

„Behandlung von Textilfarbstoffen durch aquatische Pilze“

D i s s e r t a t i o n



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

in Zusammenarbeit mit dem

Lehrstuhl für Umweltbiotechnologie

des Internationalen Hochschulinstitutes Zittau

von

Herrn Diplom-Biologen Charles Junghanns

geb. am 09. April 1979 in Leipzig

Gutachter

1. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß

2. Prof. Dr. Martin Hofrichter

3. Prof. Dr. Georg Gübitz

Halle (Saale), 05. Juni 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013693

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013693>]

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1. EINLEITUNG.....	4
1.1. Aquatische Pilze	4
1.2. Laccasen (E.C. 1.10.3.2)	8
1.3. Textilfarbstoffe.....	10
1.4. Anliegen der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1. Herkunft, Isolation und Identifizierung der Pilzstämmе	20
2.2. Kultivierung	24
2.2.1. Stammhaltung und -auswahl.....	24
2.2.2. Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben	25
2.2.2.1. Optimierung der Laccaseproduktion	27
2.2.3. Flüssigkulturen in Rührkesselreaktoren.....	28
2.2.4. Flüssigkulturen in Bioreaktoren im Labormaßstab.....	30
2.3. Analytische Methoden	32
2.3.1. Bestimmung von Biotrockenmassen.....	32
2.3.2. Absorptionsmessungen	33
2.3.3. Aufnahme von Spektren.....	33
2.3.4. Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs	34
2.3.5. Aktivitätsbestimmungen von Enzymen	34
2.3.6. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	35
2.3.7. Massenspektrometrische Untersuchungen von Farbstoffen.....	35
2.4. Reinigung der Laccase aus <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03.....	37
2.5. Strukturelle Charakterisierung der Laccase.....	37
2.5.1. Gelelektrophoresen	37
2.5.2. Gelfiltration.....	38
2.5.3. Massenspektrometrie	39
2.5.4. Glycosylierungsgrad	39
2.6. Funktionelle Charakterisierung der Laccase.....	40
2.6.1. pH-Wert und Temperatur.....	40
2.6.2. Entfärbung von Textilfarbstoffen.....	40
2.6.3. Kinetische Parameter	41
2.6.4. Inhibitoren.....	41
2.7. Charakterisierung des Laccasegens und –transkripts	42
2.7.1. Isolation von Nukleinsäuren und cDNA-Synthese	42
2.7.2. PCR-Bedingungen	42
2.7.3. Klonierung, Sequenzierung und Sequenzanalyse	43
2.8. Statistische Auswertungen	44

3. ERGEBNISSE.....	45
3.1. Isolation, Identifizierung und Auswahl der Pilzstämmе.....	45
3.1.1. Identifizierung neuer Stämme.....	45
3.1.2. Screening auf Agarplatten.....	46
3.1.3. Screening in Mikrotiterplatten.....	47
3.2. Entfärbungsversuche in Erlenmeyerkolben.....	53
3.2.1. Einzelfarbstoffe in Malzextraktmedium.....	54
3.2.2. Einzelfarbstoffe in Modellabwässern mit Malzextrakt.....	56
3.2.3. Farbstoffgemische in Modellabwässern mit Malzextrakt.....	59
3.2.4. Einzelfarbstoffe ohne zusätzliche Nährstoffquelle.....	61
3.2.5. Farbstoffgemische in Modellabwässern ohne Malzextrakt.....	64
3.2.6. Massenspektrometrie des Abbaus von <i>Acid Blue 62</i>	66
3.3. Entfärbungsversuche in Bioreaktoren.....	68
3.3.1. Entfärbung von <i>Reactive Blue 19</i> in einem <i>airlift</i> -Reaktor.....	68
3.3.2. Entfärbung von <i>Direct Blue 71</i> in Bioreaktoren.....	70
3.3.3. Entfärbung eines Modellabwassers in Bioreaktoren.....	72
3.3.4. Entfärbung eines Modellabwassers in aufskalierten Bioreaktoren.....	73
3.4. Laccase des Stammes UHH 5-1-03.....	74
3.4.1. Produktion, Reinigung und strukturelle Charakterisierung.....	74
3.4.2. Substratspezifität.....	77
3.4.3. pH-Optimum und –stabilität.....	79
3.4.4. Temperaturoptimum und –stabilität.....	80
3.4.5. Inhibition der Laccase.....	81
3.4.6. Sequenzierungsstrategie zur Analyse von Gen und Transkript.....	82
3.4.7. Laccasegen und theoretische Eigenschaften des Proteins.....	83
3.4.8. Nachweis der Expression des Laccasegens.....	87
3.5. Optimierung der Laccaseproduktion.....	87
3.5.1. <i>Reactive Blue 19</i> als Elizitor und Tomatensaft als Medium.....	87
3.5.2. Identifizierung optimaler Produktionsbedingungen.....	88
3.5.2.1. Interaktionen zwischen <i>Reactive Blue 19</i> und Tomatensaft.....	91
3.5.3. Maßstabsvergrößerung der Laccaseproduktion.....	91
4. DISKUSSION	93
4.1. Klassifizierung der Stämme.....	93
4.2. Eignung von aquatischen Pilzen zur Behandlung von Farbstoffen.....	93
4.3. Mechanismen des Farbstoffabbaus bei aquatischen Pilzen.....	96
4.4. Laccase des Stammes UHH 5-1-03.....	102
4.5. Optimierung der Laccaseproduktion.....	105
4.6. Einsatz des Stammes UHH 5-1-03 in Bioreaktoren.....	108
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	110
6. AUSBLICK.....	113
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	114
8. DANKSAGUNG.....	130
9. ANHANG.....	i

Abkürzungsverzeichnis

ΔE	Extinktionsänderung
ε	spezifischer Extinktionskoeffizient
σ	Standardabweichung der Grundgesamtheit
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
18S	Untereinheit eukaryotischer Ribosomen
28S	Untereinheit eukaryotischer Ribosomen
aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
ABk194	<i>Acid Black 194</i>
ABk210	<i>Acid Black 210</i>
Abs _A	Absorption der Probe
Abs _C	Absorption der Kontrolle
ABTS	2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonat)
ABu62	<i>Acid Blue 62</i>
ACN	Acetonitril
amu	<i>atomic mass unit</i> (atomare Masseneinheit)
AOP	<i>advanced oxidation processes</i> (fortschrittliche Oxidationsprozesse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQH	Aquatische Hyphomyceten
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
AR	Azoreduktase
Ar	Aromatische Struktur
AR266	<i>Acid Red 266</i>
AR299	<i>Acid Red 299</i>
AY194	<i>Acid Yellow 194</i>
AY49	<i>Acid Yellow 49</i>
BCCM	<i>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar)
BRENDA	<i>The Comprehensive Enzyme Information System</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cbr	<i>copper binding region</i> (Kupferbindungsstelle)
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cps	<i>counts per second</i> (Zählungen pro Sekunde)
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
d	durchstrahlte Schichtdicke
Da	Dalton
DBk38	<i>Direct Black 38</i>
DBu1	<i>Direct Blue 1</i>
DBu71	<i>Direct Blue 71</i>
Dep.	Department
DIN	Deutsche Industrienorm
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DOC	<i>dissolved organic carbon</i> (gelöster organischer Kohlenstoff)
DrR28	<i>Direct Red 28</i>
DrR80	<i>Direct Red 80</i>
DsBu1	<i>Disperse Blue 1</i>
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DsR1	<i>Disperse Red 1</i>
DY106	<i>Disperse Yellow 106</i>
DY3	<i>Disperse Yellow 3</i>
DyP	<i>dye decolorizing peroxidases</i> (Farbstoff entfärbende Peroxidasen)
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
EcoRI	Restriktionsendonuklease RI aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

Abkürzungsverzeichnis

EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EPA	<i>US Environmental Protection Agency</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i> (Elektrosprayionisierung)
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
F	Fischer-Wert
FG	Freiheitsgrad
FIA	<i>flow injection analysis</i> (Fließinjektionsanalyse)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (schnelle Proteinflüssigkeitschromatografie)
FS	Farbstoff
g	Erdbeschleunigung
HBT	1-Hydroxybenzotriazol
HIC	hydrophobe Interaktionschromatografie
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease III aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
IC50	<i>inhibitory concentration 50</i> (Konzentration der 50%-igen Hemmung)
IDA	<i>information dependent acquisition</i> (informationsabhängige Aufnahme)
IEF	isoelektrische Fokussierung
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
k.Ä.	keine Änderung
k.E.	keine Entfärbung
k_{cat}	Wechselzahl
KI	Isolationsstandort Quelle Kloschwitz
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Konz	Konzentration
Lac	Laccase
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigkeitschromatografie)
LiP	Lignin-Peroxidase
LME	Lignin modifizierende Enzyme
LMS	Laccase-Mediator-System
m/z	Massenzahl
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i> (Matrix unterstützte Laserdesorption / -ionisierung)
ME	Malzextrakt
MnP	Mangan-abhängige Peroxidase
MOWSE	<i>molecular weight search</i> (Molmassensuche)
MQ	Mittel der Quadrate
MRM	<i>multiple reaction mode</i> (multipler Reaktionsmodus)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	<i>mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
MUCL	<i>Mycothèque de L'Université catholique de Louvain</i>
n	Anzahl der Messwerte
n.b.	nicht bestimmt
NaAc	Natriumacetat
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
P	Signifikanzniveau
p.a.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
P10	Isolationsstandort Mansfelder Land
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PHB	4-Hydroxybenzoesäure
pI	isoelektrischer Punkt
<i>PvuI</i>	Restriktionsendonuklease I aus <i>Proteus vulgaris</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> (schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden)
RBk5	<i>Reactive Black 5</i>
RBu19	<i>Reactive Blue 19</i>
RBu222	<i>Reactive Blue 222</i>
rDNA	<i>ribosomal DNA</i> (ribosomale DNA)
RM	Redoxmediator
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)

Abkürzungsverzeichnis

rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RR195	<i>Reactive Red 195</i>
RR4	<i>Reactive Red 4</i>
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
RY145	<i>Reactive Yellow 145</i>
RY81	<i>Reactive Yellow 81</i>
S.D.	Standardabweichung
S _{0,5}	halb sättigende Substratkonzentration
s ₁ , s ₂	Standardabweichungen der Stichproben
SA	<i>sinapic acid</i> (Sinapinsäure)
SaSe	Isolationsstandort Salziger See
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatografie)
SGZ	Syringaldazin
SOPHIED	<i>Novel Sustainable Bioprocesses for European Colour Industries</i> (EU-Projekt)
sp.	<i>species</i> (Art)
SpW	Isolationsstandort Spittelwasser
SQ	Summe der Quadrate
T	<i>treatment</i>
<i>t</i>	T-Wert
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TM	Trockenmasse
TOC	<i>total organic carbon</i> (Gesamter organischer Kohlenstoff)
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TS	Tomatensaft
Tt	Isolationsstandort Tongrube Teutschenthal
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UCL	<i>Université catholique de Louvain</i>
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
UHH	Urbane Hydrogeologie Halle
UMB	Umweltmikrobiologie
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichts
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen pro Volumen)
V _c	codierte Konzentration
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V _n	Konzentration im Optimierungsversuch
V _o	Konzentration am Zentralpunkt
VP	Versatile Peroxidasen
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WD(A)	Isolationsstandort Steinbach
<i>Xho</i> I	Restriktionsendonuklease I aus <i>Xanthomonas campestris</i>
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden nach dem internationalen Ein-Buchstabencode, Einheiten entsprechend dem SI-System abgekürzt. Die Nukleotidabkürzungen wurden nach IUPAC-Standard (International Union of Pure and Applied Chemistry) eingesetzt.

1. Einleitung

Pilze (lat. *Fungi*) sind eukaryotische, heterotrophe Organismen und bilden neben Farbalgen (*Chromista*), einzelligen Protisten (*Protozoa*), Tieren (*Animalia*) und Pflanzen (*Plantae*) das fünfte Reich in der Domäne der Eukaryoten (130). Sie repräsentieren die bedeutendste Gruppe der Destruenten neben den Bakterien. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass etwa 6 – 7 % (70000 – 100000 Arten) der globalen Pilzdiversität systematisch erfasst sind (130). Die meisten der Arten wurden für terrestrische Habitate beschrieben. Die ökologische Rolle terrestrischer Pilze, vor allem ihre Fähigkeit zum Lignozelluloseabbau, ist gut untersucht und unterstreicht die einzigartige Stellung der Pilze im globalen Kohlenstoffkreislauf. Aquatische Habitate stellen durch die Vielfalt an räumlich und zeitlich variablen ökologischen Nischen nicht minder interessante Umgebungen dar, müssen sich in solchen Umgebungen vorkommende Organismen doch an entsprechende Bedingungen anpassen, um erfolgreich zu überleben. Die Erforschung solcher Anpassungen stellt einen Schlüssel zum vollständigen Verständnis der ökologischen Zusammenhänge in Gewässern und darüber hinaus eine potenzielle Quelle für neuartige biotechnologische Anwendungen dar.

1.1. Aquatische Pilze

Aquatische Ökosysteme umfassen limnische und marine Habitate. Diese lassen sich weiter unterteilen, z. B. in stehende, Fließ- und Grundwässer. Oberflächengewässer sind hinsichtlich ihrer Diversität an Pilzen unter den aquatischen Umgebungen zwar am intensivsten, allerdings immer noch unzureichend untersucht. Dennoch wurde deutlich, dass die Artenzusammensetzung sich erheblich von terrestrischen Habitaten unterscheidet. Es konnten Vertreter aller Abteilungen der echten Pilze (*Eumycota*) und auch der Oomyceten in aquatischen Habitaten nachgewiesen werden (242).

Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass sich aquatische Pilze mehrmals parallel aus terrestrischen Vorfahren entwickelt haben (280). Daher finden sich in aquatischen Umgebungen Pilze unterschiedlicher Anpassungsstufen an das Leben in Wasser. Dies umfasst Arten, die ihren gesamten Lebenszyklus im Wasser vollenden und nicht außerhalb der aquatischen Umgebung gefunden werden (*residents*), ubiquitär vorkommende Vertreter (*immigrants*) sowie Arten, deren Sporen zufällig in die aquatischen Umgebungen eingetragen werden (*transients*). Aufgrund dieser Tatsachen ist die Bezeichnung "aquatische Pilze" unscharf und die Zuordnung isolierter Arten erschwert (287). Aus pragmatischen Gründen wird der Begriff jedoch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Laut Shearer *et al.* (242) wurden bislang 3047 Pilzarten aus aquatischen Habitaten beschrieben. Dazu wurden auch Oomyceten gezählt. Die als Ascomyceten identifizierten meiosporen Pilzarten stellen mit ihren eindeutig zuordenbaren mitosporen Anamorphen rund 44 % aller gefundenen Arten und sind die größte Gruppe, gefolgt von nicht genauer zuordenbaren mitosporen Pilzen (26 %). Die dritte Gruppe sind die Chytridiomyceten (19 %). Insgesamt wurden nur 21 Arten von Basidiomyceten (< 1 %) beschrieben. Diese Gruppe ist im Vergleich zu terrestrischen Habitaten eindeutig unterrepräsentiert. Gleiches gilt für die Zygomyceten.

Mitospore Pilze beinhalten die asexuellen Stadien (Anamorphe) von vorwiegend Ascomyceten und einigen Basidiomyceten. Die mitosporen Pilze produzieren kleine ($< 0,5$ mm) asexuelle Verbreitungseinheiten (Konidien) durch mitotische Teilung (Abbildung 1). Diese Konidien variieren in Farbe, Größe, Form und Septierung. Traditionell wurden solche Pilze *fungi imperfecti* genannt und den Deuteromyceten zugeordnet (237). Die mitosporen Pilze werden in zwei Klassen eingeteilt: Hyphomyceten und Coelomyceten. Die Hyphomyceten bilden die Konidien direkt von vegetativen Strukturen (Hyphen) oder von Konidiophoren, spezialisierten Hyphen, die konidiogene Zellen bzw. Konidien tragen. Im Gegensatz dazu bilden die Coelomyceten die Konidien innerhalb von asexuellen Fruchtkörpern, den Pycnidien.

Neben dieser kann eine Einteilung in drei ökologische Gruppen vorgenommen werden: die aquatischen Hyphomyceten (AQH), die aeroaquatischen Hyphomyceten und eine Gruppe diverser Pilze, zu denen sowohl Hypho- als auch Coelomyceten gehören (242).

Aquatische Hyphomyceten

Die AQH wurden 1942 von Ingold erstmals beschrieben (110) und werden deshalb auch als *Ingoldian Fungi* bezeichnet. Sie bilden eine polyphyletische Gruppe mit Vertretern der Asco- und Basidiomyceten. Die von den AQH gebildeten Konidien sind meist unpigmentiert und verzweigt oder lang und schmal. Die Konidienformen, welche von tetradial über sigmoid bis zu schraubig reichen (284), stellen eine Adaptation an die Sporenverbreitung im fließenden Wasser dar (99, 283, 287). Abbildung 1A zeigt Beispiele für Sporenformen. Die AQH kommen vor allem in gut durchlüfteten Fließgewässern mit dichter Ufervegetation vor (88, 241). Bis zum heutigen Tag sind etwa 290 Arten beschrieben (242). Beispiele für AQH, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind *Heliscus lugdunensis* Sacc. et Thérriy, *Clavariopsis aquatica* De Wild., *Tetracladium marchalianum* De Wild. und *Tricladium angulatum* Ingold.

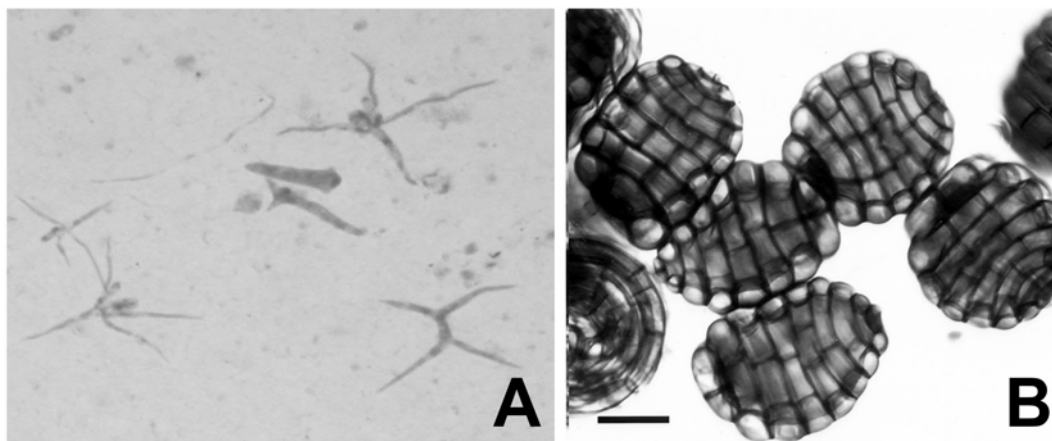


Abbildung 1: (A) Unterschiedlich geformte Konidien aquatischer Hyphomyceten. Deutlich sind die Verzweigungen der Sporen als Anpassung an die Verbreitung im Wasser zu erkennen. (Quelle: G. Krauß, UFZ; Lichtmikroskopie, 40-fache Vergrößerung). (B) Konidien des aeroaquatischen Hyphomyceten *Helicoon* sp. Der Balken entspricht 20 μ m. Zu erkennen sind die Hohlräume in der Mitte der Sporen, in welchen Luft eingeschlossen wird (Quelle: Chang (40)).

Aeroaquatische Hyphomyceten

Der Begriff aeroaquatische Hyphomyceten wurde von van Beverwijk geprägt (26). Diese Organismen bilden rein vegetatives Myzel auf Substraten unter Wasser. Konidien werden nur gebildet, wenn ein Kontakt zur Luft besteht. Die hohe Schwimmfähigkeit der teilweise komplex aufgebauten Konidien wird z. B. durch Lufteinschlüsse erreicht (Abbildung 1B). Im Gegensatz zu AQH werden diese Pilze vor allem in stehenden Gewässern wie Tümpeln, Teichen und Gräben gefunden, wo sie Blätter und holziges Material unter semianaeroben Bedingungen

besiedeln (88). Zurzeit sind etwa 90 Arten von aeroaquatischen Pilzen beschrieben (242). Typische Vertreter gehören zu den Gattungen *Helicoon* und *Helicodendron*.

Diverse mitospore Pilze

In diese Gruppe werden dunkel pigmentierte und hyaline Pilze (Hypho- und Coelomyceten) eingeordnet, die zu keiner der beiden vorgenannten Gruppen gehören (88). Sie kommen auf verrottendem Pflanzenmaterial in semiaquatischen und aquatischen Habitaten weltweit vor. Etwa 450 Arten werden momentan dieser Gruppe zugeordnet. Die Konidien zeigen keine speziellen Anpassungen an die aquatische Umgebung. Beispiele für Vertreter der diversen mitosporen Pilze sind Arten der Gattungen *Aquaphila*, *Canalisporium*, *Elegantimycetes* und *Yinmingella*, die bislang nur aus Süßwasserhabitaten isoliert wurden, während Vertreter der Gattungen *Arthrobotrys*, *Brachysporiella*, *Dictyosporium*, *Sporoschisma* und *Trichocladium* sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Habitaten nachgewiesen wurden (242).

Aquatische Pilze besiedeln hauptsächlich allochthones organisches Material in fließenden und stehenden Gewässern (88, 242, 254) und sind somit saprotroph. Daneben wurden auch parasitisch auf/in einer Vielzahl von Wirten (Algen, Pilze, Pflanzen, Moose, Invertebraten) lebende Arten beschrieben. Saprophytische aquatische Pilze sind in der Lage, schwer verwertbare pflanzliche Polymere zu zersetzen. Um die besiedelten Substrate (Blätter, Nadeln, kleine Zweige) verwerten zu können, besitzen aquatische Pilze ein breites Spektrum an extrazellulären hydrolytischen Enzymen (beispielsweise Pektinasen und Zellulasen), die es ermöglichen, Zellulose und Pektin als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Daher stellen aquatische Pilze den Nährstoff- und Energiefluss zwischen pflanzlichem Detritus und Invertebraten her. Damit nehmen sie, neben Bakterien, eine zentrale Stellung im Nahrungsnetz der aquatischen Ökosysteme ein (33, 257).

Bei terrestrischen Pilzen, vor allem bei ligninolytischen Basidiomyceten, sind extrazelluläre oxidative Enzyme sehr umfangreich untersucht worden (100, 107, 168, 271, 286). Während das Enzym Laccase, ein Beispiel dieser Enzyme, auch für AQH (2) und Pilze aus aquatischen Umgebungen beschrieben ist (32, 118, 166), wurde bislang keine Lignin-Peroxidase (LiP) in aquatischen Pilzen nachgewiesen. Das Vorkommen von anderen Peroxidasen, darunter auch den ligninmodifizierenden Mangan-Peroxidasen (MnP), wurde durch unspezifische Tests in einigen aquatischen Pilzen wahrscheinlich gemacht, eine Isolierung und Charakterisierung steht allerdings aus (2, 32). In welchem Umfang aquatische Pilze Lignin abbauen können, ist nicht genau bekannt (32, 287).

Umweltschadstoffe und aquatische Pilze

Anthropogene Einträge industriellen, landwirtschaftlichen und urbanen Ursprungs führen zur Belastung der Umwelt mit organischen Substanzen (32). Ähnliches gilt für Schwermetalle (Elemente mit einer Dichte $> 5 \text{ g-cm}^{-3}$), die ein besonderes Problemfeld darstellen, da sie nicht abgebaut werden können und durch menschliche Aktivitäten zunehmend in der Biosphäre mobilisiert werden. An Standorten, die organische Belastungen zeigten, konnte ein Rückgang der Diversität von AQH, in anderen Arbeiten darüber hinaus eine Verzögerung des Abbaus von eingetragenen Pflanzenmaterial festgestellt werden (139, 213). Laboruntersuchungen zum Einfluss von Schwermetallen auf aquatische Pilze ließen Hemmungen des Wachstums und eine verminderte Reproduktionsrate erkennen (3, 30, 112). Bermingham (24) beschreibt

Veränderungen in Artenzusammensetzung, -zahl und zeitlichem Ablauf des Substratabbaus unter Schwermetallstress.

AQH wurden in früheren Arbeiten vorwiegend für saubere Fließgewässer beschrieben (19, 98). Durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte in extrem schwermetallbelasteten Habitaten des Mansfelder Landes eine zwar verarmte, aber dennoch erstaunlich vielfältige Artengemeinschaft von AQH sowohl in Oberflächengewässern (140, 253) als auch in Grundwässern (142, 144, 145) nachgewiesen werden. Deshalb und aufgrund der überschaubaren Artenanzahl im Vergleich zu Bakterien wurde die Nutzung von AQH als Zeigerorganismen zur Einschätzung der Gewässerqualität vorgeschlagen (251).

