. 9: Suspendiertes Myzel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 48-stündigem Wachstum in... 33
Abb. 10: Mit Toluidinblau gefärbte Hyphe von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 48-stündigem... 34
Abb. 11: Mit Toluidinblau gefärbtes Myzel von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 nach 48-stündigem.. 34
Abb. 12: Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Malz/Pepton-Medium (50 mL)... 35
Abb. 13: Wachstum von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4 in Mineralmedium (50 mL)... 36
Abb. 14: Trockengewichte und absolute Trockenmassen in 7 Tage alten Kulturen von... 37
Abb. 15: HPLC-Chromatogramm einer Trennung von Standardsubstanzen... 38
Abb. 16: HPLC-Nachweis von 1,4-Naphthochinon und 1-Naphthol... 40
Abb. 17: Vergleich der UV-Spektren von Metaboliten des Naphthalens... 41
Abb. 18: zeitabhängiges Isotopenverhältnis im CO_2 der Gasphase über Kulturen... 44
Abb. 19: zeitabhängige Zunahme des CO_2-Gehaltes in der Gasphase über Kulturen... 44
Abb. 20: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 46
Abb. 21: Identifizierung von 1-Naphthylsulfat über das UV-Spektrum als Metabolit... 46
Abb. 22: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 47
Abb. 23: Identifizierung von 1-Methoxynaphthalen über das UV-Spektrum als Metabolit... 47
Abb. 24: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 49
Abb. 25: Identifizierung von 1,4-Naphthochinon über das UV-Spektrum als Metabolit... 49
Abb. 26: UV-Spektrum eines unidentifizierten Metaboliten des 1-Naphthol-Stoffwechsels... 50
Abb. 27: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 52
Abb. 28: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 52
Abb. 29: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 53
Abb. 30: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 54
Abb. 31: Metabolismus von Fluoren durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 57
Abb. 32: Identifizierung von 9-Fluorenol über das UV-Spektrum als Metabolit... 58
Abb. 33: Trockengewichte in 7 Tage alten Malz/Pepton-Kulturen (150 mL)... 60
Abb. 34: Vergleich der spezifischen Aktivitäten mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferase... 61
Abb. 35: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferase... 62
Abb. 36: v/S-Charakteristik der mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferase... 63
Abb. 37: Aktivität der cytosolischen UDP-Glucosyltransferase aus *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 64

Abb. 38: Naphthalenmetabolismus in filamentösen Pilzen (nach CERNIGLIA et al. 1992) 74
Abb. 39: konjugiertes Enolat-Anion von 4-Hydroxy-1-Naphthylsulfat 83
Abb. 40: Fluorenmetabolismus durch *Cunninghamella elegans* (POTHULURI et al. 1993) 84
Abb. 41: Metabolismus von 1-Naphthol durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 92
Abb. 42: Identifizierung von 1-Naphthol als Metabolit des Naphthalenstoffwechsels... 121
Abb. 43: Identifizierung von 1,4-Naphthochinon als Metabolit des Naphthalenstoffwechsels... 122
Abb. 44: GC-Chromatogramme (Massenspuren) zur GC-EIMS von Metaboliten des 1-Naphthols... 123
Abb. 45: 70 eV EIMS von 1-Methoxynaphthalen aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 123
Abb. 46: ESI-MS negativer Ionen von 1-Naphthylsulfat aus Kulturen... 124
Abb. 47: ESI-MS negativer Ionen eines unidentifizierten Metaboliten aus Kulturen... 124
Abb. 48: HPLC-Chromatogramm von Standardsubstanzen des Fluorenstoffwechsels... 125
Abb. 49: GC-Chromatogramm zur GC-EIMS von Fluorenmetaboliten in Kulturen... 126
Abb. 50: 70 eV EIMS von 9-Fluorenol aus Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 126
Abb. 51: Abbau von Fluoren durch *Arthrobacter* sp. Stamm F101 (nach CASELLAS et al. 1997)... 127