Neben der evidenten Besiedelung belasteter aquatischer Habitate ist eine Beteiligung von aquatischen Pilzen an Abbauprozessen verschiedener Organika in ihren Lebensräumen wahrscheinlich. So konnten aquatische Pilze in belasteten Habitaten natürliche organische Verbindungen (200, 201) und Xenobiotika (143, 213) abbauen. In unserer Arbeitsgruppe konnte der Abbau der human- und umwelttoxikologisch problematischen Xenoöstrogene Nonylphenol und Bisphenol A durch einen Stamm nachgewiesen werden, der aus einem mit Nonylphenol kontaminierten Sediment isoliert wurde (117, 118, 181, 182). Die Biotransformation von in Kosmetikprodukten eingesetzten und umweltbedenklichen polyzyklischen Moschusduftstoffen durch einen AQH und ein mitospores aquatisches Isolat konnte ebenfalls gezeigt werden (165). Dabei wurde die Beteiligung extrazellulärer Laccasen an den Biotransformationsprozessen deutlich. Ähnliche Ergebnisse, obwohl ohne Nachweis einer Beteiligung von Laccasen, wurden mit Pilzstämmen aus Gewässern erhalten, die mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen belastet waren (118, 165, 230). Da bislang nur Daten von Reinkulturen vorliegen, ist eine quantitative Abschätzung der Beteiligung von aquatischen Pilzen an der natürlichen Attenuierung von Umweltschadstoffen in Gewässern schwer möglich und bedarf weiterer Untersuchungen. Dennoch deuten die bisher verfügbaren Daten auf eine nicht unerhebliche Beteiligung von AQH und anderen aquatischen Pilzen an der Biotransformation von einer Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Umweltkontaminanten hin. Die bislang gewonnenen Erkenntnisse mit Reinkulturen können in die Entwicklung neuer biotechnologischer Anwendungen einfließen. Dies gilt umso mehr, da aquatische Ökosysteme eine bislang nur unzureichend ausgenutzte Quelle für die Isolation von Organismen darstellen. Diese sind möglicherweise besser zur Behandlung von bestimmten Abwässern geeignet, da organismische Anpassungen an die Bedingungen in aquatischen Lebensräumen zu erwarten sind. Diese Anpassungen könnten einen Vorteil hinsichtlich nachteiliger Eigenschaften von Abwässern darstellen, wie z. B. den hohen Gehalt an anorganischen Ionen in Abwässern der Textilindustrie (59, 145, 206). Dies gilt selbstverständlich nicht nur für Gesamtorganismen, sondern auch für deren Enzyme. In diesem Zusammenhang sind vor allem Laccasen als vielversprechend einzuschätzen, durch Studien an Weißfäulepilzen konnte die Vielseitigkeit des Enzyms gezeigt werden. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe rechtfertigen die genauere Untersuchung von Laccasen in aquatischen Pilzen.

1.2. Laccasen (E.C. 1.10.3.2)

Die Laccase ist eines der ältesten bekannten Enzyme und wurde intensiv untersucht, nicht zuletzt aufgrund umfangreicher Studien zum Ligninabbau durch terrestrische Pilze. Sie wurde erstmals aus dem japanischen Lackbaum *Rhus vernicifera* isoliert (295). Ihren heutigen Namen erhielt sie durch Bertrand (25). In Pflanzen sind Laccasen in die Lignifizierung involviert (191), eine Beteiligung an der Wundheilung ist beschrieben (172). In Bakterien wurden laccaseähnliche Gene identifiziert (4, 47, 129) und aus *Bacillus subtilis* wurde eine Laccase isoliert, die an der Endosporenbildung beteiligt ist (169). Das detaillierteste Wissen existiert über pilzliche Laccasen (14, 85, 172). Es konnte eine Beteiligung von Laccasen an einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Prozessen, wie Pigmentbildung, Fruchtkörperentwicklung, Wachstum, Entstehung von Virulenz in pflanzen- und humanpathogenen Pilzen, nachgewiesen werden (103, 298). Die ökologisch wichtigste Funktion von Laccasen ist die Beteiligung an der Degradation von Lignin (151).

Laccasen sind Glykoproteine. Die Größe pilzlicher Laccasen liegt zwischen 60 - 80 kDa mit einem Glykosylierungsgrad von 10 – 25 % (14). Obwohl Laccasen meistens als Monomere vorliegen, sind Homodimere, Homotrimere, Heterodimere und Heterooligomere beschrieben (14, 67, 86). Meist werden mehrere Isoformen gebildet. Mit 17 nicht allelen Laccasegenen wurden im Genom des Basidiomyceten *Coprinopsis cinerea* die bislang höchste Anzahl identifiziert (67). Ein Nachweis der Expression dieser Gene steht allerdings noch aus. Das pH-Optimum pilzlicher Laccasen liegt generell im sauren Bereich um pH 4 und schwankt art- und isoformabhängig zwischen 2,0 (*Hortaea acidophila* (263)) und 7,5 (*Podospora anserina* (85)).

Laccasen sind Benzendiol:Sauerstoff Oxidoreduktasen. Aufgrund von vier Kupferatomen im katalytischen Zentrum werden sie den Multikupferoxidasen zugeordnet. Weitere Beispiele dieser Gruppe sind die pflanzliche L-Ascorbatoxidase (E.C. 1.10.3.3) sowie das auch im Menschen vorkommende Ceruloplasmin (E.C. 1.16.3.1) (265). Die vier Kupferatome werden anhand ihrer spektralen Eigenschaften in drei Typen eingeteilt. Das Typ-1-Kupferatom gibt dem Enzym eine charakteristische blaue Farbe (Absorption bei ≈ 600 nm). Ein Typ-2- und zwei gepaarte Typ-3-Kupferatome bilden ein trinukleäres Zentrum, welches räumlich getrennt vom Typ-1-Kupferatom lokalisiert ist. Durch schrittweise Einelektronenabstraktion vom Substrat katalysiert das Typ-1-Kupferatom unter Entstehung von freien Substratradikalen die eigentliche Oxidation. Das freigesetzte Substratradikal kann unspezifische Sekundärreaktionen eingehen. Die übrigen drei Kupferatome dienen als eine Art „Elektronenspeicher“ und übertragen im weiteren Reaktionsverlauf vier Elektronen, welche sie vom Typ-1-Kupfer erhalten, auf molekularen Sauerstoff. Ein Molekül molekularer Sauerstoff wird dadurch zu zwei Molekülen Wasser reduziert (Abbildung 2).

Laccasen können eine Vielzahl von Verbindungen oxidieren. Natürliche Substrate sind beispielsweise Phenole, Polyphenole, methoxylierte Phenole, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzylalkohol (116). Als synthetische Substrate sind z. B. 4-Hydroxy-3,5-Dimethoxybenzaldehydazin (Syringaldazin), 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonat) (ABTS) oder 1-Hydroxybenzotriazol (HBT) zu nennen (72, 265).

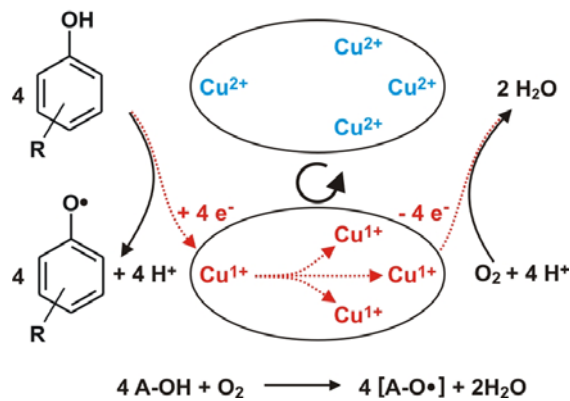


Abbildung 2: Reaktionszyklus der Laccase: Die Laccase in ihrer oxidierten Form (oben) wird durch phenolische Substrate reduziert (links). Im weiteren Reaktionsverlauf wird molekularer Sauerstoff (O_2) zu Wasser reduziert (rechts), dadurch kehrt das Enzym in seine oxidierte Form zurück. Es werden pro Zyklus vier Elektronen der Substratmoleküle auf O_2 übertragen (unten). Übernommen von Liers (155).

Durch molekularbiologische Untersuchungen konnte eine Aminosäure des Laccaseproteins identifiziert werden, die an der Koordination des Typ-1-Kupferatoms beteiligt ist und das Redoxpotenzial von Laccasen beeinflusst (155, 265). Je nachdem, ob es sich bei dieser Aminosäure um Phenylalanin (F), Methionin (M) oder Leucin (L) handelt, wird eine Einteilung in die Klassen 1 (M), 2 (L) und 3 (F) vorgenommen, wobei das Redoxpotenzial von Klasse 1 (*low redox potential laccases*) zu Klasse 3 (*high redox potential laccases*) hin ansteigt. Das Redoxpotenzial des Typ-1-Kupferatoms gegenüber der Normalwasserstoffelektrode übersteigt jedoch bei keiner pilzlichen Laccase ca. + 0,8 V (106) und begrenzt das Substratspektrum aus thermodynamischen Gründen. Daher wurde eine Beteiligung von Laccasen am Ligninabbau lange Zeit in Frage gestellt, da sie von Weißfäulepilzen häufig in Kombination mit anderen ligninolytischen Enzymen mit höherem Redoxpotenzial ausgeschieden werden. Dazu zählen LiP, MnP und versatile Peroxidasen (VP). Wie später gezeigt wurde, müssen Laccasen dennoch wichtige Bestandteile des ligninolytischen Systems der Weißfäulepilze sein, da die Fähigkeit zum Ligninabbau in einer phenoloxidasenegativen Mutante der Art *Sporotrichum pulverentum*, der Anamorphe des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium*, verloren ging (151). Eggert *et al.* (69) isolierten einen Stamm der Art *Pycnoporus cinnabarinus*, welcher zwar Laccase, aber keine Peroxidasen bildete und trotzdem zu einem effizienten Ligninabbau fähig war. Um diese Phänomene zu erklären, wurde das Vorkommen eines Laccase-Mediator-Systems (LMS) postuliert und ist trotz eines fehlenden funktionellen Nachweises *in vivo* heute allgemein anerkannt (58, 72, 151). Ein Redoxmediator ist eine niedermolekulare Verbindung, welche nach Oxidation durch Laccase ihrerseits Oxidationsreaktionen ausführen kann (Abbildung 3).

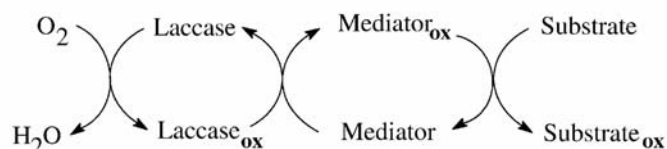


Abbildung 3: Prinzip der mediatorvermittelten Oxidation von Substraten durch Laccase nach Fabbrini *et al.* (72).

Durch die Oxidation von Mediatoren wird das Substratspektrum von Laccasen erheblich erweitert. 3-Hydroxyanthranilsäure (68), 4-Hydroxybenzoesäure (PHB) und 4-Hydroxybenzylalkohol sind Beispiele für Metabolite, die von Weißfäulepilzen gebildet werden

und nachweislich als Redoxmediatoren fungieren können, wie in zellfreien enzymatischen Systemen gezeigt wurde (116). Typische synthetische Mediatoren sind ABTS und HBT (55, 72). Diese wurden zur Oxidation von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und endokrin aktiven Substanzen wie Bisphenol A und Nonylphenol eingesetzt (14, 118, 161, 270). Auf die Eignung der Laccasen zur Oxidation von Farbstoffen wird in Abschnitt 1.3 eingegangen.

Die geschilderten Eigenschaften von Laccasen machen diese attraktiv für diverse biotechnologische Anwendungen wie Delignifizierung von Zellstoff, Farbstoffbleichung und die Behandlung von organikabelasteten Wässern und Böden (215, 286). Die Suche nach effektiven und geeigneten Redoxmediatoren stellt dabei einen wichtigen Aspekt der Forschung dar (34). Darüber hinaus können Laccasen auch für die Synthese von neuartigen Polymeren eingesetzt werden (216, 275).

Es wurden unterschiedliche Faktoren identifiziert, welche mit der Genexpression von Laccasen in Basidiomyceten im Zusammenhang stehen (49, 197, 250). Dazu zählen Kupfer, phenolische Verbindungen (ähnlich natürlichen Substraten) und Nährstoffbedingungen (C/N-Verhältnis). Eine geringere Zahl von Laccasen wurde aus Ascomyceten isoliert und charakterisiert. Ein vertieftes Wissen über die strukturellen und katalytischen Eigenschaften von Ascomycetenlaccasen (132) und der Regulation ihrer Produktion (158) würde Einblicke in die ökologischen und physiologischen Funktionen dieser Laccasen gewähren und könnte auch zu neuen und interessanten Enzymen für biotechnologische Anwendungen führen (42, 48). Insbesondere Laccasen aus aquatischen Ascomyceten wurden bislang nur unzureichend untersucht. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen darauf schließen, dass solche Laccasen ein nicht unerhebliches Potenzial für verschiedene Anwendungen haben. Die Beteiligung an Selbstreinigungsprozessen in aquatischen Ökosystemen ist wahrscheinlich und Gegenstand aktueller Studien (165, 166). Es ist von beträchtlichem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse, ob Methoden zur Steigerung der Laccaseproduktion in Basidiomyceten auch auf (aquatische) Ascomyceten angewendet werden können.

1.3. Textilfarbstoffe

Sei es in Oberflächengewässern oder gar in der Wasserversorgung, eine Färbung ist eine sichtbare Verschmutzung und wird als störend empfunden. Die Entlassung von gefärbten Abwässern in die Umwelt wird schnell in der Öffentlichkeit thematisiert, da eine Färbung in direkten Zusammenhang mit der möglichen Toxizität eines Abwassers gebracht wird. Neben der ästhetischen Komponente (9) spielt die akute Toxizität der beteiligten Kontaminanten auf Organismen in aquatischen Systemen eine Rolle (220). Des Weiteren können solche Abwässer durch die Absorption von Licht im fotosynthetisch relevanten Wellenlängenbereich einen Einfluss auf aquatische Biozönosen auf Ebene der fotoautotrophen Produzenten haben (203). Daraus folgte eine verschärfte Gesetzgebung in der Europäischen Union, den Vereinigten Staaten von Amerika und zunehmend auch in Entwicklungs- und Schwellenländern, die eine effiziente Entfärbung von Abwässern erforderlich machen (17, 192, 203, 211, 220).

Eine Vielzahl von industriellen Prozessen führt zur Produktion von gefärbten Abwässern. Beispiele dafür sind die Papierindustrie, Gerbereien, die Textilindustrie sowie die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie (97). Die Natur der farbgebenden Verbindungen ist

dabei abhängig vom betrachteten Industriezweig. Während bei der Verarbeitung von Holz zu Papierprodukten vor allem Chloroligninverbindungen, die durch Entfernung von Ligninbestandteilen unter Verwendung von ClO_2 entstehen, zu einer Färbung des Abwassers führen (13), sind in Abwässern von Olivenölmühlen vorwiegend natürliche phenolische Verbindungen verantwortlich für deren schwarze Färbung (113, 269).

Ein besonderes Problemfeld stellen Anwendungen der Textilindustrie dar, bei denen stark gefärbte Verbindungen (Farbmittel) eingesetzt werden, um Materialien mit einem Farbton zu versehen. Mit der Herstellung des ersten synthetischen Farbstoffes Mauvein im Jahre 1856 legte William Henry Perkin den Grundstein für die moderne Textilfarbstoffindustrie (286), die heutzutage zu 90 % synthetische Farbstoffe verwendet (301). Die für 1994 geschätzte weltweit produzierte Menge von einer Million Tonnen (256) verteilt sich auf mehr als 100000 kommerziell erhältliche Farbstoffe (220). Ein Großteil davon wird in der Textilindustrie eingesetzt. Der Grund für diese große Anzahl an Farbstoffen ist in den Ansprüchen der Konsumenten zu suchen. Farbstoffe für die Textilindustrie werden speziell entwickelt, um möglichst resistent gegenüber der Einwirkung von Licht, Wasser, Waschmitteln, Schweiß oder mikrobiellem Angriff zu sein (286). Eine große Anzahl strukturell verschiedener Fasern (z. B. Baumwolle, Wolle und zunehmend synthetische Materialien wie Acryl, Polyester, Polyamid) wird in der Textilindustrie eingesetzt, die entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften auch spezielle Funktionalisierungen der Farbstoffe erfordern, um diese effektiv an das Material zu binden. Nicht zuletzt ist der Bekleidungsmarkt von kurzlebigen Trends gekennzeichnet, welche ein entsprechendes Reagieren der Textilindustrie erfordern (192).

Strukturelle Merkmale

Eine farbige Verbindung ist durch zwei Charakteristika gekennzeichnet.

Besitz eines **Chromophors**: Durch die Absorption von sichtbarem Licht entsteht der Farbeindruck eines Farbstoffes. Für die Absorption ist eine Elektronenanregung im Farbstoff erforderlich. Diese Anregung findet im Chromophor statt (bei organischen Farbstoffen meist das delokalisierte System der π -Elektronen). Typische Chromophore sind $\text{N}=\text{O}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{N}=\text{N}-$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $-\text{C}=\text{N}$ und $(\text{CH}=\text{CH})_n$.

Besitz von **Auxochromen**: Auxochrome sind funktionelle Gruppen, die eingesetzt werden, um das Absorptionsmaximum des Chromophors zu verschieben und dadurch eine Farbänderung hervorzurufen. Beispiele sind $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ (alle sauer) und $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$ (alle basisch, R stellt einen nicht näher definierten organischen Substituenten dar).

Anhand der geschilderten Strukturelemente wird eine Einteilung von Farbstoffen vorgenommen. Es werden, je nach Autor, bis zu 30 Strukturelemente zur Klassifizierung herangezogen (192, 286). Die wichtigsten Strukturklassen in der Textilfarbstoffindustrie sind die Azo- und die Anthrachinonfarbstoffe. Azofarbstoffe (Phenylazobenzen, Abbildung 4) sind durch den Besitz einer oder mehrerer Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindung(-en) charakterisiert und machen etwa 70 % aller produzierten Textilfarbstoffe aus (38). Anthrachinonfarbstoffe weisen ein Anthracen-9,10-dion als Chromophor auf (Abbildung 4).

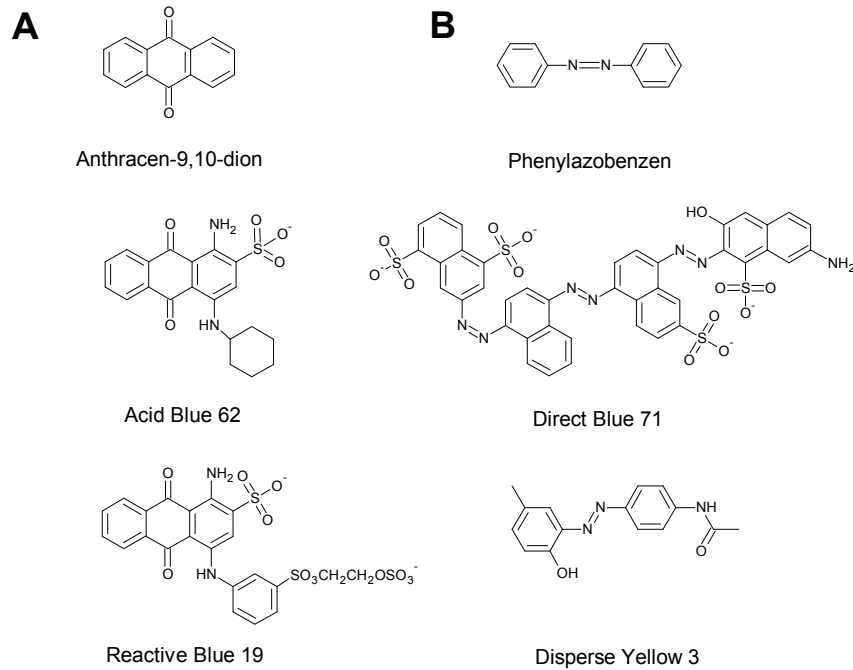


Abbildung 4: Struktur von Chromophoren und Beispiele für entsprechende Farbstoffe. (A) Anthrachinon; (B) Azo.

Eine andere Einteilung kann anhand der Applikationsart der Farbstoffe vorgenommen werden. Es werden saure, basische, Direkt-, Dispers- und Reaktivfarbstoffe unterschieden. Für Charakteristika der einzelnen Applikationsklassen sei auf Hao *et al.* (97) verwiesen.

Behandlung farbstoffhaltiger Abwässer: Probleme und Verfahren

Die Behandlung von Abwässern, die Textilfarbstoffe enthalten, ist von einer Reihe von Problemen gekennzeichnet. Dazu gehören, wie bereits geschildert, die große Anzahl an strukturell verschiedenen, schwer abbaubaren Farbstoffen und deren Menge. Darüber hinaus wird zur Färbung meist ein Gemisch verschiedener Farbstoffe eingesetzt, um einen gewünschten Farbton zu erhalten. Ein nicht unerheblicher Anteil der eingesetzten Farbstoffe bindet nicht an die Fasern und gelangt in das Abwasser. Je nach Applikationsklasse sind es zwischen 0 und 50 %. Es wird von einem durchschnittlichen Verlust von 10 % ausgegangen. Die größten Verluste sind bei den Reaktivfarbstoffen zu verzeichnen (97, 192). Weitere Faktoren, welche eine Behandlung von textilfarbstoffhaltigen Abwässern erschweren, werden im Folgenden erläutert.

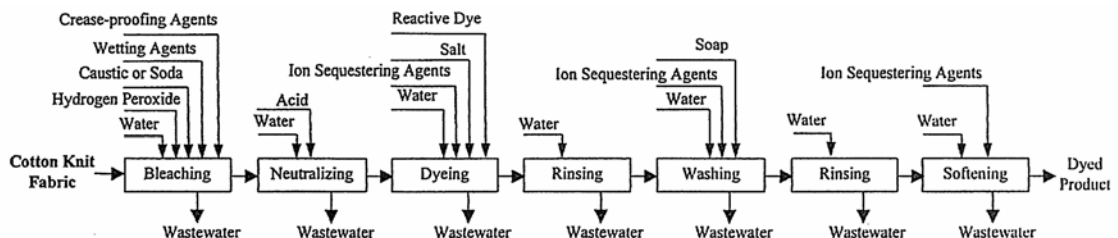


Abbildung 5: Ein typisches Flussdiagramm zur Färbung von Baumwolle mit Reaktivfarbstoffen nach Babuna *et al.* (12).

Wie in Abbildung 5 gezeigt, wird in jedem Schritt der Färbung Abwasser erzeugt. Dies resultiert in einer großen Abwassermenge von rund $120 \text{ L} \cdot (\text{kg gefärbtes Produkt})^{-1}$ (52). Des Weiteren werden während der meisten Färbeprozesse anorganische Salze (NaCl , NaSO_4 , Na_2CO_3) zugesetzt, um die Bindung der Farbstoffe an die Fasern zu verbessern. Diese Salze

erweisen sich als problematisch bei einer Behandlung der Abwässer. Dessen Zusammensetzung ändert sich oft täglich, je nach Auftragslage (T. Kamerler, Rayon textile industries and foreign trade Ltd., Türkei; persönliche Mitteilung). Dabei schwankt der pH-Wert. Werte zwischen 2 und 12 sind nicht ungewöhnlich (97). Hinzu kommen Organika in geringeren Konzentrationen, die entweder als Hilfsstoffe im Färbeprozess verwendet werden (z. B. Feuchthaltemittel, Antistaubmittel, Chemikalien zur Veredelung der Textilien) oder, wie z. B. Biozide, aus den Fasern ausgewaschen werden (276).

Es wurde in den vergangenen Jahrzehnten ein erheblicher Aufwand betrieben, um Verfahren zur Behandlung von Abwässern der Textilindustrie mit dem vorrangigen Ziel der Entfärbung zu finden. Diese lassen sich in chemische, physikalische und biologische Methoden unterteilen. Diese Methoden haben alle bestimmte Nachteile. Für einen umfassenden Überblick sei auf die Übersichtsarbeiten von Anajneyulu *et al.*, Robinson *et al.* und Hao *et al.* verwiesen (9, 97, 220). Tabelle 1 gibt eine Zusammenfassung der Methoden und ihre Vor- und Nachteile.

Tabelle 1: Verschiedene physikalische und chemische Methoden zur Behandlung von Abwässern der Textilfarbstoffindustrie mit jeweiligen Vor- und Nachteilen (9, 203, 220). FS - Farbstoffe.

Methode	Vorteile	Nachteile
Physikalisch		
Adsorption	Gute Entfernung vieler FS	Produktion von festen Abfällen
Aktivkohle	Gute Entfernung vieler FS	Sehr teuer
Torf	Guter Adsorbent, billig	Geringere spez. Oberfläche als Aktivkohle, nicht nachhaltig
Holzschnitzel	Gute Sorption von sauren FS	Lange Behandlungszeiten
Membranfiltration	Geeignet für alle FS	Wartungsintensiv, Produktion von konzentriertem Abwasser
Ionenaustausch	Vollständige Regenerierung	Ungeeignet für Dispersfarbstoffe
Chemisch		
Oxidation	Schnelle Prozesse	Hohe Energiekosten, Bildung von Nebenprodukten
Fenton's Reagenz	Effektive Entfärbung löslicher und unlöslicher FS	Schlammproduktion, teuer
Ozonierung	Effektiv für Azofarbstoffe	Kurze Halbwertszeit, teuer
Fotochemisch	Keine Schlammproduktion	Bildung von Nebenprodukten
Elektrochemisch	Ungefährliche Abbauprodukte	Hohe Kosten für Elektrizität
Natriumhypochlorit	Verfügbarkeit der Chemikalien	Toxische Abbauprodukte
Koagulation	Ökonomisch sinnvoll	Schlammproduktion

Die **Adsorption**, also die Anlagerung von Verbindungen aus einer flüssigen oder Gasphase an einen Feststoff, ist die am besten untersuchte und effektivste Methode zur Behandlung von Abwässern der Textilindustrie. Eine Vielzahl von Materialien, beispielsweise Torf (5), Holzschnitzel (187), Flugasche (162) und Bauxit (149) wurden als Adsorbenzien untersucht. Am besten geeignet, wenn auch am teuersten ist Aktivkohle (44, 163). Die Farbstoffe werden

mit dieser Methode nicht abgebaut und es besteht, insbesondere bei schwermetallhaltigen Farbstoffen, das Problem der Entsorgung der Adsorbate.

Mit **Membranfiltration** können Farbstoffe kontinuierlich von einer Lösung abgetrennt werden (261, 291). Neben den typischen Problemen der Filtration, wie absinkende Filtrationsleistung und *fouling* durch mikrobiellen Bewuchs, werden auch bei diesem Verfahren die Farbstoffe nicht abgebaut, sondern lediglich konzentriert (289).

Durch die polare Natur von Farbstoffen (mit Ausnahme der Dispersfarbstoffe) ist der **Ionenaustausch** eine elegante Methode der Entfernung von anionischen und kationischen Farbstoffen aus Lösungen (246). Obwohl eine nahezu vollständige Regeneration des Austauschers möglich ist, sind die Kosten für dieses Verfahren für eine praktische Anwendung zu hoch (9).

Chemische Oxidation durch Zugabe von Chlor bzw. Natriumhypochlorit findet trotz erheblicher Nachteile durch die leichte Verfügbarkeit der Chemikalien auch heute noch Anwendung (97). Die Methode beruht auf dem Angriff der Aminogruppen des Farbstoffmoleküls, der die Spaltung von Azo-Bindungen initiiert und beschleunigt. Natürlich entstehen durch diese Art der Oxidation eine Vielzahl von chlorierten Organika (246).

Fortgeschrittene Oxidationsprozesse (*advanced oxidation processes*, AOP) haben sich zur Entfärbung von Abwässern auf chemischem Weg durchgesetzt (97). Dazu zählen Fenton's Reagenz (H_2O_2 und Fe(II) (121)), Wasserstoffperoxid, Ozon (154) und UV-Licht (45), evtl. in Verbindung mit Katalysatoren wie TiO_2 (89). Das Prinzip beruht dabei auf der Bildung von hochreaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere $\cdot\text{OH}$, welche zu einer Ringspaltung der Farbstoffmoleküle führen (vgl. Abbildung 4).

Eine relativ neue Technologie ist die **elektrochemische Oxidation**. Dieses Verfahren beruht auf einem Stromfluss durch Elektroden in der Lösung und daraus resultierenden chemischen Reaktionen. Daher müssen keine Chemikalien zugegeben werden (134). Es wird angenommen, dass die Hauptoxidationsmittel Hypochloritionen und/oder hypochlorige Säure sowie Ozon sind, die an der Anode gebildet werden (9).

Bei **Koagulations- und Präzipitationsprozessen** kommen Aluminium- und Eisensulfat zum Einsatz, welche in hydrolysierte Form mit den Farbstoffmolekülen koagulieren und als Aggregate ausfallen (122). Zusätzlich können Kopolymere (z. B. Pentaethylen, Hexamin) zugesetzt werden, die als Flockungsmittel die Effektivität des Prozesses erhöhen (9). Der Nachteil dieser Methode ist Schlamm Bildung. Dieser Schlamm muss aus der Lösung entfernt und entsorgt werden.

Biologische Behandlung

Die biologische Behandlung von komplexen Abwässern, entweder aerob oder anaerob, ist am effektivsten, um einen Großteil der in solchen Abwässern vorhandenen Schadstoffe abzubauen. Es ist bekannt, dass Mikroorganismen eine zentrale Rolle bei der Mineralisierung von Biopolymeren und Xenobiotika spielen (29, 60, 120, 174, 271, 292). Daher wird eine Vielzahl von Ansätzen verfolgt, um Abwässer der Textilfarbstoffindustrie biologisch zu behandeln. Zu Beginn wurde das Belebtschlammverfahren eingesetzt, welches sich bei der Klärung von kommunalen Abwässern bewährt hat. Es wurde jedoch als ungeeignet eingeschätzt (211, 220). So wurden in einer Studie im Pilotmaßstab von 18 untersuchten Azofarbstoffen vier an das Schlammmaterial adsorbiert, drei wurden biologisch abgebaut und elf Farbstoffe

durchliefen den Prozess unverändert (239). Pagga und Brown (195) testeten 87 Farbstoffe in einem aeroben Belebtschlammssystem. Von diesen Farbstoffen wurden 33 nicht und 20 nur durch Adsorption eliminiert. Dennoch wurden verschiedene Organismen isoliert, die Farbstoffe biotransformieren können. Dabei konzentriert sich die Forschung auf Bakterien und Pilze.

Bakterien

Stämme verschiedener Bakterienarten entfärben Farbstoffe (203). Besonders intensiv wurde der Abbau von Azofarbstoffen untersucht. Obwohl auch unter aeroben Bedingungen beschrieben (202, 300), erfolgt der Abbau meist kometabolisch unter anaeroben Bedingungen (256). Kometabolismus ist definiert als die gleichzeitige Metabolisierung von zwei Verbindungen, wobei der Abbau der zweiten Verbindung (Sekundärsubstrat) von der Anwesenheit eines ersten Substrates abhängt. Besonders gut untersucht sind Bakterien aus dem Verdauungstrakt höherer Wirbeltiere (46, 209). Mechanistisch gesehen erfolgt eine reduktive Spaltung der Azobindung. Aerobe Bakterienkonsortien müssen speziell adaptiert sein, um einfache Azoverbindungen angreifen zu können. Die dabei gebildete Azoreduktase ist spezifisch für die zur Adaptation eingesetzte Azoverbindung. Die aeroben Azoreduktasen können die reduktive Spaltung in Gegenwart von Sauerstoff katalysieren (299). Im Gegensatz dazu verläuft die bakterielle Reduktion unter anaeroben Bedingungen relativ unspezifisch und ist daher eher für die Entfärbung von azofarbstoffhaltigen Abwässern geeignet. Aufgrund der Sulfonierung von vielen Farbstoffen und ihrer hoher Molmasse ist nicht zu erwarten, dass diese Farbstoffe die Zellmembran passiv passieren. Daher ist ein intrazellulärer Abbau der Farbstoffe unwahrscheinlich (220, 227). Das Vorkommen einer membranassoziierten Nikotinamadenindinukleotid (NADH)-abhängigen Azoreduktase wurde bei *Sphingomonas xenophaga* BN6 gezeigt (146). Obwohl bislang ungeklärt ist, wie die intrazellulär vorliegenden Reduktionsäquivalente auf die Azoreduktase übertragen werden, scheinen Redoxmediatoren (z. B. sulfonierte Anthrachinone) am eigentlichen Prozess der reduktiven Spaltung der Azobindung beteiligt zu sein (126). In Abbildung 6 ist der beschriebene Mechanismus schematisch dargestellt.

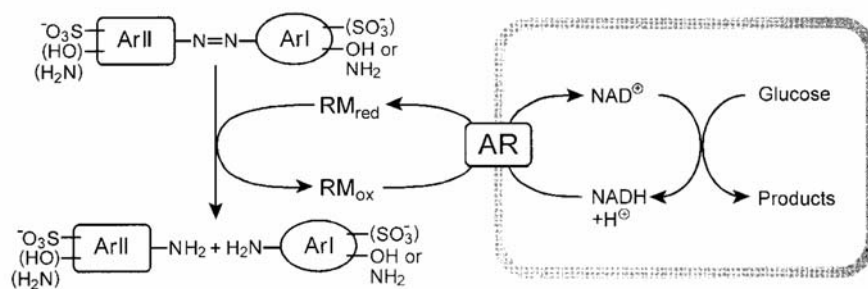


Abbildung 6: Vorgeschlagener Mechanismus der kometabolischen, redoxmediatorabhängigen, reduktiven Spaltung von Azofarbstoffen durch *Sphingomonas xenophaga* BN6 nach Keck et al. (126). AR – Azoreduktase, RM – Redoxmediator, ArI und II – aromatische Strukturen.

Durch die Reduktion der Azofarbstoffe entstehen aromatische Amine. Die farblosen Amine werden meist nicht weiter metabolisiert (256). Darin besteht der größte Nachteil der anaeroben Behandlung von Azofarbstoffen, da aromatische Amine potenziell toxisch, mutagen und carcinogen auf Tiere (einschließlich des Menschen) wirken (46, 204, 220).

Pilze

Die biologische Behandlung von Farbstoffen ist am intensivsten mit Weißfäulepilzen untersucht worden. Diese Gruppe von Basidiomyceten spielt eine zentrale Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf, da sie in der Lage ist, das komplexe Polymer Lignin anzugreifen und zu mineralisieren. Weißfäulepilze können eine Vielzahl von persistenten organischen Schadstoffen mineralisieren. Diese kometabolischen Abbauprozesse erfolgen unspezifisch und oxidativ (96, 214). Der Ligninabbau ist Teil des Sekundärmetabolismus und tritt meist bei Nährstofflimitationen (vor allem Stickstoff) auf (271). Ein primäres Wachstumssubstrat wie Glukose oder Zellulose ist erforderlich (150, 274). Die Spaltprodukte des Lignins werden nicht als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle verwertet (136). Lignin wird nur angegriffen, um eine Verwertung der eigentlichen Wachstumssubstrate (Zellulosen und Hemizellulosen) zu ermöglichen.

Die herausragenden degradativen Fähigkeiten von Weißfäulepilzen basieren auf einem System extrazellulärer oxidativer Enzyme, welche unspezifische, radikalische Reaktionen katalysieren (100). Zu diesem System Lignin modifizierender Enzyme (LME) gehören unter anderen MnP (136), LiP und VP (100). Als Kosubstrat benötigen Peroxidasen Wasserstoffperoxid, das zu Wasser reduziert wird. Ein weiteres Enzym des LME ist die Laccase (151).

Der Schadstoffabbau durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* wurde intensiv untersucht (36, 214, 292). Seine Fähigkeit zur Entfärbung von Farbstoffen ist belegt (56). Die von dem Pilz ausgeschiedene LiP ist am Entfärbungsprozess beteiligt (193). Auch für andere Basidiomyceten, wie *Trametes versicolor* (100, 260), *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* (189), *Phlebia radiata* und *Bjerkandera* sp. (183), sind Fähigkeiten zum Farbstoffabbau nachgewiesen. Dabei waren je nach verwendetem Stamm und untersuchtem Farbstoff unterschiedliche Enzyme des LME an der Entfärbung beteiligt.

Mangan-abhängige Peroxidase (E.C. 1.11.1.13)

Eine häufig auftretende ligninolytische Peroxidase ist die MnP, die von sehr vielen Weißfäuleerregern, darunter sowohl Holz als auch Streuschicht besiedelnde Basidiomyceten, gebildet wird. Ein Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) als prosthetische Gruppe ist essenziell für den katalytischen Zyklus des Enzyms. MnP oxidieren Mn^{2+} zu Mn^{3+} , welches durch Chelatoren (z. B. Oxalsäure) stabilisiert wird. Das oxidierte Manganion wirkt als hochreaktives Oxidationsmittel, welches mit vielen organischen Verbindungen unter Bildung von Radikalen reagiert (107).

MnP katalysiert die Oxidation von *Disperse Yellow 3* bei *Phanerochaete chrysosporium* (252) und ist an der Entfärbung von *Reactive Black 5* und *Cibacron Brilliant Yellow* durch *Trametes versicolor* beteiligt (39). Im Gegensatz zu diesen Azofarbstoffen kann MnP den Anthrachinonfarbstoff *Reactive Blue 19* nicht entfärben (39).

Lignin-Peroxidase (E.C. 1.11.1.14)

LiP katalysieren die Oxidation von nicht phenolischen Ligninbestandteilen und ähnlichen Verbindungen. Der Reaktionsmechanismus verläuft ähnlich zu dem der MnP, allerdings wird das Substrat direkt oxidiert. Die Rolle der LiP während des Ligninabbaus ist daher wahrscheinlich eine weitere Transformation von Ligninfragmenten, welche durch MnP

freigesetzt wurden (100). Die LiP wird nicht von allen Weißfäulepilzen gebildet, möglicherweise ist sie nicht essenziell für den Ligninabbau (286).

Die LiP von *Bjerkandera adusta* konnte sechs Azofarbstoffe und einen Phthalocyaninfarbstoff oxidierten, allerdings erst nach Zugabe von Veratrylalkohol, welcher als Redoxmediator wirkte (101). Eine Beteiligung an der Metabolisierung von *Disperse Yellow 3* wurde für die LiP von *Phanerochaete chrysosporium* berichtet (252). Chivukula *et al.* (43) schlagen einen peroxidasekatalysierten Abbauweg für unterschiedlich substituierte sulfonierte Azofarbstoffe vor.

Versatile Peroxidase (E.C. 1.11.1.16)

Die VP kombinieren die katalytischen Eigenschaften von MnP und LiP. VP katalysieren die Oxidation von Mangan(II)-Ionen und LiP-Substraten, wie Veratrylalkohol und p-Dimethoxybenzen bzw. nicht phenolischen Ligninmodellverbindungen, wie Veratrylglycerolguajacyl ether (37, 102). Diese Eigenschaft ist auf zwei räumlich getrennte Substratbindungsstellen zurückzuführen (167).

Obwohl umfassende Untersuchungen zur Farbstoffoxidation durch VPs ausstehen, konnte für eine VP aus *Pleurotus eryngii* die Oxidation der drei Reaktivfarbstoffe *Reactive Black 5*, *Reactive Violet 5* und *Reactive Blue 38* nachgewiesen werden (102). Aufgrund der Fähigkeit, *Reactive Black 5* zu oxidieren, wurde ihr eine eigene EC-Nummer zugewiesen. Dabei scheinen die Farbstoffmoleküle aufgrund ihrer Größe nicht bis zum aktiven Zentrum diffundieren zu können und werden mittels eines Elektronentransfers an der Oberfläche des Enzyms oxidiert (167).

DyP (dye decolorizing peroxidases)

Die *dye decolorizing peroxidases* (Farbstoff entfärbende Peroxidasen) wurden erst vor Kurzem als Peroxidasefamilie etabliert. Diese Enzyme sind hämabhängig, zeigen aber keine Homologien zu anderen Peroxidasen (302). Ihre natürlichen Substrate sind unbekannt. Katalytisch unterscheiden sich DyP von MnP durch die Fähigkeit, phenolische Verbindungen direkt zu oxidieren, allerdings können DyP, im Gegensatz zu LiP, keine nicht phenolischen Verbindungen oxidieren (73). Besonders hervorzuheben ist ihre namensgebende Eigenschaft, verschiedene synthetische Farbstoffe anzugreifen. Dazu zählen vor allem Anthrachinonfarbstoffe, welche von anderen Peroxidasen nicht umgesetzt werden. So wurde der Anthrachinonfarbstoff *Reactive Blue 5* von der DyP des Pilzes *Geotrichum candidum* (in späteren Arbeiten *Thanatephorus cucumeris*) DEC1 umgesetzt (133, 302). Shin *et al.* (244) charakterisierten eine *Reactive Blue 19* entfärbende Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus*, welche durch Faraco *et al.* (73) als DyP identifiziert wurde.

Laccase (E.C. 1.10.3.2)

Auf den Reaktionsmechanismus und die Eigenschaften von Laccasen wurde bereits eingegangen (Abschnitt 1.2). Neben den oben genannten Substraten wurde die Eignung von Laccasen zum Umsatz von strukturell verschiedenen Farbstoffen in einer Vielzahl von Studien gezeigt: Laccasen aus *Trametes versicolor*, *Polyporus pinisitus* und *Myceliophthora termophila* konnten den Azofarbstoff *Direct Red 28*, den Indigofarbstoff *Acid Blue 74* und mehrere Anthrachinonfarbstoffe entfärben (39). Die strukturell unterschiedlichen Farbstoffe *Reactive Blue 221*, *Reactive Black 5*, *Direct Blue 71*, *Basic Red 9*, *Reactive Blue 19*, *Acid Blue 225* und *Acid Blue 74* wurden durch freie und immobilisierte Laccase aus *Trametes hirsuta* entfärbt und

gleichzeitig detoxifiziert (1). Durch Redoxmediatoren konnte eine verbesserte Entfärbung der Farbstoffe *Reactive Blue 19* und *Aniline Blue* mit Laccasen aus *Pycnoporus cinnabarinus* und *Trametes villosa* beobachtet werden, während die Entfärbung des Azofarbstoffes *Reactive Black 5* und des heterozyklischen Farbstoffes Azur B nur mit Redoxmediatoren stattfand (35). Tauber *et al.* (262) wiesen Metaboliten des Abbaus der Azofarbstoffe *Acid Orange 5* und *Acid Orange 52* durch Laccase aus *Trametes modesta* nach.

Trotz ihrer herausragenden Fähigkeiten zur Entfärbung von Farbstoffen wurden Nachteile identifiziert, die eine praktische Anwendung von Weißfäulepilzen erschweren. Weißfäulepilze können in Flüssigfermentationen Farbstoffe entfärben, gleichzeitig wurde aber deutlich, dass die Enzymproduktion starken Schwankungen unterworfen war (220). Abwasserbehandlungsanlagen und damit aquatische Umgebungen im weiteren Sinne gehören nicht zu den natürlichen Habitaten von terrestrischen Weißfäulepilzen. Es ist daher problematisch, diese in solchen Systemen zu etablieren (256).

Die Eignung ligninolytischer Enzyme aus Weißfäulepilzen zur Behandlung von Farbstoffen ist ebenfalls begrenzt: LiP und MnP haben saure pH-Optima. Die notwendige Ansäuerung des Abwassers stellt einen Kostenfaktor dar (260, 286). Peroxidasen benötigen im Gegensatz zu Laccasen Wasserstoffperoxid für ihren katalytischen Zyklus, werden aber in Gegenwart hoher Wasserstoffperoxidkonzentrationen inaktiviert, was zusätzliche Kosten und prozesstechnische Probleme verursacht. Peroxidasen sind teilweise nicht in der Lage, Anthrachinonfarbstoffe anzugreifen (39) und LiP ist im Vergleich zu Laccasen und MnP relativ instabil (286). Während Laccasen sowohl Azo- als auch Anthrachinonfarbstoffe entfärben, ist eine Hemmung bei praktisch relevanten Ionenstärken berichtet worden (262).

Andere Pilze als Weißfäulepilze wurde weit weniger intensiv untersucht, obwohl eine Bleichung von synthetischen Farbstoffen durch filamentöse Ascomyceten, Hefen und mitospore Pilze gezeigt wurde (76, 114, 159, 212, 297). Dies gilt auch für Laccasen von filamentösen Ascomyceten (42, 48). Es liegen unzureichende Erkenntnisse über den Schadstoffabbau durch aquatische Pilze vor. Dies erschwert mechanistische Untersuchungen. Erkenntnisse zum Abbau von Xenobiotika in unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine maßgebliche Beteiligung extrazellulärer Prozesse an der Biotransformation von organischen Schadstoffen hin (118, 165, 182).

1.4. Anliegen der Arbeit

Die Einleitung von farbstoffhaltigen Abwässern in die Umwelt stellt, nicht zuletzt durch eine geringe gesellschaftliche Akzeptanz, ein ernst zu nehmendes Problem dar. Ein erheblicher Forschungsaufwand wird betrieben, um gefärbte Abwässer effizient zu behandeln. Erfolg versprechende integrierte Forschungsansätze werden beispielsweise im EU-Projekt SOPHIED (*Novel sustainable Bioprocesses for European Colour Industries*) verfolgt.

Alle bislang verwendeten Methoden zur Behandlung von farbstoffhaltigen Abwässern sind durch bestimmte Nachteile gekennzeichnet. Selbst die biologische Behandlung mit Weißfäulepilzen unterliegt Limitationen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit aquatische Pilze durch Anpassungen an ihren Lebensraum neue Alternativen für die Abwasserbehandlung bieten.

Dazu sollten Pilzstämme aus verschiedenen Süßwasserhabitaten (darunter mehrere Isolationsstandorte mit hohem Salzgehalt) isoliert und zusammen mit aquatischen Hyphomyceten und anderen aquatischen Isolatens aus der Stammsammlung des Departments Umweltmikrobiologie des UFZ auf ihre Eignung zur Entfärbung von einzelnen Textilfarbstoffen und weiterführend zur Behandlung von komplexen Modellabwässern untersucht werden.

Vorgesehen war eine Auswahl der effizientesten Stämme aquatischer Pilze anhand der Entfärbung von neun Azo- und drei Anthrachinonfarbstoffen (saure, Direkt-, Dispers- und Reaktivfarbstoffe) durch ein zweistufiges Verfahren. Vergleichend sollten mehrere Weißfäulepilzstämme mitgeführt werden.

Die potentesten Entfärber unter den auszuwählenden Stämmen sollten auf ihre Eignung zur Behandlung von Einzelfarbstoffen und komplexen, Farbstoffgemische enthaltenden Modellabwässern in Flüssigkulturen untersucht werden. Darauf aufbauend sollte ein Bioreaktorsystem größeren Maßstabes entwickelt werden.

Im Hinblick auf wesentliche, an der Biotransformation von Textilfarbstoffen beteiligte Mechanismen und Reaktionen sollten hierfür relevante Enzyme identifiziert und charakterisiert werden. In der Literatur ist Laccase als eines der pilzlichen Schlüsselenzyme zur Entfärbung von Farbstoffen beschrieben. Da sich im Verlauf der Experimente zeigte, dass alle näher untersuchten Stämme Laccase als extrazelluläres Enzym bildeten, sollte eine vielversprechende Laccase gereinigt, biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert sowie deren Beteiligung an Farbstofftransformationen näher untersucht werden.

Bedingt durch die Einbettung der vorliegenden Arbeit in das EU-Projekt SOPHIED und im Hinblick auf die dort angestrebte Entwicklung von effizienten und praktikablen Abwasserbehandlungsverfahren sollte, in enger Zusammenarbeit mit Firmenpartnern, auf eine einfache Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse fokussiert werden.

2. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad "*pro analysi*" von den Firmen Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Soweit nicht abweichend vermerkt, wurde destilliertes Wasser (*Aqua dest.*) zur Herstellung von Lösungen und für Verdünnungen verwendet. Für die Molekularbiologie wurden Chemikalien des Reinheitsgrades "*ultra pure*" bzw. "für die Molekularbiologie" verwendet. Flüssigkeitschromatografie und massenspektrometrische Untersuchungen wurden mit Chemikalien des Reinheitsgrades "*gradient grade*" durchgeführt. Eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lieferanten findet sich in Anhang I.

Einwaagen und Gewichtsbestimmungen fanden an einer G-Analysenwaage R186 D-D1 (Sartorius, Göttingen) statt. Die pH-Werte wurden mit einem auf den entsprechenden pH-Wertbereich geeichten Mikroprozessor-pH-Meter 761 (Knick, Berlin) bestimmt. Für Zentrifugationen wurde eine Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Alle weiteren verwendeten Geräte sind im Zusammenhang mit ihrer jeweiligen Nutzung im Text dargestellt.

2.1. Herkunft, Isolation und Identifizierung der Pilzstämme

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Pilzstämmen verschiedener ökologischer Gruppen gearbeitet. Ein Großteil der verwendeten Pilzstämme wurde aus verschiedenen Oberflächengewässern isoliert. Die Koordinaten und physiko-chemische Parameter der Isolationsstandorte können Tabelle 2 entnommen werden.

Des Weiteren eingesetzte AQH-Stämme und ubiquitär verbreitete Pilze standen aus der Stammsammlung des Departments für Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung (Dep. UMB, UFZ) zur Verfügung.

Daneben wurden terrestrische Weißfäulepilze zu Referenzzwecken eingesetzt, die bis auf ein aus einem aquatischen Standort erhaltenes Isolat (UHH 4-1-03, *Hypholoma fasciculare*) von verschiedenen Stammsammlungen bezogen wurden (Tabelle 3).