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Physikochemische Eigenschaften der PAK der EPA-Liste... 5
Tab. 2: Toxizität ausgewählter PAK (aus WEISSENFELS 1990) 6
Tab. 3: HPLC-Gradient zur Trennung hydrophober PAK-Metabolite 18
Tab. 4: HPLC-Gradient zur Trennung hydrophiler PAK-Metabolite 18
Tab. 5: Lösungsmittelgradient für die HPLC-IES-MS 19
Tab. 6: Temperaturgradient für die GC/C-IRMS 20
Tab. 7: Ergebnisse des Screenings auf ligninolytische Aktivität von aquatischen Hyphomyceten 27
Tab. 8: Durchmesser von Pilzkulturen aquatischer Hyphomyceten in mm... 28
Tab. 9: Analytische Streuungen der HPLC-Methoden für Standardsubstanzen... 39
Tab. 10: Identifizierung von Metaboliten des Naphthalens in Kulturen... 42
Tab. 11: Zusammenfassung der Versuche zum Naphthalenmetabolismus... 42
Tab. 12: Identifizierung von Metaboliten des 1-Naphthols in Kulturen... 48
Tab. 13: Nachweis von 1-Naphthylsulfat und einem unidentifizierten Metaboliten... 48
Tab. 14: Metabolismus von 1-Naphthol durch *H. lugdunensis* H4-2-4... 55
Tab. 15: Anhand von HPLC-DAD, GC-EIMS und HPLC-ESI-MS identifizierte Metabolite... 56
Tab. 16: Identifizierung von 9-Fluorenol mittels GC-EIMS... 57
Tab. 17: Metabolismus von Fluoren durch *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 58
Tab. 18: Metabolismus von Fluoren durch *Anguillospora* sp. GrJo 06-5... 60
Tab. 19: spezifische Aktivitäten von UDP-Glucuronyltransferase... 65
Tab. 20: Übersicht über naphthalenmetabolisierende Pilze... 75
Tab. 21: Hydrogeologische und hydrochemische Daten von Bächen und Haldensickerwässern... 118
Tab. 22: Schwermetallgehalte (Durchschnittswerte; n=3) von Bächen und Haldensickerwässern... 119
Tab. 23: gemessener CO_2-Gehalt der Gasphase über Kulturen von *Heliscus lugdunensis* H4-2-4... 120
Tab. 24: gemessenes Isotopenverhältnis $^{13}C/^{12}C$ im CO_2 der Gasphase über Kulturen... 120

8 Abkürzungen

DAD	Diodenarray-Detektor
DOC	Dissolved Organic Carbon
EIMS	Elektronenstoss-Ionisation-Massenspektrometrie
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
GC	Gaschromatographie
GC/C-IRMS	Gas Chromatography/Combustion-Isotope Ratio Monitoring Mass Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
RP	Reversed Phase
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PAPS	Phosphoadenosin-phosphosulfat
RSD	relative Standardabweichung
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SD	Standardabweichung
UDP	Uridin-5’-diphosphat
UV	Ultraviolett

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung, die sorgfältige Durchsicht der Manuskripte und die fachliche Beratung, sowie seiner hilfreichen Unterstützung der Arbeit.

Herr Prof. Dr. M. Kästner vom Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle danke ich für die Begutachtung der Arbeit sowie für die Hilfe bei Planung und Durchführung der Versuche mit stabilen Isotopen.

Bei Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen bedanke ich mich für die Durchsicht des Manuskripts und die fachlichen Hinweise zur Anfertigung der Arbeit.

Frau R. Baumbach danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den HPLC-Untersuchungen.

Den Mitarbeitern der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie, insbesondere Herr Dr. J. Miersch und Herr Dr. H. Tintemann, gilt mein besonderer Dank für die experimentelle Zusammenarbeit und Hilfe.

Frau Dr. G. Krauß vom Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Sektion Hydrogeologie danke ich für die Bereitstellung der Stämme der aquatischen Hyphomyceten und ihre Anregungen zum Fortgang der Arbeit.

Herr Dr. J. Schmidt vom Institut für Pflanzenbiochemie danke ich für die experimentelle Unterstützung zu massenspektrometrischen Untersuchungen und die fachlichen Diskussionen zur Interpretation der Ergebnisse.

Herr Dr. K. Grancharov vom Institut für Molekularbiologie der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften in Sofia, danke ich für die Vermittlung von theoretischen und praktischen Kenntnissen zum Nachweis der Enzymaktivitäten von UDP-Glucosyltransferase und UDP-Glucuronyltransferase.

Mein Dank gilt weiterhin allen Kollegen und Freunden, die nicht namentlich erwähnt wurden, deren Anregungen und Unterstützung jedoch maßgeblich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Die Promotion wurde durch Stipendien des Landes Sachsen-Anhalt und der DFG gefördert.

Bildungsgang

Name	Torsten Augustin
Geburtsdatum	28. 06. 1971
Geburtsort	Görlitz

1978 – 1988	Polytechnische Oberschule in Görlitz
1988 – 1990	Erweiterte Oberschule in Görlitz
05. Juli 1990	Abitur
1991 – 1996	Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Studiengang Biochemie
1995 – 1996	Diplomarbeit: Reinigung und Charakterisierung der Glutathion-Synthetase aus *Fontinalis antipyretica*
26. September 1996	Diplom
1997 – 2001	Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß im Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 2002	berufstätig als wissenschaftlicher Mitarbeiter in einem Prüflabor

Halle/Saale, im Dezember 2003

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle/Saale, im Dezember 2003