Insgesamt 16 Stämme wurden aus Wasserproben des Flusses Saale in und um Halle (Sachsen-Anhalt, UHH-Stämme) gewonnen. Dazu wurden 150 µL der Wasserproben auf Agarplatten ausplattiert, welche 1 % (w/v) Malzextrakt (ME), 1,5 % (w/v) Agar-Agar, 0,9 % NaCl, 400000 U·L⁻¹ Penicillin und 0,4 g·L⁻¹ Streptomycin (pH 5,6–5,8) enthielten (141). Diese Platten wurden bei 14 °C für mehrere Tage unter Lichtausschluss inkubiert. Reinkulturen wurden durch Übertragung von Einzelkolonien auf frische Agarplatten erhalten.

Die salzige Quelle in Kloschwitz (KI) im Saalkreis, welche als Heilbad verwendet wird, ein Teich in der Nähe von Teutschenthal (Tt, Saalkreis), der aus einer ehemaligen Tongrube hervorging sowie der See "Salziger See" (SaSe) im Mansfelder Land wurden aufgrund ihrer hohen Salzgehalte als Isolationsstandorte ausgewählt. Diese sind auf Steinsalzlagerstätten in der Region zurückzuführen. Wasserproben der salzhaltigen Standorte wurden für die Isolation von Pilzstämmen verwendet, wie für die Saalestandorte beschrieben (141). Außerdem wurden aus den oberen 2 – 3 cm des Sediments steril entnommene und bei 4 °C aufbewahrte Proben (10 g) zusammen mit 7,5 g Glasperlen in 100 mL steriler Natriumpyrophosphatlösung (0,2 % (w/v))

für 30 min bei Raumtemperatur (RT) und 130 rpm geschüttelt. Nachdem sich feste Partikel abgesetzt hatten, wurden Aliquots (150 µL) von Verdünnungsreihen auf Malzagarpetrischalen (1 % ME, 1,5 % Agar-Agar) ausplattiert, welche ein Streptomycin-Penicillin-Gemisch enthielten. Stückchen von verrottendem Pflanzenmaterial, die teilweise in den Sedimentproben enthalten waren, wurden direkt auf antibiotikahaltige Malzagarpetrischalen gegeben. Die Agarplatten wurden für einige Tage bei 14 °C inkubiert. Reinkulturen wurden durch die Übertragung von Einzelkolonien auf frische Agarplatten erhalten. Insgesamt wurden 77 Stämme isoliert (Tabelle 3). Vielversprechende Stämme wurden zur Identifizierung an die „*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Mycothèque de L'Université catholique de Louvain*“ (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgien) und, wo im Text angegeben, auch an das „*Centraalbureau voor Schimmelcultures*“ (CBS), Institut der königlichen niederländischen Akademie der Künste und Wissenschaften (Utrecht, Holland) gesendet.

Tabelle 2: Physiko-chemische Wasserparameter und Koordinaten der Isolationsstandorte: Bach Steinbach nahe Waldau (WD(A)), Bach Spittelwasser nahe Jessnitz (SpW), Grundwasserbrunnen im ehemaligen Bergbauggebiet Mansfelder Land (P10), Fluss Saale im Stadtgebiet Halles (UHH 1 und UHH 5), Quelle in Kloschwitz (KI), frühere Tongrube Teutschenthal (Tt), See Salziger See (SaSe). DOC- gelöster organischer Kohlenstoff, TOC – gesamter organischer Kohlenstoff.

Standort- parameter	Isolationsstandort							
	WD(A)	SpW	P10	UHH 1	UHH 5	KI	Tt	SaSe
Rechtswert ^a	4495638	4520134	4465782	4496251	4494397	4483154	4483469	4477590
Hochwert ^a	5657991	5731439	5712267	5707444	5709948	5717108	5704181	5704109
pH	7,2	6,9	7,0	7,9	8,2	9,1	7,7	8,0
Leitfähigkeit (mS·cm ⁻¹)	1,0	1,6	2,6	1,4	1,4	3,3	35	10,2
O ₂ (mg·L ⁻¹)	4,8	4,7	6,1	7,3	7,4	13,0	12,5	10,8
DOC ^b (mg·L ⁻¹)	5,4	6,3	6,9	4,3	7,9	0,7	64,8	9,3
TOC ^b (mg·L ⁻¹)	5,9	7,5	9,2	n.b. ^c	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Chlorid ^b (mg·L ⁻¹)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	659	20800	2580
Sulfat ^b (mg·L ⁻¹)	250	520	1500	336	282	261	5330	1081
Kalzium ^b (mg·L ⁻¹)	144	238	n.b.	115	109	7,34	623	455
Magnesium ^b (mg·L ⁻¹)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,61	1229	313
Kalium ^b (mg·L ⁻¹)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1081	154
Natrium ^b (mg·L ⁻¹)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6069	876

^a Gauß-Krüger-Koordinaten (Bessel-Ellipsoid).

^b Mittelwerte von Dreifachbestimmungen, Standardabweichung < 3,5%.

^c n.b. - nicht bestimmt.

Die in Tabelle 3 angegebenen AQH und je ein Stamm des ubiquitär vorkommenden Schimmelpilzes *Epicoccum nigrum* Link sowie des fakultativ aquatischen Pilzes *Cylindrocarpon didymum* (Hartig) Wollenweber Stamm P10-10-3, ebenfalls isoliert aus aquatischen Habitaten, wurden aus der Stammsammlung des Dep. UMB des UFZ bezogen.

Aufgrund entsprechender Ergebnisse (Abschnitt 3.1.3) wird an dieser Stelle nur näher auf AQH-Stämme *Clavariopsis aquatica* WD(A)-00-1, *Varicosporium* sp. SpW08-1, und den mitosporen Pilz *Cylindrocarpon didymum* P10-10-3 eingegangen. Die Isolation von *C. aquatica* Stamm WD(A)-00-1 erfolgte aus dem mit Teeröl kontaminierten Bach "Steinbach" in der Nähe von Waldau (Standort WD(A); siehe Tabelle 2). Dazu wurden abgefallene Erlenblätter von *Alnus glutinosa* im Botanischen Garten der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg gesammelt und an der Luft getrocknet. Autoklavierte runde Blattstückchen (Ø 1,5 cm) wurden in Nylonnetze eingenäht (10 x 10 cm, 1 mm Maschenweite) und für vier Wochen in den Bach eingebracht (Juni 2001). Danach wurden die Blattstückchen (vier bis acht Stück) in Petrischalen mit sterilem *Aqua dest.* überführt und bei 10 °C inkubiert. Nach zwei bis sechs Tagen wurden die Petrischalen mit einem Stereomikroskop auf Konidiophoren hin untersucht. Um Reinkulturen zu erhalten, wurden einzelne Sporen mit einer Kapillarpipette gepickt und aseptisch auf die oben beschriebenen antibiotikahaltigen Agarplatten überführt. Die Arbeiten wurden von G. Krauss und B. Krause (beide Dep. UMB, UFZ) durchgeführt. *C. aquatica* wurde aufgrund seiner charakteristischen Sporenform von L. Marvanová (Tschechische Sammlung von Mikroorganismen, Masaryk Universität, Brno, Tschechische Republik) identifiziert.

Varicosporium sp. SpW08-1 wurde aus dem Bach „Spittelwasser“ nahe Jessnitz isoliert (Standort SpW; siehe Tabelle 2), welcher aufgrund früherer industrieller Aktivitäten in der Region Bitterfeld/Wolfen mit chlorierten Kohlenwasserstoffen kontaminiert ist. *C. didymum* P10-10-3 stammt aus einem Grundwasserbrunnen (Standort P10; siehe Tabelle 2) im früheren Kupferschieferbergbauggebiet Mansfelder Land. Dort enthält das Grundwasser hohe Konzentrationen verschiedener Schwermetalle (145). *Varicosporium* sp. SpW08-01 und *C. didymum* P10-10-3 wurden von Erlenblättern isoliert, die, wie bereits beschrieben, für vier Wochen an den entsprechenden Isolationsstandorten exponiert wurden. Diese Pilzstämmen wurden anhand ihrer charakteristischen Sporenformen von G. Krauss und L. Marvanová identifiziert.

Der Holz besiedelnde Basidiomycet *Trametes versicolor* (Linnaeus : Fries) Pilát DSM 11269 und der Streu zersetzende Pilz *Stropharia rugosoannulata* Farlow ex Murrill DSM 11372 wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig; DSMZ) bezogen. Zwei weitere Basidiomyceten, *Coriolopsis polyzona* (Persoon) Ryvarden MUCL 38443 und *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus : Fries) Murrill MUCL 38531, beides Weißfäulepilze, wurden von S. Vanhulle (Unité de Microbiologie, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgien; UCL) bereitgestellt. Der Weißfäulepilz *Hypholoma fasciculare* UHH 1-4-03 wurde, wie oben beschrieben, aus einem aquatischen Habitat isoliert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Stämme. Taxonomische Informationen sind gegeben, soweit bekannt.

Pilzstamm	Anzahl	Bezogen von / Isolationsstandort
Aquatische Hyphomyceten		
<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	2	UFZ ^a
<i>Anguillospora longissima</i> (Sacc. et Syd.) Ingold	2	UFZ ^a
<i>Clavariopsis aquatica</i> De Wild. WD(A)-00-01	1	UFZ ^a
<i>Clavariopsis aquatica</i> De Wild.	1	UFZ ^a
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	5	UFZ ^a
<i>Dimorphospora foliicola</i> Tubaki	1	UFZ ^a
<i>Flagellospora curvula</i> Ingold	1	UFZ ^a
<i>Heliscus lugdunensis</i> Sacc. et Thérry	12	UFZ ^a
<i>Lemonniera alabamensis</i> Sinclair et Morgan-Jones	1	UFZ ^a
<i>Lemonniera aquatica</i> De Wild.	2	UFZ ^a
<i>Tetracladium marchalianum</i> De Wild.	2	UFZ ^a
<i>Tetracladium setigerum</i> (Grove) Ingold	2	UFZ ^a
<i>Tricladium angulatum</i> Ingold	2	UFZ ^a
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	2	UFZ ^a
<i>Varicosporium</i> sp. SpW08-1	1	UFZ ^a
Andere mitospore aquatische Isolate		
<i>Alternaria</i> sp. Tt-S1	1	Tt (Teutschenthal)
<i>Coniothyrium</i> sp. KI-S5	1	KI (Kloschwitz)
<i>Cylindrocarpon didymum</i> (Hartig) Wollenweber P10-10-3	1	UFZ ^a
<i>Epicoccum nigrum</i> Link H9-06-L2	1	UFZ ^a
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-6-18-4	1	UHH 1 (Fluss Saale)
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4	1	UHH 1 (Fluss Saale)
<i>Phoma</i> sp. SaSe-B6	1	SaSe (Salziger See)
<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	1	UHH 5 (Fluss Saale)
Nicht identifizierte Isolate	86	KI, SaSe, Tt, UHH 1, UHH 5
Basidiomyceten (Weißfäule- bzw. Streu zersetzende Pilze)		
<i>Coriopsis polyzona</i> (Persoon) Ryvarden MUCL 38443	1	MUCL ^b
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Hudson : Fries) Kummer UHH 1-4-03	1	UFZ ^a
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (Linnaeus : Fries) Murrill MUCL 38531	1	MUCL ^b
<i>Stropharia rugosoannulata</i> Farlow ex Murrill DSM 11372	1	DSMZ ^c
<i>Trametes versicolor</i> (Linnaeus : Fries) Pilát DSM 11269	1	DSMZ ^c

^a Stammsammlung des Departments Umweltmikrobiologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Leipzig.

^b Mycothèque de L'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgien.

^c Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

Physiko-chemische Charakterisierung der Isolationsstandorte

Der pH-Wert und die Leitfähigkeit der Standortwässer (Tabelle 2) wurden direkt im Feld mit einem MultiLine P4 Taschenmultimeter (WTW, Weilheim) bestimmt. Wasserproben wurden bei 4 °C in sterilen braunen Glasflaschen ins Labor überführt. Für die Quantifizierung von Anionen und Kationen kamen ein ICS2000 und ein DX120 Ionenchromatograf zum Einsatz (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Gelöster organischer Kohlenstoff und gesamter organischer Kohlenstoff wurden nach dem deutschen Standard für die Untersuchung von Wasser, Abwasser

und Schlamm (DIN 38409 H3-1) an einem TOC-5050 Instrument (Shimadzu, Duisburg) bestimmt. Die Quantifizierung der Ionen und die Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes wurden von S. Köhler (Department Hydrogeologie, UFZ) durchgeführt. Alle Bestimmungen wurden dreifach ausgeführt, die Standardabweichungen der Mittelwerte waren kleiner als 3,5 %.

2.2. Kultivierung

Alle für die Kultivierung der Pilze erforderlichen Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, vor der Verwendung 20 min bei 1 bar Überdruck und 120 °C autoklaviert. Arbeitsgeräte aus Glas und Metall wurden 4 h bei 180 °C sterilisiert. Sterilfiltrationen erfolgten mit Spritzenvorsatzfiltern aus Zelluloseacetat (0,2 µm; Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2.1. Stammhaltung und -auswahl

Alle Stämme wurden als Agarplattenkultur (1 % ME und 1,5 % Agar-Agar) unter Lichtausschluss bei 14 °C gehalten. Vor der Testung auf Entfärbung in Mikrotiterplatten (siehe unten) und Verwendung in 10-L-Bioreaktoren (Abschnitt 2.2.4) betrug die Temperatur 28 °C. Für Isolate der Standorte Tt, Kl und SaSe wurde zum Gießen der Agarplatten filtriertes Standortwasser anstelle von *Aqua dest.* verwendet. Monatlich wurde ein etwa 1 cm² großes Agarstück vom Rand der Kolonie mit der bewachsenen Seite nach unten zeigend auf eine neue Agarplatte passagiert.

Stammscreening auf Agarplatten

Medium (1 % ME und 1,5 % Agar-Agar) wurde nach der Autoklavierung mit steril filtrierten Lösungen von *Reactive Blue 19* (RBu19) und *Reactive Black 5* (RBk5) versetzt (Endkonzentration 0,1 mM) und in Petrischalen gegossen. Für Isolate der Standorte Tt, Kl und SaSe wurden die Platten entsprechend mit filtriertem Standortwasser vorbereitet. Die Platten wurden mit einem Agarstück (1 cm²) vom Rand einer Agarplattenkultur beimpft und bei 14 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Agarplattenkulturen waren zum Zeitpunkt der Passage drei Wochen (zwei Wochen im Fall der Weißfäulepilze) alt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Agarplatten noch nicht vollständig bewachsen und es konnte davon ausgegangen werden, dass sich das Animpfmaterial aller Stämme im selben physiologischen Zustand befand. Die Entfärbung der Farbstoffe wurde anhand der Bildung von aufgehellten bzw. farblosen Zonen, unter dem und um das wachsende Myzel herum, über einen Zeitraum von 30 Tagen verfolgt. Die Versuche wurden in zwei Parallelen durchgeführt.

Stammscreening in Mikrotiterplatten

Die auf Basis der Entfärbungsversuche auf Agarplatten (Abschnitt 3.1.2) ausgewählten Pilzstämme wurden in 96-well Mikrotiterplatten mit Rundboden (Nunc, Neerijse, Belgien) kultiviert. Tyndallisierte Farbstoffe (1 h bei 60 °C, 24 h Intervall, drei Zyklen) wurden in zuvor autoklaviertem Flüssigmedium (2 % (w/v) ME) in den Konzentrationen 0,15, 0,3, 0,6 und 1,0 g·L⁻¹ gelöst. Die Kavitäten der Platten wurden mit 200 µL befüllt. Für jeden Pilzstamm, Farbstoff und jede Farbstoffkonzentration wurden vier Kavitäten mit einem Agarstück vom Rand einer Agarplattenkultur beimpft (3 mm Ø, Alter siehe vorheriger Abschnitt). Unbeimpfte Kavitäten dienten als Kontrollen. Vorangegangene Experimente mit sterilen Agarstücken

zeigten eine Entfärbung durch Eindiffusion in den Agar von weniger als 5 % innerhalb einer Woche für alle Farbstoffe (Daten nicht gezeigt). Inokulierte Mikrotiterplatten wurden bei 120 rpm und 28 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Diese Temperatur, welche häufig in Entfärbungsversuchen mit Weißfäulepilzen eingesetzt wird (124, 125), wurde gewählt, um vergleichbare Bedingungen für alle Stämme (insbesondere die verwendeten Weißfäulepilze) zu gewährleisten. Nach sieben Tagen wurden das Myzel sowie die Agarstücke entfernt und die Platten für 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Aliquots der Überstände wurden entsprechend verdünnt und in 96-well Flachbodenmikrotiterplatten (VWR, Darmstadt) zur Absorptionsbestimmung übertragen (Abschnitt 2.3.2). In einigen Fällen wurde eine hohe Variabilität in der Entfärbung von vier parallelen Kavitäten beobachtet. Für rund 71 % aller Proben war das 95%-Konfidenzintervall kleiner als 10 % (für 85,8 % aller Proben < 15 %). Zusätzlich wurde Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) verwendet, um eine verlässliche Basis für Vergleiche der Ergebnisse zu schaffen (Abschnitt 2.8).

2.2.2. Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben

Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben der Größen 100 mL, 250 mL und 1000 mL, welche mit Aluminiumfolie abgedeckt waren. Als Medium wurde 2 % (w/v) ME verwendet, soweit nicht anders angegeben.

100-mL-Kolben enthielten 37,5 mL Medium in den Experimenten zur Optimierung der Laccaseproduktion (Abschnitt 2.2.2.1) und 25 mL Medium in allen anderen Versuchen (siehe unten). 250-mL-Kolben enthielten 75 mL Medium (Abschnitt 2.2.3), 1000-mL-Kolben 500 mL Medium (Abschnitt 2.2.4). Gegeben sind in allen Fällen die Endvolumina nach Inokulation. Zur Inokulation wurden aus einer Agarplattenkultur (Abschnitt 2.2.1) mit Hilfe eines Korkbohrers (Ø 6 mm) bewachsene Agarstücke vom Rand der Kolonie ausgestanzt und in *Aqua dest.* (1 mL pro Stanzstück) homogenisiert (Ultraturrax T25 basic; IKA, Staufen). Zur Inokulation der 100-mL-Kolben wurden 0,5 mL, für die 250-mL-Kolben 1 mL und für die 1000-mL-Kolben 20 mL Homogenisat verwendet. Inkubiert wurde in einem Multitron Schüttelinkubator (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei 120 rpm und 14 °C unter Lichtausschluss bzw. auf Schütteln in einer auf 28 °C temperierten Kammer (Abschnitt 2.2.4).

Einfluss von anorganischen Ionen auf das Wachstum aquatischer Pilze

In Anlehnung an das Modellabwasser für Reaktivfarbstoffe (Tabelle 4) wurden sechs Medien (pH 10) mit unterschiedlichem Salzgehalt verwendet. Das Medium mit dem höchsten Salzgehalt enthielt 14 g·L⁻¹ Na₂SO₄, 4 g·L⁻¹ Na₂CO₃ und 0,4 g·L⁻¹ NaOH. Durch serielle Verdünnung (eins zu zwei) wurden die übrigen Lösungen erhalten. Diese Medien (25 mL in 100-mL-Erlenmeyerkolben) wurden in drei Parallelen mit den Stämmen UHH 5-1-03, Kl-S5, Tt-S1 und DSM 11269 inokuliert und anschließend für 14 Tage bei 14 °C und 120 rpm inkubiert. Nach Beendigung des Versuches wurden die Biotrockenmassen bestimmt (Abschnitt 2.3.1) und als Maß des Einflusses der anorganischen Ionen auf das Wachstum verwendet.

Entfärbungsversuche in Malzextraktmedium

Alle Lösungen, die Farbstoffe enthielten, wurden tyndallisiert verwendet (drei Zyklen, je 1 h bei 60 °C an drei aufeinanderfolgenden Tagen), um eventuellen Reaktionen der Farbstoffe während des Autoklavierens vorzubeugen. Die jeweils angegebenen spezifischen

Entfärbungsraten wurden auf Basis der gemessenen Entfärbungen (Abschnitt 2.3.3) und Biotrockenmassen (Abschnitt 2.3.1) bestimmt. Der Gesamtfehler wurde mithilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetzes nach Doerffel berechnet (Abschnitt 2.8).

Für Entfärbungsversuche von Einzelfarbstoffen bestand das Medium aus 2 % (w/v) ME, dem jeweils 500 μM (reinheitsberichtigt) der Farbstoffe *Acid Blue 62* (ABu62), RBU19, *Direct Blue 71* (DBu71) und *Acid Black 210* (ABk210) zugesetzt wurden. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und lag zwischen 5,5 und 5,8. Für jeden Stamm (UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1) wurden pro Farbstoff sechs Kolben angesetzt, drei von diesen Kolben wurden in regelmäßigen Abständen 0,5 mL Probe zur Absorptions- und Laccasebestimmung (Abschnitte 2.3.3 und 2.3.5) entnommen. Die restlichen drei Kolben wurden am Ende des Experimentes zur Biotrockenmassebestimmung verwendet. Zusätzlich wurden für jeden Farbstoff drei Kolben als nicht inokulierte Kontrolle und drei Kulturen jedes Pilzstammes ohne Farbstoffe mitgeführt.

Die Durchführung der Versuche zur Entfärbung von Einzelfarbstoffen unter Modellabwasserbedingungen (Abschnitt 3.2.2) erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, jedoch mit folgenden Erweiterungen: Zusätzlich zu 2 % (w/v) Malzextrakt und 500 μM des jeweiligen Farbstoffs enthielten die Medien unterschiedliche Mengen verschiedener Salze und Säuren (Tabelle 4). Diese wurden, den unterschiedlichen Applikationsklassen der Farbstoffe entsprechend, in Zusammenarbeit mit Industriepartnern identifiziert und den einzelnen Partnern des Projekts SOPHIED in Form eines standardisierten Protokolls zur Verfügung gestellt. Der Farbstoff RBU19 wurde vor Zubereitung des Mediums unter basischen Bedingungen (0,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH) 4 h bei 95 °C hydrolysiert.

Experimente zur Entfärbung von Modellabwässern mit Farbstoffgemischen mit ME (Abschnitt 3.2.3) wurden wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben durchgeführt, jedoch mit folgenden Modifikationen: Es wurden Modellabwässer verwendet, die mehrere Farbstoffe und unterschiedliche, den Applikationsklassen der Farbstoffe entsprechende Mengen an Salzen und Säuren enthielten (Tabelle 4). Reaktivfarbstoffe wurden vor der Verwendung hydrolysiert.

Entfärbungsversuche mit Kulturen ohne zusätzliche Nährstoffquelle

Alle Lösungen, die Farbstoffe enthielten, wurden durch Tyndallisation (drei Zyklen, je 1 h bei 60 °C an drei aufeinanderfolgenden Tagen) sterilisiert, um eventuellen Reaktionen der Farbstoffe während des Autoklavierens vorzubeugen.

Zur Vorbereitung wurden Flüssigkulturen der verwendeten Pilzstämme in 2 % ME, wie oben beschrieben, angesetzt und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase (14 Tage) inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand unter sterilen Bedingungen dekantiert und die Biomasse in Kolben überführt, die Farbstofflösungen enthielt (Abschnitte 3.2.4 und 3.2.5). Für jeden Stamm wurden jeweils jeder der vier Einzelfarbstoffe und die vier Modellabwässer verwendet, die keinen ME enthielten (Tabelle 4). Jede Variante wurde in drei Parallelen angesetzt. Nach Inkubation für sieben Tage und regelmäßiger Probenahme wurde der Kulturüberstand erneut dekantiert und durch frische Farbstofflösungen bzw. Modellabwässer ersetzt. Anschließend wurde für weitere 14 Tage inkubiert. Am Ende des Experimentes wurde die Biotrockenmasse bestimmt. Als Kontrollen dienten nicht inokulierte Kolben, die die entsprechenden Modellabwässer und Farbstoffe/Farbstoffkombinationen enthielten.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Modellabwässer, welche für Entfärbungsversuche eingesetzt wurden. Die angegebenen Salze, Säuren und pH-Werte wurden ebenfalls im Experiment zur Entfärbung von Einzelfarbstoffen unter Modellabwasserbedingungen verwendet. Zusätzlich enthielt jeder Kolben (100 mL mit 25 mL Modellabwasser) 2 % ME in den entsprechend angegebenen Experimenten. Die Lösungen wurden durch Tyndallisation sterilisiert.

Modellabwasser	Farbstoffe	Salz	pH	Base oder Säure
Saures Färbebad für Wolle	0,1 g·L ⁻¹ <i>Acid Blue 62</i>	2 g·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄	5	2 g·L ⁻¹ Essigsäure
	0,1 g·L ⁻¹ <i>Acid Yellow 49</i>			
	0,1 g·L ⁻¹ <i>Acid Red 266</i>			
Saures Färbebad für Leder	0,1 g·L ⁻¹ <i>Acid Black 210</i>		5	2 g·L ⁻¹ Ameisensäure
	0,1 g·L ⁻¹ <i>Acid Black 194</i>			
	0,1 g·L ⁻¹ <i>Acid Yellow 149</i>			
Reaktivfärbebad für Baumwolle	0,125 g·L ⁻¹ <i>Reactive Blue 222</i>	7 g·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄	10	2 g·L ⁻¹ NaOH
	0,125 g·L ⁻¹ <i>Reactive Red 195</i>			2 g·L ⁻¹ Na ₂ CO ₃
	0,125 g·L ⁻¹ <i>Reactive Yellow 145</i>			
	0,125 g·L ⁻¹ <i>Reactive Black 5</i>			
Direktfärbebad für Baumwolle	1 g·L ⁻¹ <i>Direct Blue 71</i>	5 g·L ⁻¹ NaCl	9	2 g·L ⁻¹ Na ₂ CO ₃
	1 g·L ⁻¹ <i>Direct Red 80</i>			
	1 g·L ⁻¹ <i>Direct Yellow 106</i>			

2.2.2.1. Optimierung der Laccaseproduktion

Es sollte die Eignung von RBU19 zur Anregung der Laccaseproduktion und von Tomatensaft (TS) als Medium getestet werden. Es wurde eine Kombination aus 1 mM Vanillinsäure und 50 µM CuSO₄ bzw. 600 mg·L⁻¹ RBU19 (jeweils Endkonzentration) steril filtriert vor der Inokulation zu Kolben mit Malzextraktmedium gegeben. TS wurde in einer Konzentration von 12,5 % (v/v) ohne weitere Zusätze als Medium verwendet (37,5 mL Endvolumen in 100 mL Kolben).

Um die Laccaseproduktion in den Stämmen KI-S5 und UHH 5-1-03 zu optimieren, wurde ein mehrfaktorielles, experimentelles Design mit drei Faktoren (TS-Konzentration, CuSO₄-Konzentration und RBU19-Konzentration) in drei Konzentrationen und einem Zentralpunkt gewählt. Zur Analyse wurde jeder Faktor als -1 (niedrigste Konzentration), 0 (Zentralpunkt) und +1 (maximale Konzentration) codiert (Formel 1).

$$\text{Codierung: } V_c = \frac{[V_n - V_0]}{\Delta V_n}$$

Formel 1

Dabei ist V_n die Konzentration, V_c stellt den codierten Wert dar und V_0 ist die Konzentration am Zentralpunkt. ΔV_n ist definiert als die Änderung von V_n , die einem Schritt von V_c entspricht. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Faktoren und deren Konzentrationen, die als Grundlage zur Erstellung der Versuchsmatrix dienten. Zur Einschätzung des Einflusses der unterschiedlichen Induktoren auf die Laccaseproduktion wurde eine *response surface* Methodik angewandt. Die statistischen Analysen wurden mit den Aktivitäten der Kulturen an Tag 5 (KI-S5) bzw. Tag 8 (UHH 5-1-03) unter Verwendung der Software Statistica 6.0 (SoftStat, Tulsa, OK, USA) von Dr. R. Parra und Prof. Dr. T. Keshavarz (University of Westminster, London, UK) durchgeführt.

Die Substanzen wurden steril filtriert vor der Inokulation zu den Kolben gegeben.

2.2.3. Flüssigkulturen in Rührkesselreaktoren

Kultivierungen mit dem Fermenter Biostat MD (Braun Biotech International, Melsungen) wurden zur Laccaseproduktion mit dem Stamm UHH 5-1-03 verwendet (Abschnitt 2.4). Des Weiteren wurde mit dem Fermenter die Übertragbarkeit der optimierten Laccaseproduktionsbedingungen für die Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 überprüft (Abschnitt 2.2.2.1). Die Kultivierung erfolgte in allen Fällen bei 14 °C, einer Rührgeschwindigkeit von 120 rpm und natürlichen Lichtbedingungen. Zu Beginn jedes Laufes wurden einige Tropfen eines Antischaummittels zugegeben (LAB Silikonentschäumer). Inokuliert wurde mit 100 mL einer homogenisierten Flüssigkultur, die sich in der stationären Phase befand (Abschnitt 2.2.2). Die Ausstattung des Fermenters in Verbindung mit der zugehörigen Software ermöglichte eine kontinuierliche Aufzeichnung des pH-Wertes. Werte für Laccaseaktivität (Abschnitt 2.3.5) wurden nach Probenahme gewonnen. Das entnommene Probevolumen wurde durch Medium ersetzt.

Die Produktion von Laccase des Stammes UHH 5-1-03 für die Reinigung und Enzymcharakterisierung erfolgte als *batch*-Kultur in einem 5-L-Kulturgefäß, welches mit einem sterilen Luftstrom von 2,0 L·min⁻¹ begast wurde. Als Medium wurde 2 % (w/v) ME verwendet (5 L Endvolumen). Die Laccaseproduktion wurde durch die Zugabe von 50 µM CuSO₄ und 1 mM Vanillinsäure (Endkonzentration, steril filtriert) zu Beginn der Trophophase (Tag 3) angeregt. Die Kulturen wurden jeweils nach Erreichen der höchsten bzw. Stagnieren der Enzymaktivität geerntet.

Fermentationen zur Überprüfung der Übertragbarkeit der optimierten Laccaseproduktionsbedingungen erfolgten als *batch*-Kultur in einem 2-L-Kulturgefäß, welches mit einem sterilen Luftstrom von 1,0 L·min⁻¹ begast wurde. Verwendet wurden 30 % (v/v) TS (autoklaviert) als Medium und eine Induktorkombination von 450 mg·L⁻¹ RBU19 sowie 50 µM (UHH 5-1-03) bzw. 250 µM (KI-S5) Kupfersulfat (Abschnitt 3.5.2). Kupfersulfat und RBU19 wurden steril filtriert zugegeben.

Tabelle 5: Experimentelle Bedingungen (natürliche und codierte Faktoren des Versuchsdesigns) sowie gemessene und berechnete Mittelwerte der Laccaseaktivität^a für die Stämme KI-S5 (Tag 5) und UHH 5-1-03 (Tag 8) zur Optimierung der Laccaseproduktion.

Ansatznummer	Faktoren						Laccaseaktivitäten (U·L ⁻¹)			
	Tomatensaft		CuSO ₄		RBU19		UHH 5-1-03		KI-S5	
	(% [v/v])	Codiert	(µM)	Codiert	(mg·L ⁻¹)	Codiert	Gemessen	Berechnet	Gemessen	Berechnet
T1	10	-1	50	-1	150	-1	958,18	912,24	7,02	13,84
T2	10	-1	50	-1	450	+1	3370,80	3416,76	24,43	17,61
T3	10	-1	250	+1	150	-1	1100,00	1145,93	989,20	982,38
T4	10	-1	250	+1	450	+1	2619,90	2573,96	2233,8	2240,62
T5 (ZP ^b)	20	0	150	0	300	0	3774,36	3802,13	723,69	552,11
T5 (ZP)	20	0	150	0	300	0	3616,97	3802,13	465,74	552,11
T5 (ZP)	20	0	150	0	300	0	4015,05	3802,13	466,90	552,11
T6	30	+1	50	-1	150	-1	477,94	523,87	31,17	24,35
T7	30	+1	50	-1	450	+1	6179,67	6133,72	1648,84	1655,67
T8	30	+1	250	+1	150	-1	708,32	662,38	56,94	63,77
T9	30	+1	250	+1	450	+1	5149,80	5195,73	2956,40	2949,58

^a Mittelwerte von drei Parallelen.

^b Zentralpunkt.

2.2.4. Flüssigkulturen in Bioreaktoren im Labormaßstab

Die Untersuchungen zur Entfärbung von RBU19 in *airlift*-Reaktoren mit innerem Umlauf wurden in Zusammenarbeit mit J. Neumann (Bachelorstudent des Dep. UMB, UFZ) durchgeführt.

Entfärbung von *Reactive Blue 19* in *airlift*-Reaktoren mit innerem Umlauf

Für die ersten Experimente mit immobilisierten Zellen wurde ein Bioreaktor im Labormaßstab, basierend auf dem *airlift*-Prinzip mit innerem Umlauf, verwendet. Bei diesem Reaktortyp wird die Luft mit einem unter dem Leitzylinder angebrachten Luftverteiler zugeführt, was zu einer gleichgerichteten Strömung beider Phasen im Leitzylinder führt. Durch die Ringfläche fließt die gasarme Flüssigkeit wieder abwärts (Abbildung 7). Verteilung und Dispersion der zugeführten Luft erzeugen dabei einen intensiven Flüssigkeitsstrom (194). Die Reaktoren wurden mit dem Pilzstamm UHH 5-1-03 inokuliert, welcher auf kommerziell erhältlichem Dunstabzugshaubenfiltermaterial (OBI Baumarktgruppe, Wermelskirchen; Matten mit einer Dicke von rund 1 cm) immobilisiert war.

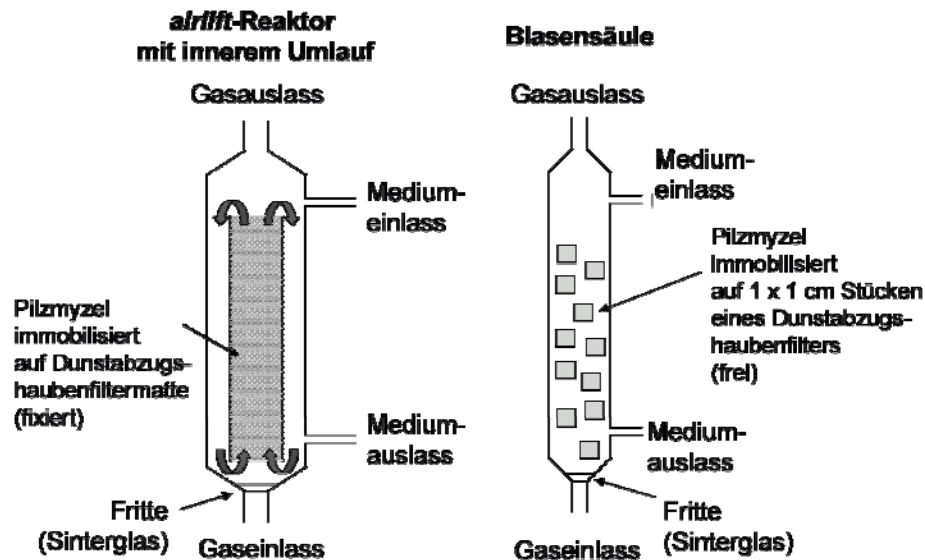


Abbildung 7: Schema von Bioreaktoren im Labormaßstab für Entfärbungsexperimente und die Optimierung des Prozessdesigns.

Für die Immobilisierung wurde der Stamm UHH 5-1-03 in Erlenmeyerkolben, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, angezogen. Nach 14-tägiger Inkubation wurde der Inhalt der Kolben homogenisiert (Abschnitt 2.2.2) und in rechteckige Plastikbehälter, welche rechteckige Stücke der Filtermatten (8 x 11 cm, Abbildung 22) enthielten, überführt. Das Filtermaterial wurde zuvor durch intensives Spülen mit *Aqua dest.* gereinigt und durch Autoklavieren sterilisiert. Anschließend wurden die Behälter mit 2 % Malzextraktmedium aufgefüllt, sodass die Flüssigkeit die Filtermatten bedeckte. Nach 14-tägiger Inkubation bei 14 °C und 120 rpm wurden die Filter unter sterilen Bedingungen durch Pressen von verbliebenem Medium befreit, in eine zylindrische Form gerollt und in die Reaktoren eingebracht. Dabei wurde ein mittlerer Kanal für die Durchströmung im Reaktor bewahrt.

Im ersten Experiment wurde eine Biotrockenmasse von 0,78 g auf dem Filterstück immobilisiert, wie durch Auswaage eines parallel mitgeführten und nicht für die Reaktoren verwendeten Ansatzes bestimmt wurde. Nach Bestückung des zuvor autoklavierten Reaktors

mit dem bewachsenen Filter wurde dieser mit tyndallisierter Farbstofflösung befüllt. Diese enthielt $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19 (hydrolysiert) und $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 bei pH 10, um realitätsnahe Bedingungen für die Entfärbung zu gewährleisten. Der Reaktor wurde im *repeated batch mode* betrieben, nach Abschluss eines Entfärbungszyklus wurde die gesamte Farbstofflösung im Reaktor durch frische Lösung ausgetauscht (Intervalle siehe Abbildung 23). Belüftet wurde der Reaktor mit 10 L steriler Luft pro Stunde, durch einen Kühlmantel wurde die Temperatur konstant bei 14 °C gehalten.

Vergleich verschiedener Prozessdesigns in Reaktoren im Labormaßstab

In einem weiteren Experiment sollten Erfolg versprechende Strategien für eine zukünftige Maßstabsvergrößerung identifiziert werden. Dabei wurden die Entfärbungsleistungen verglichen, welche mit unterschiedlichen Prozessdesigns erreicht wurden. Um eine bessere Durchmischung und damit einen erhöhten Massentransfer in den Bioreaktoren zu erreichen, wurde der Stamm UHH 5-1-03 dafür auf kleinen Stücken des Filtermaterials (1 x 1 cm) immobilisiert und die Entfärbungen in einfachen Blasensäulen mit dem zuvor beschriebenen *airlift*-Reaktor verglichen. Zusätzlich zu immobilisiertem Myzel wurde nicht immobilisierte Biomasse in einer Blasensäule eingesetzt. Die Blasensäulen wurden verwendet, um im Falle einer Maßstabsvergrößerung die potenziellen Gerätekosten so gering wie möglich zu halten. DBu71 wurde als Modellfarbstoff in einer Konzentration von $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ unter den Bedingungen des Direktfärbekolbens für Baumwolle eingesetzt (Tabelle 4). Die erhöhte Konzentration des Farbstoffs unter diesen Bedingungen sollte Unterschiede der Entfärbungsleistung zwischen den Prozessdesigns deutlicher hervortreten lassen.

Für die Immobilisierung von Stamm UHH 5-1-03 wurden Streifen (8 x 1 cm) des zuvor intensiv mit *Aqua dest.* gespülten und autoklavierten Filtermaterials mit einer homogenisierten Flüssigkultur beimpft (5 mL), mit 2 % Malzextraktmedium aufgefüllt und 14 Tage bei 120 rpm und 14 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die bewachsenen Filterstücke unter sterilen Bedingungen in 1 x 1 cm Quadrate geschnitten und die Blasensäule mit 80 dieser Stücke beschickt.

Für die Verwendung von freier Biomasse in Blasensäulen wurden Pilzkulturen in 250-mL-Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 75 mL 2 % (w/v) ME, angezogen. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (14 Tage) wurde das Malzextraktmedium dekantiert und die verbleibende Biomasse unter sterilen Bedingungen in die Blasensäule überführt.

Die Entfärbung von DBu71 unter Modellabwasserbedingungen und ein Teil der Entfärbungsexperimente mit dem sauren Modellabwasser für Wolle wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Bioreaktoren und alle benötigten Schläuche und Verbindungen vor der Verwendung autoklaviert, die Biomasse wurde unter sterilen Bedingungen zugegeben, die Farbstofflösungen wurden vor der Verwendung tyndallisiert und das Nachfüllen sowie Beprobieren geschah unter sterilen Bedingungen. Am Gaseinlass und -auslass befanden sich Sterilfilter (0,45 µm). Die Bioreaktoren wurden mit $10 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ Luft begast und bei Raumtemperatur betrieben.

Maßstabsvergrößerung des *airlift*-Reaktors auf den 10-L-Maßstab

In einem weiteren Schritt wurde eine kombinierte Version beider zuvor getesteter Reaktoren mit immobilisierter Biomasse während eines dreiwöchigen Gastaufenthaltes bei dem Unternehmen Wetlands Engineering SPRL (Louvain-la-Neuve, Belgien) entworfen und

getestet. Mit diesem Reaktor wurde im 10-L-Maßstab das saure Modellabwasser für Wolle behandelt (Tabelle 4). Die Kartusche (Ø 6 cm, Höhe 30 cm), welche das immobilisierte Myzel enthielt, und das Belüftungsrohr war aus Aluminium gefertigt (Abbildung 8). Der Durchmesser und die Höhe wurden so gewählt, dass die Kartusche in eine 10-L-Polypropylenflasche mit Schraubverschluss (Nalgene Labware, Neerijse, Belgien) passte. In diese Kartusche wurden kleine Stücke (1 cm³) des Filtermaterials mit immobilisiertem Pilzmyzel eingebracht. Die Filterstücke befanden sich dabei zwischen zwei Sieben, um eine Belüftung der Kartusche und eine Zirkulation des Modellabwassers zu gewährleisten (Abbildung 8).

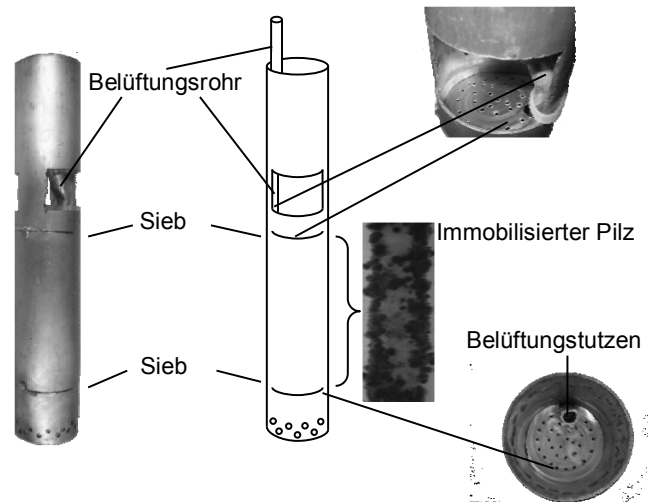


Abbildung 8: Schema der Kartusche zur Behandlung des sauren Modellabwassers für Wolle im 10-L-Maßstab. Die dargestellte Kartusche wurde in einer 10-L-Nalgene-Plastikflasche verwendet.

Um die Immobilisierung des Pilzes auf dem Filtermaterial weiter zu vereinfachen, wurden 1-L-Erlenmeyerkolben (500 mL 2 % (w/v) ME Endvolumen), welche die geschnittenen und gewaschenen Filterstücke enthielten, mit Stamm UHH 5-1-03 beimpft (vgl. Abschnitt 2.2.2). Nach 14-tägiger Inkubation bei 28 °C und 120 rpm wurde ein gleichmäßiger und vollständiger Bewuchs der Filterstücke erreicht. Anschließend wurden die Filterstücke ausgepresst und in die Kartusche überführt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und niedrigen Belüftungsraten (Druckluft). Dem Medium wurden, um Schaumbildung zu vermeiden, einige Tropfen Silikonentschäumer zugesetzt. Proben wurden täglich genommen und die Entfärbung (Abschnitt 2.3.3), der chemische Sauerstoffbedarf (CSB, Abschnitt 2.3.4) und der pH-Wert bestimmt. Das gesamte Experiment wurde unter unsterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Bestimmung von Biotrockenmassen

Für die Bestimmung der Trockenmassen von Flüssigkulturen wurden Papierfilter No. 1 (Whatman, Maidstone, UK) 24 h bei 80 °C getrocknet, im Exsikkator über Blaugel bis auf Raumtemperatur abgekühlt und gewogen. Über diese Filter wurde jeweils der Inhalt eines Erlenmeyerkolbens abgesaugt und mit ca. 50 ml A. dest. gewaschen, erneut 24 h bei 80 °C getrocknet, abgekühlt und das Trockengewicht bestimmt.

Für Biomasse, die auf Dunstabzugshaubenfiltern immobilisiert war (Abschnitt 2.2.4), wurde das zuvor bestimmte Trockengewicht des Filtermaterials nach Waschung der Filter mit immobilisierter Biomasse (150 mL *Aqua dest.*), nachfolgender Trocknung und Gewichtsbestimmung subtrahiert, um die immobilisierte Biotrockenmasse zu erhalten.

2.3.2. Absorptionsmessungen

Absorptionsmessungen bei definierten Wellenlängen wurden nach den Entfärbungsversuchen in Mikrotiterplatten (Abschnitt 2.2.1), den Entfärbungsversuchen mit gereinigter Laccase aus Stamm UHH 5-1-03 (Abschnitt 2.6.2) und den Experimenten zur Entfärbung von Einzelfarbstoffen in Bioreaktoren durchgeführt (Abschnitt 2.2.4). Vor den Messungen wurden die Proben 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert, um eventuell enthaltene Partikel von der Lösung abzutrennen. Zur Messung wurde für jeden Farbstoff die Wellenlänge der maximalen Absorption gewählt. Absorptionsmessungen wurden nach entsprechender Verdünnung in 96-well Mikrotiterplatten mit flachem Boden an einem GENios+ Mikrotiterplattenreader (Tecan, Crailsheim) bei den Wellenlängen 405 nm (*Disperse Yellow 3*, DsY3; *Reactive Yellow 81*, RY 81), 492 nm (*Disperse Red 1*, DsR1; *Direct Red 28*, DrR28), 520 nm (*Acid Red 299*, AR299; *Reactive Red 4*, RR4), 590 nm (ABk210; ABu62; RBu19; RBk5; *Direct Black 38*, DrBk38; DBu71), 600 nm (*Disperse Blue 1*, DsBu1), and 620 nm (*Direct Blue 1*, DrBu1) durchgeführt. Die Änderung der Absorption wurde als Prozent der Kontrolle nach Formel 2 ausgedrückt:

$$\Delta\text{Abs} = (\text{Abs}_C - \text{Abs}_A) / \text{Abs}_C \times 100$$

Formel 2

Dabei stellen Abs_C und Abs_A die Absorptionen der Kontrolle bzw. der Probe dar. Im Falle der Experimente in Bioreaktoren diente die initiale Absorption des jeweiligen Zyklus als Abs_C .

2.3.3. Aufnahme von Spektren

Die Proben wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde mit *Aqua dest.* verdünnt, um eine maximale Absorption von eins nicht zu überschreiten und in UV-Mikroküvetten (Brand, Wertheim) vermessen. Die Absorption von eins war die gerätebedingte maximale Absorption, bis zu der ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Als Referenz dienten Küvetten mit *Aqua dest.*

Zur Aufnahme der Spektren der behandelten Farbstofflösungen der Entfärbungsversuche in Mikrotiterplatten (Abschnitt 2.2.1) wurden die vier entsprechenden Kavitäten mit einer Farbstoffkonzentration von 1 g·L⁻¹ vereinigt. Die Lösungen wurden in einem Wellenlängenbereich von 325 – 750 nm an einem Hitachi U-2001 Zweistrahlenspektrofotometer (Schaumburg, IL, USA) vermessen und mit den Spektren der entsprechenden Kontrollen verglichen. Ebenso wurde mit den Proben des Entfärbungsversuches mit gereinigter Laccase verfahren (Abschnitt 2.6.2)

In allen Versuchen zur Entfärbung von Farbstoffen in Erlenmeyerkolben und Bioreaktoren (Abschnitte 2.2.2 und 2.2.4) wurden Spektren in einem Bereich von 380 – 740 nm an einem

Spektrofotometer Cary 400 Scan (Varian, Darmstadt) aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden mithilfe der Software Origin V 7.5 (Originlab Corp., Northampton, MA, USA) integriert. Die erhaltene Fläche diente als Maß der Färbung der Lösung.

2.3.4. Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs

Zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) wurden die Proben (Abschnitte 2.2.2 und 2.2.4) mit Schwefelsäure angesäuert (ein Tropfen pro mL Probe) und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Die CSB-Bestimmungen wurden mit dem COD HR Reagenz (Hanna Instruments, Szeged, Ungarn), einem Eco 16 Thermoreaktor (VELP Scientifica, Mailand, Italien) und einem C214 Mehrparametertischfotometer (Hanna Instruments) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das Protokoll erfüllte die EPA 410.4-Standards (*US Environmental Protection Agency*, Umweltschutzbehörde der USA).

2.3.5. Aktivitätsbestimmungen von Enzymen

Alle Enzymaktivitätsbestimmungen wurden von mindestens vier Parallelen in Mikrotiterplatten mit flachem Boden (VWR, Darmstadt) an einem Mikrotiterplattenreader SLT Spectra (Tecan), welcher mit den entsprechenden Absorptionsfiltern bestückt war, unter Verwendung der mitgelieferten Software EasyWIN Kinetics V 6.1 durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 0,5 mL der zu vermessenden Lösung 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert.

Laccase

Die Bestimmung von Laccaseaktivitäten fand mit 3 mM ABTS als Substrat in McIlvaine-Puffer (pH 4,0) statt (173). Für dessen Herstellung wurde 0,1 M Zitronensäure vorgelegt und der pH-Wert mit 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung eingestellt. Der Reaktionsansatz zur Bestimmung der Laccaseaktivität mit einem Gesamtvolumen von 200 µL setzte sich wie folgt zusammen:

160 µL	McIlvaine-Puffer (pH 4,0)
20 µL	ABTS-Lösung (30 mM)
20 µL	Probe

Der Referenzansatz zur Bestimmung des Nullwertes enthielt statt der enzymhaltigen Probe 20 µL des Puffers. Die Extinktionen wurden 30 min bei Raumtemperatur in Intervallen von 2 min bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Die Änderung der Extinktion über der Zeit stellt die Basis für die Berechnung der Enzymaktivität nach Formel 3 dar:

$$\text{Enzymaktivität (U} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\epsilon \cdot d \cdot v}{\Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot V}$$

$\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ (min ⁻¹)	Extinktionsänderung pro Minute
V (mL)	Volumen des Messansatzes
v (mL)	Volumen der Probe im Messansatz
ϵ (µM ⁻¹ ·cm ⁻¹)	spezifischer Extinktionskoeffizient
	$\epsilon_{420\text{nm}} \text{ ABTS} = 0,36 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (160)
d (cm)	durchstrahlte Schichtdicke

Formel 3

Wie sich aus dieser Gleichung herleiten lässt, ist die Einheit der Enzymaktivität (U) definiert als ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), wobei sich die Stoffmenge auf das gebildete Produkt bezieht.

Peroxidasen

LiP-Aktivität wurde wie die Laccaseaktivität bestimmt, der Reaktionsansatz enthielt jedoch zusätzlich 50 μM H_2O_2 . MnP-Aktivität wurde in 50 mM Natriummalonatpuffer mit 0,2 mM MnSO_4 und 100 μM H_2O_2 bei pH 4 bestimmt. Dazu wurde die Absorptionszunahme bei 270 nm durch die Bildung von Malonat- Mn^{3+} -Komplexen ($\epsilon_{270\text{nm}} = 11,59 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) verfolgt (236). Alle anderen Bedingungen waren analog zur Laccaseaktivitätsbestimmung.

Tyrosinase

Die Oxidation von Tyrosin wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5), welcher 0,1 mM Tyrosin enthielt, bestimmt (23). Die Berechnungen und Messungen erfolgten, wie für ABTS angegeben.

2.3.6. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit dem *BCA protein kit* (Novagen, Darmstadt) durchgeführt, welcher auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} und anschließender Komplexierung mit Bicinchoninsäure (247) basiert. Dieser Komplex wurde bei 560 nm fotometrisch zur Bestimmung des Proteingehaltes an einem GENios+ Mikrotiterplattenreader verwendet. Die Messungen wurden nach dem Protokoll des Herstellers für *microassays* und Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt.

2.3.7. Massenspektrometrische Untersuchungen von Farbstoffen

Alle Proben (500 μL) wurden vor der Analyse filtriert (0,2 μm Spritzenvorsatzfilter) und bis zur Trockne an einem Büchi Syncore Polyvap System (Büchi Labortechnik GmbH, Essen) bei einem Vakuum von 50 mbar, 40 °C und 180 rpm eingengt. Der Rückstand wurde in 100 μL einer Lösung aus 100 mM Ammoniumacetat und 10 % (v/v) Acetonitril aufgenommen.

Zur Detektion und Identifizierung der Metaboliten in behandelten Farbstofflösungen (Abschnitt 2.2.2, jeweils Proben von Tag 7; Abschnitt 2.6.2) kam ein AB Sciex 4000 Q-Trap ESI-MS/MS (Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometer) zum Einsatz (Applied Biosystems/Sciex, Darmstadt). Dieses war mit einem Triple-Quadrupol-Massenanalysator mit linearer Ionenfalle ausgestattet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Analyst V 1.4.2 (Applied Biosystems).

Qualitative Untersuchungen behandelter Farbstofflösungen

Vor der massenspektrometrischen Untersuchung behandelter Farbstofflösungen wurden diese mit HPLC (*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) aufgetrennt (1100 Agilent Series, Agilent, Waldbronn: Autosampler, Säulenofen, binäre Pumpe; gekoppelt mit der Q-Trap). Die Säule war eine LiChrospher C18, RP select B, 125 x 4 mm, 5 μm (Merck), die bei einer Temperatur von 40 °C verwendet wurde. Injiziert wurden 8 μL Probe, aufgetrennt wurde bei einer Flussrate von 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit 100 mM Ammoniumacetat + 10 % (v/v) Acetonitril (Eluent A) und 100 % Acetonitril (Eluent B). Der Elutionsgradient begann mit 100 % Eluent A, welcher für zwei

Minuten konstant gehalten wurde. Darauf folgte ein linearer Anstieg auf 50 % Eluent B innerhalb von acht Minuten. In weiteren fünf Minuten wurde die Konzentration von Eluent B auf 90 % gesteigert. Diese Konzentration wurde für zwei Minuten konstant gehalten, um danach innerhalb von drei Minuten auf 100 % Eluent A zu wechseln. Diese Eluentkonzentration wurde für weitere fünf Minuten gehalten.

Zur Messung im Massenspektrometer wurde die IDA (*information dependent acquisition*, informationsabhängige Aufnahme) angewandt. Ein IDA-Experiment besteht aus 2 Teilen. Tritt ein im ersten Teil (*survey scan*) definiertes Ereignis ein, wird der Messmodus für den zweiten Teil (*dependent scan*) geändert, um anschließend wieder zur ursprünglichen Methode zurückzukehren. Die Kriterien für den *survey scan* waren: nur Peaks mit einer Masse zwischen 200 und 1000 amu und einer Intensität höher als 5000 cps (*counts per second*, Zählungen pro Sekunde). Es wurde ein erweitertes (*enhanced*) Massenspektrum (200-800 amu) im negativen Modus unter Einbeziehung der Ionenfalle mit dynamischer Füllzeit aufgenommen. Weitere Parameter sind in Tabelle 6 vermerkt. Der *dependent scan* war ein erweiterter Produktionscan (*enhanced product ion scan*) in einem Massenbereich von 300-800 amu. Die Ionenfalle akkumulierte 25 ms bei einer Scanrate von 1000 amu·s⁻¹. Weitere Parameter sind in Tabelle 6 vermerkt. Anhand der in diesem Scan erhaltenen Fragmente wurden Strukturen für die Metaboliten abgeleitet.

Tabelle 6: Verwendete Geräteeinstellungen (ESI und MS) zur Quantifizierung (MRM) und Detektion von Metaboliten (*enhanced MS-Scan* & *enhanced product ion scan*). MRM - *multiple reaction mode*.

Bedingungen	MRM-Scan				<i>Enhanced MS-Scan</i> (<i>Survey scan</i>)	<i>Enhanced product ion scan</i> (<i>Dependent scan</i>)
	ABu62	RBu19	DBu71	ABk210		
Übergänge (amu)	399/335/316	603/483/97	320/130/80	429/284/164		
Vorhanggas (psi)	10	12	15	15	10	20
Nadelspannung (V)	-4000	-3000	-3500	-4500	-3500	-3000
Nadeltemperatur (°C)	350	450	450	500	550	550
<i>Declustering potential</i> (V)	-110	-110	-70	-95	-70	-70
<i>Entrance potential</i> (V)	-10	-12	-10	-10		
<i>Collision energy</i> (V)	-30	-106	-56	-28	-10	-40
<i>Collision cell exit potential</i> (V)	-20	-17	-11	-17		

Quantitative Untersuchungen behandelter Farbstofflösungen

Die Proben (siehe Abschnitt 2.2.2, 2.6.2) wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben behandelt, allerdings wurde zur Wiederaufnahme der eingengten Proben ein Gemisch aus je 50 % Eluent A und Eluent B verwendet. Die Proben wurden durch *flow injection analysis* (FIA, direkte Injektion von 8 µL, 500 µL·min⁻¹ Fluss, 50 % Eluent A) in die Q-Trap mit einem MRM-Scan (*multiple reaction mode*) vermessen (30 s Aufnahmezeit). Die für die einzelnen Farbstoffe

verwendeten, notwendigen und hinreichenden Massenübergänge sowie spezifische Messparameter sind in Tabelle 6 gegeben.

2.4. Reinigung der Laccase aus *Phoma* sp. UHH 5-1-03

Zellfreier Kulturüberstand wurde durch Filtration über No.1 Zellulosefilter (Whatman) erhalten (Abschnitt 2.2.3). Die dabei abgetrennte Biomasse wurde für die Isolation von Nukleinsäuren verwendet (Abschnitt 2.7.1). Der Kulturüberstand wurde durch Ultrafiltration (Ultrasette, 10 kDa Ausschlussgrenze; Pall Filtron, East Hills, NY, USA) aufkonzentriert und mit 10 mM Natriumacetat (NaAc, pH 5,0) gepuffert. Für die Reinigung fand ein BioLogic HR Chromatographiesystem (Bio-Rad, München) Anwendung. Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC) wurde mit einer HiTrap Phenyl HP Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bei einem Fluss von $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Elution startete mit drei Minuten 10 mM NaAc-Puffer (pH 5,0), welcher Ammoniumsulfat (60 % Sättigung) enthielt. Daran schloss sich ein linearer Anstieg über 20 Minuten auf 100 % NaAc (pH 5,0) an. Diese Konzentration wurde für 15 min konstant gehalten, um anschließend wieder auf 100 % des Ausgangseluenten zu wechseln, dessen Konzentration für weitere sieben Minuten konstant gehalten wurde. Die Fraktionen, welche den Hauptteil der Laccaseaktivität enthielten, wurden vereinigt und auf eine Superdex 200 GL Gelfiltrationssäule (300 x 10 mm; Amersham Biosciences, Amersham, UK) aufgetragen. Die Laccase wurde mit 10 mM NaAc-Puffer (pH 5,0) mit einem Fluss von $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ eluiert. Phenylmethylsulfonylfluorid (20 μM ; Roth, Karlsruhe) wurde den laccasehaltigen Proben nach der Ultrafiltration und beiden chromatografischen Schritten hinzugefügt.

2.5. Strukturelle Charakterisierung der Laccase

2.5.1. Gelelektrophoresen

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden nach Laemmli (148) unter Verwendung von Minigelen (0,75 mm Dicke) durchgeführt, die aus einem 7,5%-igen Sammelgel (pH 6,8) und einem 10%-igen Trenngel (pH 8,8) bestanden. Dazu wurden 30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (37,5 : 1), 0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-Puffer (pH 6,8; TRIS-HCl), 1,5 M TRIS-HCl-Puffer (pH 8,8), Natriumdodecylsulfat (SDS), Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Der Elektrophoresepuffer wurde aus 10-fach konzentriertem TRIS-Glycin-SDS-Puffer hergestellt. Alle Chemikalien wurden von Bio-Rad bezogen. Eine Spannung von 50 V wurde angelegt, bis die Bromphenolblaufront das Trenngel erreicht hatte. Die Trennung dauerte etwa 30 min bei einer Spannung von 200 V und wurde in einer Mini-PROTEAN-3-Kammer (Bio-Rad) durchgeführt. Die Probenaufbereitung erfolgte durch Vermischung von einem Teil Probe mit zwei Teilen Probenpuffer und 5-minütigem Erhitzen auf 95 °C. Der Probenpuffer bestand aus 62,5 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 6,8), 25 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoethanol, 2 % SDS und 0,01 % Bromphenolblau in *Aqua bidest*. Eine sensitive Proteinfärbung der Gele erfolgte in einer kolloidalen Lösung, welche 0,1 % Coomassie Brilliant Blau G-250, 2 % Phosphorsäure und 0,76 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthielt (184). Auf Basis der

mitgeführten Molmassenstandards (*silver stain SDS high molecular weight standard mixture*) konnte eine Eichgerade erstellt werden, die die Beziehung zwischen relativer Wanderungsstrecke im Gel und den Molmassen der aufgetrennten Proteine herstellte. Diese wurde zur Ermittlung der Molmassen von Proteinbanden aus Enzymproben verwendet.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen (Native PAGE) wurde eingesetzt, um laccaseaktive Banden zu identifizieren. Die Native PAGE wurde analog zur SDS-PAGE durchgeführt. Abweichend davon enthielt das Gel kein SDS und der Probenpuffer kein SDS und 2-Mercaptoethanol. Die Proben und die Standards wurden nicht erhitzt. Die Aktivitätsfärbung der Gele fand in McIlvaine-Puffer (pH 4,0, Abschnitt 2.3.5) mit 3 mM ABTS statt. Die Molmassenstandards wurden vor der Aktivitätsfärbung vom Gel abgetrennt und separat mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dies war nötig, da nach einer Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau keine Aktivitätsfärbung mit ABTS mehr möglich ist (105).

Der Anti-Laccase-Antikörper LccCbr2 wurde auf Basis von Peptiden der in Laccasen konservierten Kupferbindungsstelle II (cbr, *copper binding region*) erstellt. Die für die Immunisierung verwendete Peptidsequenz enthielt zehn konservierte Aminosäuren. Insgesamt wurden vier verschiedene Peptide mit jeweils elf Aminosäuren (CGTYWYHSHLS, CGTYWYHSHFS, CGTFWYHSHLS, CGTFWYHSHFS) auf Basis einer *in silico* Studie bekannter Laccasen entworfen. Die synthetisierten Peptide wurden über den N-terminalen Cysteinrest mit Keyhole-Limpet-Hämocyanin (Pineda, Berlin) konjugiert. Eine Mischung dieser Konjugate, die alle Peptide enthielt, wurde in Kaninchen zur Immunisierung eingesetzt. Die Kaninchenserum, welche die Antikörper enthielten, wurden 61 Tage nach der ersten Immunisierung gewonnen (127). Die Detektion von Laccasebanden mit dem spezifischen Antikörper LccCbr2 in einem SDS-Gel erfolgte durch Nico Jehmlich (Dep. Proteomics, UFZ), wie zuvor durch Kellner *et al.* beschrieben (127), unter Verwendung der *PageRuler unstained protein ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot).

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde ein Multiphor II Gelelektrophoresesystem (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) in Verbindung mit Servalyt Precotes 3-10 Gelen (Serva, Heidelberg) und den *liquid mix* 3-10 IEF Markern (Serva) verwendet. Die gereinigte Laccase wurde mit 5000 V·h bei 10 °C fokussiert. Anschließend wurden die Gele entweder mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250 gefärbt (siehe oben) oder die Laccase wurde durch Aktivitätsfärbung mit 3 mM ABTS in McIlvaine-Puffer (pH 4,0), wie bei der Native PAGE beschrieben, nachgewiesen.

2.5.2. Gelfiltration

Die Größenbestimmung der gereinigten Laccase durch Gelfiltration erfolgte an einem Pharmacia ÄktaExplorer 100 FPLC-System (*fast protein liquid chromatography*, schnelle Proteinflüssigkeitschromatografie; GE Healthcare), welches mit einer HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule desselben Herstellers bestückt war. Die Kalibrierung der Säule wurde mit *Gel filtration LMW* und *HMW calibration kits* (GE Healthcare) durchgeführt. Für die Kalibrierung und die Größenbestimmung des Laccasemonomers wurde 10 mM NaAc-Puffer pH 6,0 mit 0,15 M NaCl als Proben- und Laufpuffer bei einem Fluss von 0,5 mL·min⁻¹ eingesetzt.

Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Untersuchungen zur dimeren Form der Laccase wurden am selben Instrument, aber unter der Verwendung von 10 mM NaAc-Puffer im Bereich von pH 3 bis pH 8 als Proben- und Laufpuffer bei einem Fluss von $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Laccaseaktivitäten aufgefangener Fraktionen (1 mL) wurden vermessen (Abschnitt 2.3.5) und deren Retentionszeiten und damit Elutionsvolumina zur Abschätzung von Molmassen verwendet.

2.5.3. Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen der Laccase wurden von Nico Jehmlich (Dep. Proteomics, UFZ) durchgeführt.

Aus SDS-PAGE-Gelen ausgeschnittene Laccasebanden (Abschnitt 2.5.1) wurden über Nacht, wie zuvor beschrieben, mit Trypsin verdaut (243). Die entstandenen Peptide wurden eluiert, durch Vakuumzentrifugation konzentriert und mit Hilfe von nanoLC-ESI-MS/MS analysiert (22). Die MS/MS-Spektren der tryptischen Peptide wurden für eine Suche auf einem MASCOT-Server (Matrix Science, London, UK) gegen die cDNA-Sequenz der Laccase, welche in Aminosäuren übersetzt wurde, eingesetzt. Folgende Parameter wurden verwendet: Trypsinverdau (bis zu einer ausgelassenen Spaltung) und Carbamidomethylsubstitution am Cystein als feste Modifikationen sowie folgende variable Modifikationen: Oxidation von Methionin, eine Peptidmassentoleranz von $\pm 1,2 \text{ Da}$, eine Fragmentmassentoleranz von $\pm 0,6 \text{ Da}$ und Peptidladungen von +2 und +3. Die Molmasse des Proteins wurde mit *matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight* (matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit, MALDI-TOF) Massenspektrometrie an einem Ultraflex III TOF/TOF Instrument (Bruker Daltonics, Bremen) im Linearpositivmodus und einem Beschleunigungspotenzial von 25 kV bestimmt. Zuvor wurde die Proteinprobe mit 20 % Trichloressigsäure (v/v, Volumenverhältnis 1:1) gefällt und das Pellet in *Aqua bidest.* aufgenommen. Die Proben wurden mit einer gesättigten Lösung von Sinapinsäure (SA, Bruker Daltonics) in einer Mischung von Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure (Volumenverhältnis 1:2) verdünnt. Auf die Matrix wurden 0,5 μL dieser Lösung aufgetragen. Als Matrix diente eine dünne Schicht mit SA gesättigten Ethanols auf einem MTP AnchorChip 600-384 (Bruker Daltonics). Die Massenspektren wurden extern mit dem *Protein Calibration Standard II* (Bruker Daltonics) kalibriert.

Zur statistischen Absicherung der gewonnenen Ergebnisse wurde das von Pappin *et al.* (199) entwickelte Verfahren der MOWSE-Wertung (*molecular weight search*, Molmassensuche) eingesetzt.

2.5.4. Glycosylierungsgrad

Die gereinigte Laccase wurde mit dem *Glycoprofile II* N-Deglycosylierungskit entsprechend den Herstellerangaben deglykosyliert. Abweichend davon wurde Meerettichperoxidase als Positivkontrolle mitgeführt und die Reaktionsansätze wurden für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Deglycosylierung wurde durch SDS-PAGE unter Verwendung der *silver stain SDS high molecular weight standard mixture* und anschließender Coomassie-Färbung evaluiert. Zur Ermittlung des Glycosylierungsgrades wurde parallel nicht deglykosylierte, gereinigte Laccase,

wie oben beschrieben, mitgeführt. Der Glykosylierungsgrad ergibt sich aus der Differenz aus den für die nicht deglykosylierte und die deglykosylierte Laccase ermittelten Molmassen.

2.6. Funktionelle Charakterisierung der Laccase

Die funktionelle Enzymcharakterisierung wurde in Zusammenarbeit mit Daniela Böhm (Diplomstudentin, Dep. UMB, UFZ) durchgeführt.

2.6.1. pH-Wert und Temperatur

Der Effekt des pH-Wertes auf die Laccaseaktivität und –stabilität wurde von pH 2 - pH 8 in McIlvaine-Puffer untersucht. Die Substrate ABTS (3 mM), 2,6-Dimethoxyphenol (DMP, 3 mM, $\epsilon_{470\text{nm}} = 0,0275 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (232)), Guajakol (2-Methoxyphenol, 3 mM, $\epsilon_{470\text{nm}} = 0,0266 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (20)), Syringaldazin (4-Hydroxy-3,5-Dimethoxybenzaldehydazin, SGZ, 20 μM , $\epsilon_{520\text{nm}} = 0,0624 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (109)) und der Anthrachinonfarbstoff ABu62 (300 μM ; 98% Reinheit; Yorkshire Europe, Tertre, Belgien) wurden für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Reaktion bei Raumtemperatur verwendet. Im Falle des Farbstoffes ABu62 wurde eine Eichgerade erstellt, um seine Konzentrationen und damit den Substratumsatz basierend auf der Absorption bei 590 nm berechnen zu können. Für alle Substrate kam die unter Abschnitt 2.3.5 zur Bestimmung der Laccaseaktivität verwendete, entsprechend modifizierte Methode zum Einsatz. Folgende Enzymaktivitäten der gereinigten Laccase (Abschnitt 2.4) wurden verwendet: ABTS und DMP 10 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, Guajakol 45 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, SGZ 35 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, ABu62 50 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität wurde mit 3 mM ABTS bei 15 °C bestimmt. Die Versuche fanden in 1,5 mL Kleinreaktionsgefäßen (Eppendorf) in einem Gesamtvolumen von 1 mL mit gereinigter Laccase (100 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$) statt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Aktivitätsbestimmung entnommen. Die Stabilität der Laccase wurde durch den Vergleich der Restaktivität mit der Ausgangsaktivität ermittelt.

Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymstabilität wurde durch Messung der verbleibenden Aktivität (im Vergleich zur Ausgangsaktivität) gegenüber 3 mM ABTS während der Inkubation in einem Temperaturbereich von 4 °C bis 45 °C in McIlvaine-Puffer (pH 4,0) untersucht. Eingesetzt wurden 40 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ der gereinigten Laccase.

Um die optimale Reaktionstemperatur des gereinigten Enzyms gegenüber ABTS zu bestimmen, wurde ein temperierbares UV-2501PC UV-VIS Spektrofotometer (Shimadzu, Duisburg) in einem Temperaturbereich von 5 °C – 75 °C eingesetzt. Die zur Messung verwendeten Mikroküvetten (Brand) enthielten 400 μL McIlvaine-Puffer (pH 4,0), 50 μL ABTS (30 mM) und 50 μL der Enzymlösung. Als Kontrolle diente der gleiche Reaktionsansatz, in dem die Enzymlösung durch 50 μL des Puffers ersetzt wurde. Alle Messungen wurden in mindestens drei Parallelen durchgeführt.

2.6.2. Entfärbung von Textilfarbstoffen

Die Entfärbung der Farbstoffe ABk210, ABu62, DBu71 und RBu19 wurde mit dem gereinigten Enzym durchgeführt. Die Konzentration der Farbstoffe betrug 500 μM (verdünnungsberichtigt). Im aktiven Ansatz befanden sich jeweils 10 mU (500 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ in 200 μL)

Enzym sowie im Kontrollansatz die gleiche Menge hitzeinaktiviertes Enzym (1 h bei 95 °C). Die Inkubation erfolgte in 10 mM NaAc-Puffer pH 5,0 in 96-well Mikrotiterplatten mit geradem Boden in jeweils 4 Parallelen. Die Enzymaktivität und die Absorptionsänderung wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 24 h, 48 h und 72 h ermittelt. Nach 48 h wurde das Absorptionsspektrum der vereinigten Kontrollen und der aktiven Ansätze einer parallel angesetzten Mikrotiterplatte vermessen.

2.6.3. Kinetische Parameter

Halbsättigungskonstanten (Michaelis-Menten-Konstanten K_m bzw. halb sättigende Substratkonzentration $S_{0,5}$ nach der Hill-Gleichung) der gereinigten Laccase wurden nach Ermittlung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate ABTS, DMP, Guajakol, ABu62 und SGZ ermittelt. Die Messungen erfolgten, wie unter Abschnitt 2.3.5 für ABTS beschrieben (pH 5,0 für SGZ und Guajakol), unter Verwendung variabler Konzentrationen (μM) der Substrate:

ABTS: 0,5; 0,75; 1; 2; 5; 7,5; 10; 20

DMP: 20; 50; 75; 100; 200; 500; 750

Guajakol: 20; 50; 75; 100; 200; 500; 750; 1000

SGZ: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; 7,5

ABu62: 5; 10; 20; 30; 50; 100; 200; 300

Eingesetzt wurde bei ABTS und DMP jeweils 0,5 mU (0,1 μg Protein), bei Guajakol 4 mU (0,7 μg Protein), bei ABu62 4 mU (0,4 μg Protein) und bei SGZ 7 mU (0,7 μg Protein). Die halb sättigende Substratkonzentration ($S_{0,5}$) und die maximale Substratumsetzungsrate ($v_{\max}$) der ABu62-Oxidation wurden mithilfe der Hill-Gleichung berechnet, da ein sigmoidaler Kurvenverlauf im Reaktionsrate/Substratkonzentrationsdiagramm beobachtet wurde (Abbildung 31).

Die enzymkinetischen Parameter wurden durch nichtlineare Regression der Daten nach dem Michaelis-Menten- (ABTS, DMP, Guajakol, SGZ) bzw. Hill-Modell (ABu62) mit Hilfe des *enzyme kinetics module* der SigmaPlot 7 Software (Systat Software, San Jose, CA, USA) berechnet. Alle Messungen wurden in 4 Parallelen durchgeführt. Zur Berechnung von k_{cat} (katalytische Effizienz) wurde die durch massenspektrometrische Analysen bestimmte Molmasse der gereinigten Laccase genutzt (Abschnitt 3.4.1).

2.6.4. Inhibitoren

Der Einfluss von Lösungsmitteln, Salzen und potenziellen Inhibitoren auf die Laccaseaktivität wurden mithilfe des Ansatzes zur Bestimmung der Laccaseaktivität unter Zugabe der Substanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht (vgl. Abschnitt 2.3.5). Die Messungen starteten jeweils fünf Minuten nach Zugabe der Inhibitoren. Die Konzentrationen, die zu einer 50%-igen Hemmung des Enzyms führten (IC_{50}) wurden auf Basis von Regressionen der erhaltenen Aktivitäten in Abhängigkeit der verwendeten InhibitorKonzentration unter Verwendung des Programms Origin V 7.5 bestimmt. Getestet wurden Aceton, Acetonitril (ACN), Ameisensäure, Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure, Ethanol, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Harnstoff, Isopropanol, Methanol, Natriumazid,

Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumfluorid und Natriumsulfat. Alle Messungen wurden in vier Parallelen durchgeführt, als Kontrolle dienten Ansätze ohne Inhibitorzugabe. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Für Inhibitionsstudien mit gereinigter Laccase aus UHH 5-1-03 verwendete Substanzen und Konzentrationen. Aktivitäten von Ansätzen mit den Inhibitoren wurden bei RT mit 3 mM ABTS in McIlvaine-Puffer pH 4,0 bestimmt. DMSO – Dimethylsulfoxid, EDTA – Ethylendiamintetraacetat.

Inhibitor	Spanne	verwendete Konzentrationen
Aceton	10 – 80 % (v/v)	in Abstufungen von 10 %
Acetonitril	10 – 80 % (v/v)	in Abstufungen von 10 %
Ameisensäure	0,01 – 1,00 M	0,01; 0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,20; 0,50; 0,75; 1,00
DMSO	10 – 80 % (v/v)	in Abstufungen von 10 %
EDTA	0,20 – 25,0 mM	0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,0; 17,5; 25,0
Essigsäure	0,01 – 1,00 M	0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 0,75; 1,00
Ethanol	10 – 80 % (v/v)	in Abstufungen von 10 %
Harnstoff	1,00 – 5,00 M	1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00
Isopropanol	10 – 80 % (v/v)	in Abstufungen von 10 %
Methanol	10 – 80 % (v/v)	in Abstufungen von 10 %
Natriumazid	0,005 – 15,00 mM	0,005; 0,010; 0,020; 0,050; 0,100; 0,200; 0,500; 1,000; 2,000; 5,000; 10,00; 15,00
Natriumcarbonat	0,02 – 0,20 mM	0,02; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20
Natriumchlorid	0,01 – 1,00 mM	0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 0,75; 1,00
Natriumfluorid	0,20 – 10,0 mM	0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00
Natriumsulfat	0,05 – 0,12 mM	0,05; 0,10; 0,12

2.7. Charakterisierung des Laccasegens und –transkripts

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit M. Pecyna (Dep. UMB, UFZ) durchgeführt.

2.7.1. Isolation von Nukleinsäuren und cDNA-Synthese

Myzel des Stammes UHH 5-1-03 wurde wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben gewonnen. Nach Waschung mit *Aqua dest.* und anschließender Lyophilisierung in einem Alpha 2-4 Gefriertrockner (Christ, Osterode) wurde die genomische DNA nach dem Protokoll von Nikolcheva und Bärlocher (188) isoliert. Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurde Trizol Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Diese wurde anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Ein Mikrogramm der Gesamt-RNA wurde eingesetzt, um mithilfe eines PolyT-Anker-Primers und der reversen Transkriptase *RevertAid H Minus M-MuLV* (Fermentas) cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) von UHH 5-1-03 zu synthetisieren.

2.7.2. PCR-Bedingungen

Ein Tetrad2 *gradient cycler*-Thermocycler (Bio-Rad) wurde für die Polymerasekettenreaktionen (PCR, *polymerase chain reaction*) verwendet. Der Primer AP und der PolyT-Anker-Primer (166), die Primer 513-For1 (5'-CGTCGAAGTCTCATCTACC-3'), 513-For2 (5'-CAGGCTCGCAATGGTTCC-3'), 513-Start-For3 (5'-

ATGAAGTCAATCTTTACC-3'), 513-Rev1 (5'-TCGTGCCGTCCTGAATAACC-3'), 513-Rev2 (5'-TGGACATGACTGGAGAGC-3'), 513-Stop-Rev3 (5'-TCACCACTCAGCCATAG-3') sowie die degenerierten Primer Cu1AF and Cu3R (128) wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Primer sind in der Abbildung 34 eingezeichnet. Die PCR-Reaktionsansätze (25 µL Gesamtvolumen) enthielten 12,5 µL PCR-Master-Mix (zweifach konzentriert; Promega, Madison, WI, USA), 1 µL jedes Primers aus einer 10-µM-Stammlösung im Falle der spezifischen Primer (100-µM-Stammlösung für degenerierte Primer), und $\approx$ 35 ng DNA oder 1,5 µg cDNA (in Verbindung mit degenerierten Primern) bzw. rund 5 ng cDNA (in Verbindung mit spezifischen Primern) sowie PCR-reines Wasser. Die PCR begann mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 180 s, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus je einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für jeweils 45 s, einem Primerbindungsschritt bei 55 °C für 45 s (48 °C für degenerierte Primer) und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 90 s (210 s bei inverser PCR). Der finale Elongationsschritt dauerte 600 s bei 72 °C.

Für die Durchführung der inversen PCR wurde zunächst 1 µg genomische DNA in einem Volumen von 50 µL 5 h bei 37 °C mit einem Restriktionsenzym (10 U) geschnitten. In verschiedenen Ansätzen wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet: *HindIII*, *PvuI*, *XhoI* und *EcoRI* (alle von NEB, Ipswich, MA, USA). Die geschnittene DNA wurde mit Hilfe des *Wizard-SV-Kits* (Promega) gereinigt. Die T4-Ligase (40 U; NEB) wurde anschließend verwendet, um die gereinigte und geschnittene DNA in einem Volumen von 400 µL bei 16 °C über Nacht zu ligieren. Die Ligationsprodukte wurden mittels einer Standard-Phenol/Chloroform-Extraktion (Volumenverhältnis 1:1) und anschließender Isopropanolfällung gereinigt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µL *Aqua bidest.* aufgenommen. Die so gereinigten Ligationsprodukte dienten als Basis für eine PCR mit dem Primerpaar 513-For1 und 513-Rev1.

Geschachtelte PCRs (*nested PCRs*) wurden mit den 1 zu 100 verdünnten PCR-Produkten durchgeführt. PCR-Produkte wurden gereinigt (*SureClean*, Bioline, Luckenwalde), um sie zu klonieren oder direkt zu sequenzieren.

2.7.3. Klonierung, Sequenzierung und Sequenzanalyse

Nach der Klonierung der PCR-Produkte mit dem *pCR2.1 TA Cloning*-Kit (Invitrogen) wurden durch Kolonie-PCR (231) positive Klone identifiziert und davon mehrere, unabhängige Klone zur DNA-Sequenzierung eingesetzt.

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierautomaten ABI 3100 und den zugehörigen Sequenzierungsreagenzien (BigDye Sequencing; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Software BioEdit 7.0 wurde für Sequenzanalysen und -abgleiche verwendet (95).

Um das korrekte offene Leseraster (*open reading frame*, ORF) zu bestimmen, wurde die erhaltene DNA-Sequenz unter Verwendung von BLASTn- und BLASTx-Datenbanksuchen (6) mit DNA- und Proteinsequenzen pilzlicher Laccasen, welche in der GenBank-Datenbank hinterlegt sind, verglichen. Durch den Vergleich der genomischen und der cDNA-Sequenz des Laccasegens von UHH 5-1-03 konnten Introns identifiziert werden (Abbildung 34). Für die Vorhersage von Signalpeptidsequenzen fanden die Programme SignalP V3.0 (66) und iPSORT

(18) Anwendung. Durch Einbeziehung von typischen Promotersignalen (TATA-Box, GC-Box) und mithilfe des Programms *ORF Finder* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) wurde der Transkriptionsstartpunkt bestimmt und durch PCR verifiziert. Wahrscheinliche N-Glykosylierungsstellen wurden mit dem Programm NetNGlyc 1.0 bestimmt (93). Weitere Eigenschaften des putativen Proteins wurden mit ProtParam (82) berechnet.

2.8. Statistische Auswertungen

Die Bestimmung der Mittelwerte (arithmetische Mittel der Messwerte) und Standardabweichungen sowie der Konfidenzintervalle für den in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Versuch wurde mithilfe der Tabellenkalkulationssoftware *Excel 2002* (Microsoft, Redmond, WA, USA) durchgeführt.

Funktion

$$z = \frac{x}{y}$$

Fehlerfortpflanzung

$$\left(\frac{\sigma_z}{z}\right)^2 = \left(\frac{\sigma_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_y}{y}\right)^2$$

σ - Standardabweichung der Grundgesamtheit

Formel 4

Für die Berechnung des Gesamtfehlers bei der Darstellung der spezifischen Entfärbungsraten in den Abschnitten 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 und 3.2.5 wurde das Fehlerfortpflanzungsgesetz nach Doerffel verwendet (65). Dieses besteht aus speziellen Fällen der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung, sie gibt Rechenregeln für die Fehlerfortpflanzung bei Anwendung der wichtigsten Grundrechenarten. In der vorliegenden Arbeit wurden Quotienten aus zwei fehlerbehafteten Messgrößen gebildet, daher kam Formel 4 zur Berechnung des Gesamtfehlers zum Einsatz. Für die Berechnung des Gesamtfehlers wurde die Standardabweichung der Stichprobe anstatt, wie in der Formel angegeben, die Standardabweichung der Grundgesamtheit verwendet, da nach Schatten (234) die Standardabweichung der Stichprobe immer größer als die Standardabweichung der Grundgesamtheit ist und somit der Fehler nur über- jedoch nicht unterschätzt werden kann.

Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden erfolgte ein Vergleich zweier Mittelwerte durch den unabhängigen, ungepaarten t-Test nach Student mit der Software *Excel 2002*. Es wurde Formel 5 zur Berechnung eingesetzt.

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}}$$

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$ - Mittelwerte der zu vergleichenden Messwerte

s_1, s_2 - Standardabweichungen der Stichproben

n - Anzahl der Messwerte

t - t-Wert

Formel 5

Bei $t > t(P, FG)$ ist der Unterschied zwischen den zu vergleichenden Werten signifikant, bei $t < t(P, FG)$ ist die Differenz nicht signifikant. Die Verwendung des Begriffs „signifikant“ ist in der vorliegenden Arbeit an eine Wahrscheinlichkeit $P < 0,05$ gebunden, die Anzahl der Freiheitsgrade wurde nach $FG = n_1 + n_2 - 2$ errechnet. Die Grenzen für $t(P, FG)$ können Sachs (229) entnommen werden.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation, Identifizierung und Auswahl der Pilzstämme

Um die Darstellung der nachfolgenden Ergebnisse zu erleichtern und die effizientesten Stämme taxonomisch ansprechen zu können, werden Identifizierungsergebnisse bereits an dieser Stelle gegeben.

3.1.1. Identifizierung neuer Stämme

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Textilfarbstoffe zu entfärben (Tabelle 8), wurden die Stämme UHH 1-6-18-4, UHH 1-13-18-4, UHH 1-4-03 (alle Isolationsstandort UHH 1), UHH 5-1-03 (Isolationsstandort UHH 5), Kl-S5 (aus dem Sediment des Isolationsstandortes Kl), Tt-S1 (aus dem Sediment des Isolationsstandortes Tt) und SaSe-B6 (von verrottendem Pflanzenmaterial vom Isolationsstandort SaSe) zur Identifizierung an die BCCM/MUCL gesendet. Nach den Sequenzierungsdaten der ITS-Region (*internal transcribed spacer*) und dem 5'-Ende der 28S rDNA (ribosomale DNA) sind UHH 1-6-18-4 und UHH 1-13-18-4 unterschiedliche Stämme derselben Art und gehören zur Familie *Helotiaceae*, *Helotiales*, *Ascomycota*. Das Fehlen von Teleomorphstadien verhinderte eine genauere Identifizierung. In Kultur produzieren die Stämme UHH 1-6-18-4 und UHH 1-13-18-4 phialidische Anamorphe mit vergleichsweise kleinen (4 x 3 µm), kugelförmigen Konidien und können mit den Gattungen *Myrioconium* Syd. oder *Phialophora* in Verbindung gebracht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden beide Stämme daher vorläufig als *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 bzw. *Myrioconium* sp. UHH 1-6-18-4 angesprochen. Stamm UHH 5-1-03 bildet eine Coelomyceten-Anamorphe, welche der Gattung *Phoma* Sacc. zugeordnet werden konnte. Dies wurde durch Untersuchungen am CBS bestätigt. Die Sequenzierung der ITS-Region, des 5'-Endes der 28S sowie der 18S rDNA, welche an der BCCM/MUCL durchgeführt wurden, ergab eine Zugehörigkeit des Stammes UHH 5-1-03 zu den *Ascomycota*, Ordnung *Pleosporales*. Dabei wurden Homologien zu Sequenzen von *Leptosphaeria* Ces. et De Not. Spezies festgestellt. Ein Teleomorphstadium konnte in Kultur nicht erhalten werden. In dieser Arbeit wird dieser Stamm daher vorläufig als *Phoma* sp. UHH 5-1-03 bezeichnet. Das Isolat Kl-S5 wurde durch Sequenzierung der 18S und 28S rDNA als *Arthopyrenia salicis* A. Massalongo (*Arthopyreniaceae*, *Pleosporales*, *Ascomycota*) identifiziert. Dieser Stamm bildet eine Coelomyceten-Anamorphe mit pycnidienstämmigen, hellbraunen, ellipsoiden Konidien. Die anamorphe Form von Kl-S5 ist offensichtlich unbenannt und könnte der Gattung *Coniothyrium* Corda oder *Microsphaeropsis* Höhn zugeordnet werden. In dieser Arbeit wird dieser Stamm vorläufig als *Coniothyrium* sp. Kl-S5 bezeichnet. Stamm Tt-S1 wurde als eine Art der Gattung *Alternaria* Nees identifiziert. Eine genauere Bestimmung war nicht möglich. Das Isolat SaSe-B6 stellt eine Anamorphe der Gattung *Phoma* dar. Die ITS-Region weist eine 100%-ige Übereinstimmung mit einem Ascomyceten der *Dothideales* Lindau Gruppe auf. Der Stamm UHH 1-4-03 wurde als *Hypholoma fasciculare* (Hudson : Fries) Kummer identifiziert, ein Vertreter der Basidiomyceten Familie *Strophariaceae*, Ordnung *Agaricales*, welcher höchstwahrscheinlich aus der Uferzone stammte.

3.1.2. Screening auf Agarplatten

Insgesamt wurden Agarplattenkulturen von 137 Pilzstämmen auf ihre Fähigkeit getestet, den Anthrachinonfarbstoff RBU19 und den Azofarbstoff RBK5 zu entfärben. Dazu gehörten 37 Stämme von AQH (14 Arten) und zwei ubiquitär vorkommende mitospore Pilzstämmen, welche aus der Stammsammlung des Dep. UMB des UFZ bezogen wurden. Des Weiteren wurden 17 aus dem Fluss Saale isolierte Stämme (ein Stamm davon war der Basidiomycet *Hypholoma fasciculare* UHH 1-4-03) und insgesamt 77 Stämme aquatischer Pilze, welche aus Gewässern mit hohem Salzgehalt isoliert wurden (25, 28 bzw. 24 Stämme von den Isolationsstandorten KI, SaSe bzw. Tt), eingesetzt. Die Anzahl der Stämme, welche eine teilweise oder vollständige Entfärbung von farbstoffhaltigen Agarplatten innerhalb von 30 Tagen erreichten, sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Einige der Stämme bildeten Pigmente, sodass eine eindeutige Bestimmung der Entfärbung nicht möglich war. Daher sind diese Stämme nicht in Tabelle 8 erfasst. Die AQH *Anguillospora longissima* (zwei Stämme), *Cylindrocarpon* sp. (ein Stamm), *D. foliicola* (ein Stamm), *Heliscus lugdunensis* (zwei Stämme), *Lemonniera aquatica* (ein Stamm), *Varicosporium* sp. (ein Stamm) und *Varicosporium elodeae* (ein Stamm) entfärbten RBU19-haltige Agarplatten teilweise. *Varicosporium* sp. SpW08-1 und *L. aquatica* H9-06-L1 waren darüber hinaus in der Lage, RBK5-haltige Agarplatten teilweise zu entfärben. Eine teilweise Entfärbung von RBK5 wurde ebenfalls bei den beiden *Tetracladium marchalianum* Stämmen festgestellt, welche allerdings RBU19-haltige Agarplatten nicht entfärbten.

Tabelle 8: Zahlen der Stämme aquatischer Hyphomyceten und anderer aquatischer Isolate, die eine Entfärbung von Reactive Blue 19 (RBU19) und/oder Reactive Black 5 (RBK5) auf Agarplatten innerhalb von 30 Tagen zeigten (jeweils 100 µM Farbstoff, 1 % Malzextrakt, 1,5 % Agar-Agar, 14 °C, Lichtausschluss). ++ - vollständige Entfärbung, + - teilweise Entfärbung.

Stämme und Herkunft	Entfärbungsleistungen						
	Nur RBu19		Nur RBk5		RBu19 und RBk5		
	+	++	+	++	+	++	RBu19 ++ RBk5 +
Aquatische Hyphomyceten							
UFZ Stammsammlung	8	Keiner	2	Keiner	2	Keiner	Keiner
Andere aquatische Isolate							
Fluss Saale (UHH)	3	Keiner	1	Keiner	2	Keiner	Keiner
Quelle Kloschwitz (KI)	3	Keiner	Keiner	Keiner	2	Keiner	1
Salziger See (SaSe)	1	2	Keiner	Keiner	5	5	5
Teich Teutschenthal (Tt)	2	Keiner	3	Keiner	5	Keiner	5
UFZ Stammsammlung	1	Keiner	Keiner	Keiner	1	Keiner	Keiner

Eine Entfärbung wurde auch bei Stämmen beobachtet, die nicht zu den AQH gehörten (Tabelle 8, Abbildung 9). Der größte Teil dieser Stämme blieb unidentifiziert. Ausnahmen bildeten *Cylindrocarpon didymum* P10-10-3 (teilweise Entfärbung von RBU19) und *Epicoccum nigrum* H9-06-L2 (teilweise Entfärbung beider Farbstoffe), welche aus der UFZ-Stammsammlung stammten sowie die aquatischen Isolate, die zur Identifikation eingesandt wurden (Abschnitt 3.1.1, Abbildung 9). *Trametes versicolor* DSM 11269 wurde als Referenz mitgeführt und entfärbte beide Farbstoffe innerhalb von 14 (RBU19) bzw. 13 (RBK5) Tagen.

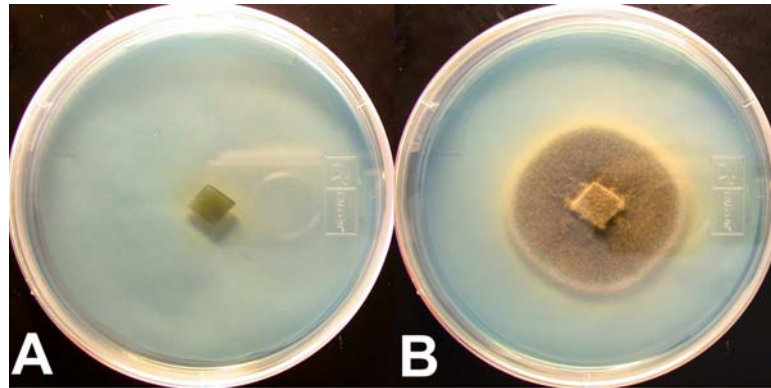


Abbildung 9: Fotografien des Stammes KI-S5 auf Agarplatten mit *Reactive Blue 19*. (A) Zum Zeitpunkt der Beimpfung, (B) nach 14 Tagen Inkubation. Die teilweise Entfärbung des Agars ist als heller Hof am Rand der Kolonie zu erkennen.

3.1.3. Screening in Mikrotiterplatten

Der AQH SpW08-1, der mitospore Pilz P10-10-3, vier Isolate vom Isolationsstandort KI, fünf Stämme vom Isolationsstandort SaSe, fünf Stämme vom Isolationsstandort Tt, und zwei Stämme aus der Saale (darunter UHH 1-4-03) wurden für die Entfärbungsversuche in Mikrotiterplatten ausgewählt. Bei dem AQH WD(A)-00-1 und den mitosporen Stämmen UHH 1-13-18-4 und UHH 1-6-18-4 konnte aufgrund von Pigmentbildung keine Entfärbung in den Agarplattenversuchen festgestellt werden, dennoch wurden diese Stämme in die Versuche in Mikrotiterplatten einbezogen, da sie in der Lage waren, andere Xenobiotika abzubauen (118, 165). Tabelle 9 zeigt die Anzahl der aquatischen Stämme, geordnet nach ihrer Fähigkeit, Textilfarbstoffe in den Konzentrationen 0,3 bzw. 1,0 g·L⁻¹ zu entfärben.

Die Entfärbungsleistungen der zehn effektivsten Stämme unter den aquatischen Isolaten wurden mit denen von verschiedenen Weißfäulepilzen verglichen. Dabei wurden Farbstoffkonzentrationen von 0,15, 0,3, 0,6 und 1,0 g·L⁻¹ eingesetzt. Basierend auf den in Abschnitt 3.1.1 präsentierten Daten und der Tatsache, dass der AQH WD(A)-00-1 einen bekannte Teleomorphe besitzt, welche zur Ascomycetengattung *Massarina*, *Pleosporales* zählt (135, 282), waren sechs mitospore anamorphe Pilze mit erwiesener Zugehörigkeit zu den Ascomyceten unter den am effizientesten entfärbenden Stämmen. Zusätzlich zu den Weißfäulepilzen *T. versicolor* DSM 11269 (*Polyporaceae*, *Polyporales*) und *H. fasciculare* UHH 1-4-03 (*Strophariaceae*, *Agaricales*) wurden die ligninolytischen Basidiomyceten *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372, (*Strophariaceae*, *Agaricales*), *Coriolopsis polyzona* MUCL 38443 (*Polyporaceae*, *Polyporales*) und *Pycnoporus sanguineus* MUCL 38531 (*Polyporaceae*, *Polyporales*) als Referenzstämme verwendet. Alle verwendeten Weißfäulepilze gehören zu Arten, deren Fähigkeit zur Bleichung von Farbstoffen nachgewiesen ist (21, 113, 114, 205, 260, 286).

Die Entfärbungsraten der aquatischen mitosporen Pilze und der Basidiomyceten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Bei einer Farbstoffkonzentration von 0,3 g·L⁻¹ entfärbten einige aquatische Pilze acht der zwölf getesteten Farbstoffe vergleichbar mit dem effizientesten Weißfäulepilz. Mehrere mitospore Stämme zeigten Entfärbungen, welche nicht signifikant unterschiedlich oder sogar signifikant höher waren als die des effizientesten Weißfäulepilzes.

Bei einer Farbstoffkonzentration von $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ gab es für sechs der getesteten Farbstoffe keine signifikanten Unterschiede in den Entfärbungsraten zwischen den besten mitosporen Pilzen und den Weißfäulepilzen. Darüber hinaus entfärbte P10-10-3 DsY3 signifikant besser als DSM 11372. Die für den effektivsten Weißfäulepilz gemessenen Entfärbungen von ABu62 und RBU19 wurden annähernd von WD(A)00-1 (ABu62) und UHH 5-1-03 (RBU19) erreicht.

Tabelle 9: Anzahl von aquatischen Pilzisolaten, denen unterschiedliche Entfärbungsleistungen (ausgedrückt als Bereiche unterschiedlicher prozentualer Entfärbung) für unterschiedliche getestete Textilfarbstoffe zugeordnet wurden. Die gezeigten Daten basieren auf Mittelwerten von vier parallelen Ansätzen in Bezug zu einer nicht inokulierten Kontrolle nach Behandlung unterschiedlich konzentrierter Farbstofflösungen in Mikrotiterplatten für 7 Tage. k. E. – keine Entfärbung.

Entfärbungsbereich (%)	Farbstoffkonz. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Anzahl der entfärbenden Stämme											
		Acid Blue 62	Acid Red 299	Disperse Blue 1	Disperse Red 1	Disperse Yellow 3	Reactive Blue 19	Reactive Black 5	Reactive Red 4	Reactive Yellow 81	Direct Red 28	Direct Blue 1	Direct Black 38
≥ 80	0,3	4	0	0	0	0	2	1	0	0	0	2	0
60 - 79		3	0	1	1	3	1	2	2	1	7	6	7
40 - 59		5	5	6	6	6	0	4	2	2	6	5	3
20 - 39		6	8	7	7	4	1	7	2	8	5	6	7
< 20		3	6	3	6	4	10	7	13	7	2	1	1
k. E.		0	2	4	1	4	7	0	2	3	1	1	3
≥ 80	1,0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0
60 - 79		6	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0
40 - 59		4	6	5	1	4	0	3	0	1	3	1	3
20 - 39		4	5	7	8	5	2	7	8	6	8	9	10
< 20		4	5	3	6	3	16	11	11	11	6	10	7
k. E.		0	5	6	6	5	1	0	2	3	3	0	1

Die nicht inokulierten Kontrollen zeigten in keinem Fall eine Abnahme der Absorption. Des Weiteren war keine sichtbare Bindung der Farbstoffe an das Myzel zu erkennen, welches durch die Pilze an der Oberfläche der einzelnen Kavitäten gebildet wurde. Alle Stämme zeigten ein individuelles Entfärbungsmuster, abhängig vom Farbstoff und seiner Konzentration.

Tabelle 10: Prozentuale Entfärbung von unterschiedlichen Textilfarbstoffen in Mikrotiterplatten durch aquatische Pilzisolat und Weißfäulepilzstämmen nach sieben Tagen bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der Farbstofflösungen. Die Versuche wurden bei 28 °C und 120 rpm durchgeführt. Die Farbstofflösungen enthielten neben den Farbstoffen 2 % ME. Dargestellt sind Mittelwerte von vier Parallelen relativ zu nicht inokulierten Kontrollen. FS – Farbstoff.

Pilzstamm	FS-konz. (g·L ⁻¹)	Entfärbung (%)											
		Acid Blue 62	Acid Red 299	Disperse Blue 1	Disperse Red 1	Disperse Yellow 3	Reactive Blue 19	Reactive Black 5	Reactive Red 4	Reactive Yellow 81	Direct Red 28	Direct Blue 1	Direct Black 38
<i>C. aquatica</i> WD(A)00-1	0,3	83	17	46	14	49 ^c	31	25	21	49 ^c	66 ^c	53	37
	1,0	84 ^b	39	34	0	63 ^c	31	21	29 ^b	38 ^c	36	47 ^b	31
<i>Varicosporium</i> sp. SpW08-1	0,3	17	56 ^c	32	5	1	13	50	14	12	24	28	38
	1,0	18	51 ^c	26	18	2	5	37	11	14	35	15	23
<i>C. didymum</i> P10-10-3	0,3	19	39	27	40 ^c	46 ^c	4	8	15	24	29 ^c	32	73
	1,0	56	41 ^c	47	56 ^{b, c}	69 ^{b, d}	5	13	17	6	28	15	16
<i>Alternaria</i> sp. Tt-S1	0,3	40	37	54 ^c	29 ^c	62 ^d	10	38	41	21	28	68	71 ^c
	1,0	67	18	40	3	65 ^c	14	37	22	28	41	26	55 ^{b, c}
<i>Coniothyrium</i> sp. Kl-S5	0,3	89	55 ^c	63 ^{b, c}	64 ^{b, c}	74 ^{b, d}	63	81 ^b	76 ^{b, c}	26	71	76	67
	1,0	80	20	38	38 ^c	45 ^c	12	48	22	9	44	22	36
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-6-18-4	0,3	68	39	43	9	39 ^c	8	20	16	37	49	25	32
	1,0	54	54 ^{b, c}	43	0	44 ^c	17	17	20	27	27	32	30
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4	0,3	74	46	30	29	45 ^c	16	11	8	18	50	34	23
	1,0	78	39	34	7	44 ^c	30	14	23	18	31	20	25
<i>Phoma</i> sp. SaSe-B6	0,3	79	53 ^c	56 ^c	35	55 ^c	11	78	62	55 ^c	76 ^{b, c}	68	73
	1,0	69	51 ^c	19	30	44 ^c	11	47	20	41 ^{b, c}	61 ^{b, c}	20	31
<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	0,3	89 ^b	56 ^{b, c}	59 ^c	9	40	83 ^{b, c}	73	58	61 ^{b, c}	16	86 ^b	73 ^b
	1,0	29	43 ^c	52 ^{b, c}	11	21	92 ^b	49 ^b	23	34	52 ^c	39	53 ^c
<i>C. polyzona</i> MUCL 38443	0,3	90	47	37	0	28	81	91	72	54	53	87	25
	1,0	90 ^{b, e}	31	51	0	39	89	97 ^{b, e}	76 ^e	53 ^e	41	96 ^{b, e}	51
<i>H. fasciculare</i> UHH 1-4-03	0,3	87	17	41	48	37	82	41	21	24	30	95 ^e	47
	1,0	83	11	44	20	38	91	34	22	23	37	92 ^e	33
<i>P. sanguineus</i> MUCL38531	0,3	83	29	12	40	31	9	9	6	17	21	37	12
	1,0	74	0	13	18	39	23	23	6	20	39	57	12
<i>S. rugosoannulata</i> DSM 11372	0,3	82	14	3	31	45	73	72	30	38	9	97 ^e	54
	1,0	82	0	41	40	52 ^b	90	71 ^e	31	31	30	96 ^e	25
<i>T. versicolor</i> DSM 11269	0,3	92 ^{b, e}	60 ^b	58 ^b	50 ^b	50 ^b	88 ^b	93 ^{b, e}	94 ^b	64 ^b	74 ^b	97 ^{b, e}	84 ^{b, e}
	1,0	87	57 ^b	63 ^b	49 ^b	42	94 ^{b, e}	95 ^e	87 ^{b, e}	55 ^b	61 ^b	95 ^e	67 ^b

^b Jeweils effizientester Entfärber unter den aquatischen Isolat und bzw. Weißfäulepilzen.

^c Nicht signifikant unterschiedlich vom effizientesten Weißfäulepilz nach Students t-Test (P > 0,05).

^d Signifikant stärker entfärbend als der beste Weißfäulepilz nach Students t-Test (P < 0,05).

^e Signifikant stärker entfärbend als der beste aquatische Pilzstamm nach Students t-Test (P < 0,05).

Konzentrationsabhängige Entfärbungen der Farbstoffe DrBk38, DsY3, RBu19 und RR4 durch die aquatischen Stämme UHH 5-1-03, Kl-S5 und Tt-S1 sind in Abbildung 10 dargestellt. Bei einem Großteil der getesteten Konzentrationen entfärbte DSM 11269 drei der vier in

Abbildung 10 gezeigten Farbstoffe stärker (DrBk38, RR4) oder genauso effizient (RBU19) wie die aquatischen Pilzstämme. Kl-S5 und Tt-S1 zeigten bei bestimmten Konzentrationen eine höhere Entfärbung von DsY3 als DSM 11269. Für UHH 5-1-03 wurde eine im Wesentlichen mit DSM 11269 vergleichbare Entfärbung von RBU19 gemessen.

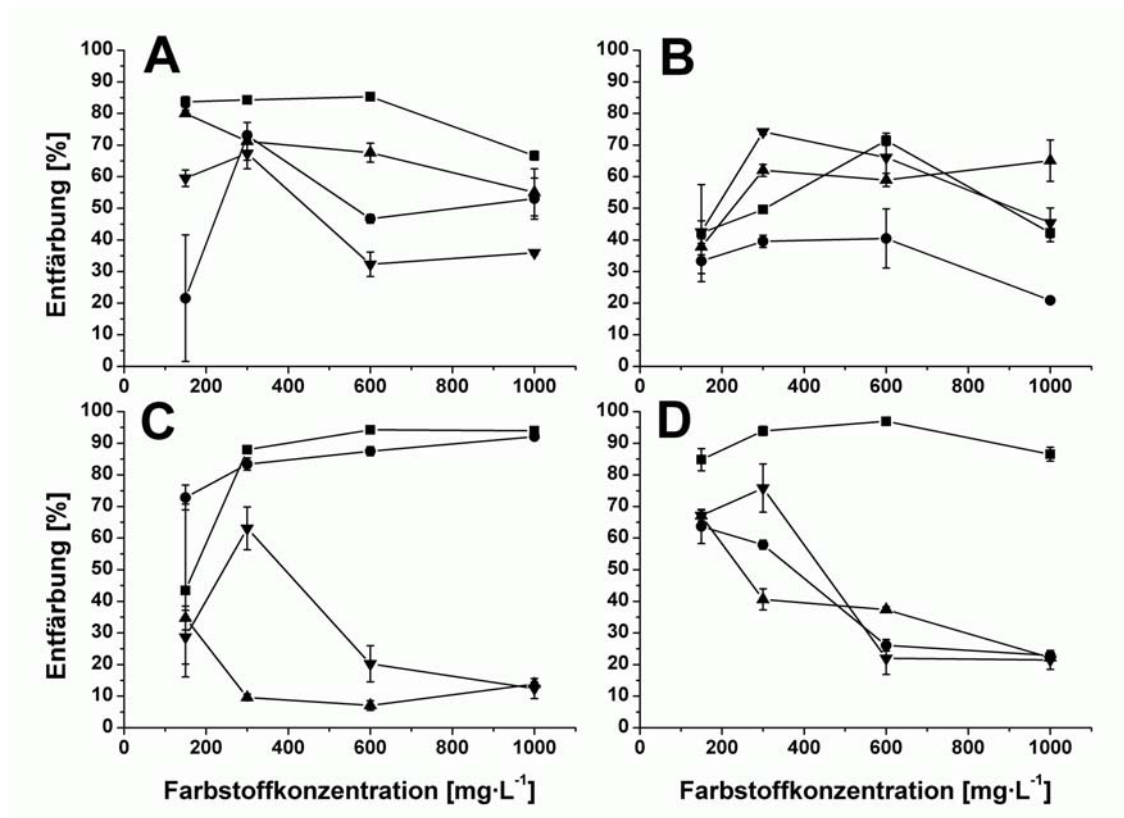


Abbildung 10: Prozentuale Entfärbung (in Relation zu nicht inokulierten Kontrollen) von *Direct Black 38* (A), *Disperse Yellow 3* (B), *Reactive Blue 19* (C) und *Reactive Red 4* (D) durch die aquatischen Pilzstämme UHH 5-1-03 (●), Kl-S5 (▼), Tt-S1 (▲) sowie dem Weißfäulepilz DSM 11269 (■) nach 7 Tagen Inkubationszeit in Abhängigkeit unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen der Farbstofflösungen. Versuche wurden in Mikrotiterplatten bei 28 °C und 120 rpm durchgeführt. Die Lösungen enthielten neben den Farbstoffen 2 % ME. Dargestellt sind Mittelwerte von vier parallelen Ansätzen $\pm$ 95%-Konfidenzintervalle.

Die Bildung neuer Absorptionsmaxima, die während der Inkubation von Farbstofflösungen mit den Pilzstämmen beobachtet wurden, ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Stämme (Tt-S1 und SpW08-1) bzw. Farbstoffe (DrR28, DsR1, RR4 und RY81), bei denen keine neuen Peaks auftraten, wurden nicht dargestellt.

Tabelle 11: Wellenlängen (nm) von neuen Absorptionspeaks (Schultern, wo angegeben) nach einwöchiger Inkubation von Farbstofflösungen (1,0 g·L⁻¹ Farbstoff + 2 % ME) mit unterschiedlichen Pilzstämmen in Mikrotiterplatten bei 28 °C und 120 rpm. Als Kontrollen dienten nicht inokulierte Farbstofflösungen^a. Farbstoffe (DrR28, DsR1, RR4 und RY81) und Pilzstämmen (*Alternaria* sp. Tt-S1, *Varicosporium* sp. SpW08-1), bei denen keine Veränderungen im jeweiligen Absorptionsspektrum beobachtet wurden, sind nicht dargestellt.

Pilzstamm	Saure Farbstoffe		Dispersfarbstoffe		Reaktivfarbstoffe		Direktfarbstoffe	
	ABu62	AR299	DsBu1	DsY3	RBu19	RBk5	DrBu1	RBk38
<i>C. aquatica</i> WD(A)-00-1	K.Ä. ^b	433	K.Ä.	K.Ä.	470 ^d	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.
<i>C. didymum</i> P10-10-3	482 ^c	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	507
<i>Coniothyrium</i> sp. KI-S5	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	587, 481 ^c	K.Ä.	536	K.Ä.	555
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-6-18-4	544	483	K.Ä.	480 ^c	K.Ä.	K.Ä.	526	K.Ä.
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4	478, 522	413, 482	K.Ä.	K.Ä.	490 ^d	K.Ä.	530	K.Ä.
<i>Phoma</i> sp. SaSe-B6	K.Ä.	481	K.Ä.	435 ^d	K.Ä.	540 ^d	K.Ä.	K.Ä.
<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	479 ^d	K.Ä.	K.Ä.	481
<i>C. polyzona</i> MUCL 38443	480	432	525	K.Ä.	490 ^d	477	K.Ä.	K.Ä.
<i>H. fasciculare</i> UHH 1-4-03	504	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	480	K.Ä.	497	383
<i>P. sanguineus</i> MUCL 38531	499	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.	584	481
<i>S. rugosoannulata</i> DSM 11372	483	429 ^c	K.Ä.	K.Ä.	478	K.Ä.	501	451
<i>T. versicolor</i> DSM 11269	476	K.Ä.	510 ^d	K.Ä.	474	K.Ä.	K.Ä.	K.Ä.

^a Wellenlängen der Absorptionsmaxima von unbehandelten Farbstofflösungen: 595 und 637 nm (ABu62), 520 nm (AR299), 592 nm (DsBu1), 358 nm (DsY3), 592 nm (RBu19), 598 nm (RBk5), 615 nm (DrBu1), 520 nm (DrBk38).

^b K.Ä., keine Änderung im Absorptionsspektrum.

^c Neuer Absorptionspeak hatte eine sehr schwache Intensität.

^d Lediglich neue Schulter.

Spektrale Veränderungen der behandelten Farbstofflösungen sind Indikatoren für die Bildung von Biotransformationsprodukten. Beispiele für die Änderungen der Absorptionsspektren nach Inkubation mit verschiedenen Pilzstämmen sowie die zugehörigen, nicht inokulierten Kontrollen sind für die Farbstoffe ABu62, RBu19 und DrBu1 in Abbildung 11 dargestellt. Absorptionspeaks, welche von *de novo* synthetisierten Pilzmetaboliten herrührten, sollten ebenso in Kulturen ohne Farbstoff zu beobachten gewesen sein. Dies war nicht der Fall (Daten nicht gezeigt). Neue Absorptionsmaxima bzw. –schultern, die nach Inkubation von Pilzen mit RBu19 entstanden, wurden bei vergleichbaren Wellenlängen sowohl bei aquatischen als auch bei Weißfäulepilzen festgestellt. Neue Absorptionspeaks in einem für aquatische Isolate und Weißfäulepilze ähnlichen Wellenlängenbereich wurden ebenfalls bei den Farbstoffen ABu62, AR299 und DrBk38 beobachtet. Nicht vergleichbar zwischen den beiden Pilzgruppen waren die neu entstandenen Absorptionspeaks bei den Farbstoffen DsBu1, DsY3, RBk5 und DrBu1. Keiner der Basidiomyceten bildete neue Absorptionspeaks bei Inkubation mit DsY3, während drei aquatische Pilzstämmen eine Biotransformation des Farbstoffes zeigten.

Nach Behandlung von DsBu1 traten neue Absorptionspeaks bei zwei Basidiomycetenstämmen, aber nicht bei den aquatischen Pilzstämmen auf.

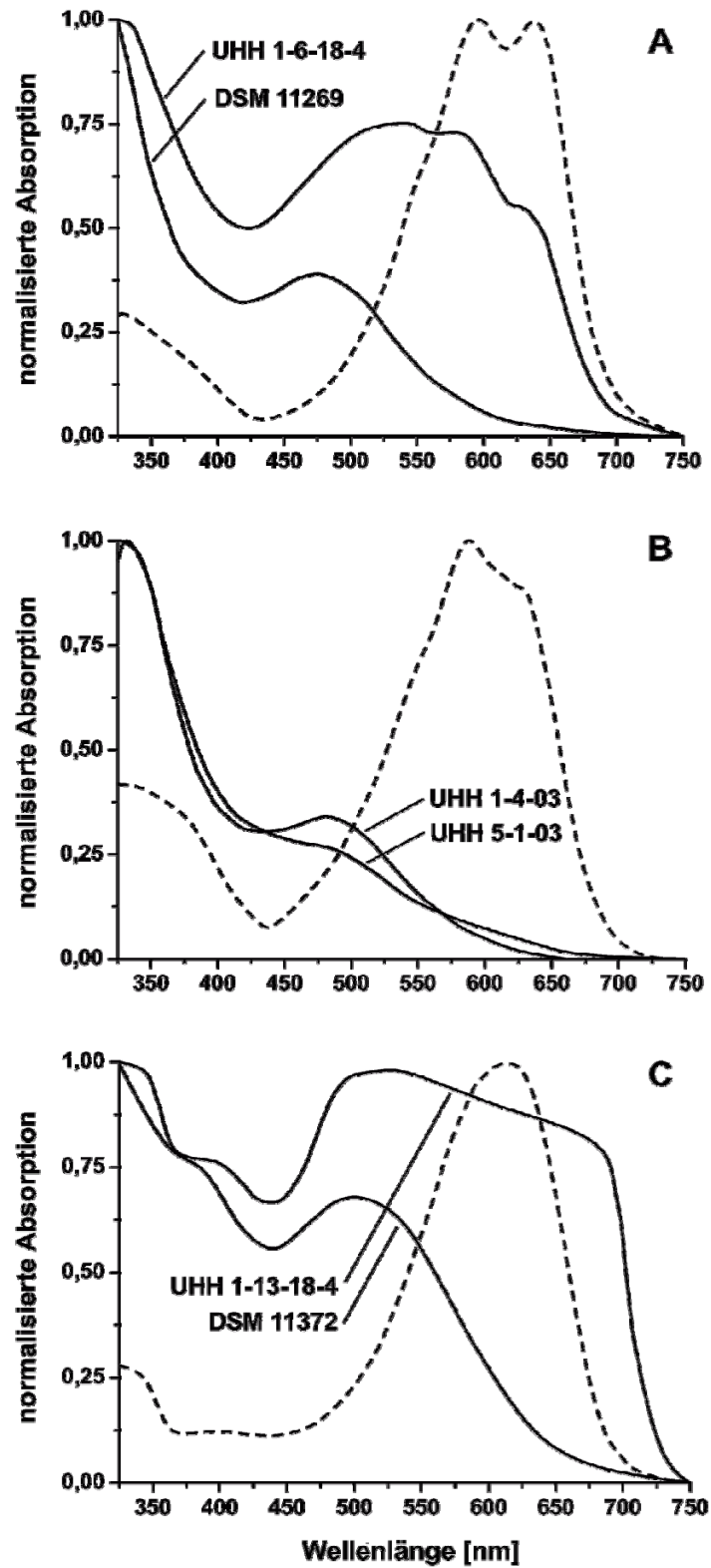


Abbildung 11: Normalisierte Absorptionsspektren von *Acid Blue 62* (A), *Reactive Blue 19* (B) und *Direct Blue 71* (C) nach einwöchiger Inkubation von Farbstofflösungen ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Farbstoff + 2 % ME) mit verschiedenen Pilzstämmen in Mikrotiterplatten bei 28°C und 120 rpm. Als Kontrollen dienten nicht inokulierte Farbstofflösungen (gestrichelte Linien).

3.2. Entfärbungsversuche in Erlenmeyerkolben

Basierend auf den in Kapitel 3.1 präsentierten Ergebnissen wurden die Stämme UHH 5-1-03, Kl-S5 und Tt-S1 für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Stamm SaSe-B6 bildete in Flüssigkulturen, wahrscheinlich durch ausgeschiedene Polysaccharide bedingt, einen zähflüssigen Kulturüberstand (Daten nicht gezeigt). Da dieser Umstand den Stamm als ungeeignet für einen späteren Einsatz in Bioreaktoren qualifizierte, wurde trotz hoher Entfärbungsleistungen im Screening von einer weiteren Verwendung dieses Stammes abgesehen.

In Erlenmeyerkolben wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Screening überprüft. Zusätzlich erlaubten diese Versuche Bestimmungen von Laccaseaktivitäten und Biotrockenmassen. Unter allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kulturbedingungen wurde in regelmäßigen Abständen die Bildung von Peroxidasen (Abschnitt 2.3.5) überprüft. Es konnte in keinem Fall eine Peroxidaseaktivität gemessen werden.

Zunächst sollte eingeschätzt werden, inwieweit ein alkalischer pH-Wert und die Zugabe von anorganischen Salzen (in Anlehnung an das Modellabwasser für Reaktivfarbstoffe, Tabelle 4) einen Einfluss auf das Wachstum der verwendeten Pilzstämme hatte (Abbildung 12).

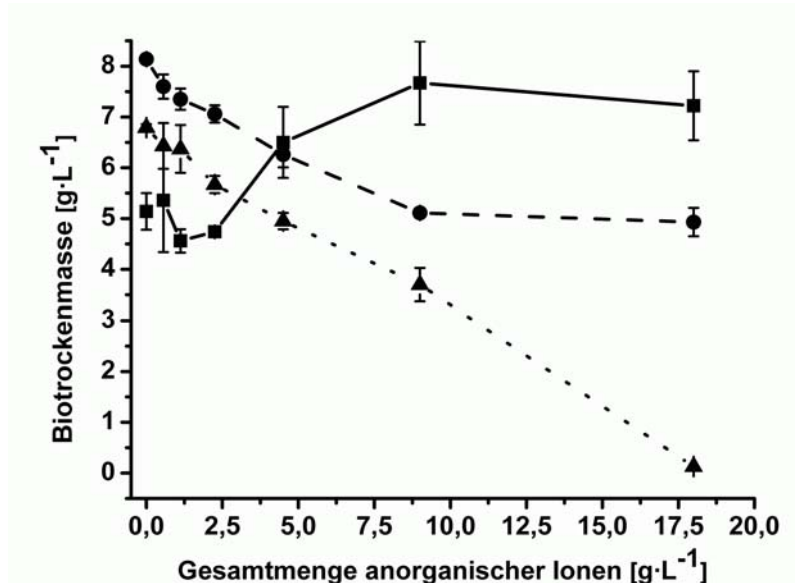


Abbildung 12: Biotrockenmassen der drei aquatischen Pilzstämme UHH 5-1-03 (▲), Kl-S5 (●) und Tt-S1 (■) nach 14 Tagen Wachstum in Flüssigkulturen (pH 10, 2 % ME, 120 rpm, 14 °C) in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen an Salzen (Na₂SO₄ und Na₂CO₃, dargestellt als Summenkonzentration). 0 g·L⁻¹ entspricht dem Medium ohne Salzzugabe bei pH 10. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei parallelen Kulturen und Standardabweichung. Stamm DSM 11269 bildete unter diesen Bedingungen maximal 0,28 ± 0,02 g·L⁻¹ Biotrockenmasse.

Während alle aquatischen Stämme, im Gegensatz zum Weißfäulepilz DSM 11269, ein deutliches Wachstum bei pH 10 ohne Salzzugabe (Werte bei 0 g·L⁻¹ anorganischer Ionen) zeigten, lassen sich deutliche Unterschiede bei der Zugabe von Salzen erkennen. Bei Stamm UHH 5-1-03 nahm die gebildete Biotrockenmasse annähernd linear mit zunehmender Salzkonzentration ab, bei 18,0 g·L⁻¹ war nur noch minimales Wachstum zu verzeichnen. Im Fall von Kl-S5 kam es bis zu einer Summenkonzentration von 9,0 g·L⁻¹ anorganischer Ionen zu einer Abnahme der Biotrockenmasse, bei der höchsten getesteten Konzentration nahm diese nicht

weiter ab. Stamm Tt-S1 bildete die maximale Biotrockenmasse erst bei einer hohen Summenkonzentration im Medium ($9,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), bei der höchsten getesteten Salzkonzentration wurde eine nur insignifikant geringere Biotrockenmasse erreicht. Das Wachstumsverhalten der aquatischen Stämme spiegelt somit die Salzgehalte der Isolationsstandorte ($\text{UHH } 5 < \text{KI} < \text{Tt}$, Tabelle 2) wider. Alle aquatischen Stämme waren in der Lage, bei der höchsten in den Entfärbungsversuchen verwendeten Konzentration an anorganischen Salzen ($9,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) zu wachsen, während Stamm DSM 11269 schon durch pH 10 ohne zusätzliche Salzzugabe nahezu vollständig in seinem Wachstum gehemmt war.

3.2.1. Einzelfarbstoffe in Malzextraktmedium

Für die Durchführung dieser Experimente wurden vier Farbstoffe (ABu62, ABk210, DBu71 und RBU19) unterschiedlicher Applikationsklassen (zwei saure [ABu62, ABk210], ein Direkt- [DBu71] und ein Reaktivfarbstoff [RBU19]), mit unterschiedlichen Chromophoren (Azo [ABk210, DBu71] und Anthrachinon [ABu62, RBU19]) ausgewählt. Zur Erfassung der Entfärbung wurden die jeweiligen Farbstoffspektren über einen Wellenlängenbereich von 380 bis 740 nm integriert. Die Darstellung der Absorptionen der Biomasse enthaltenden Kolben wurde relativ zu mitgeführten Kontrollen, die keine Biomasse enthielten, dargestellt (Abbildung 13).

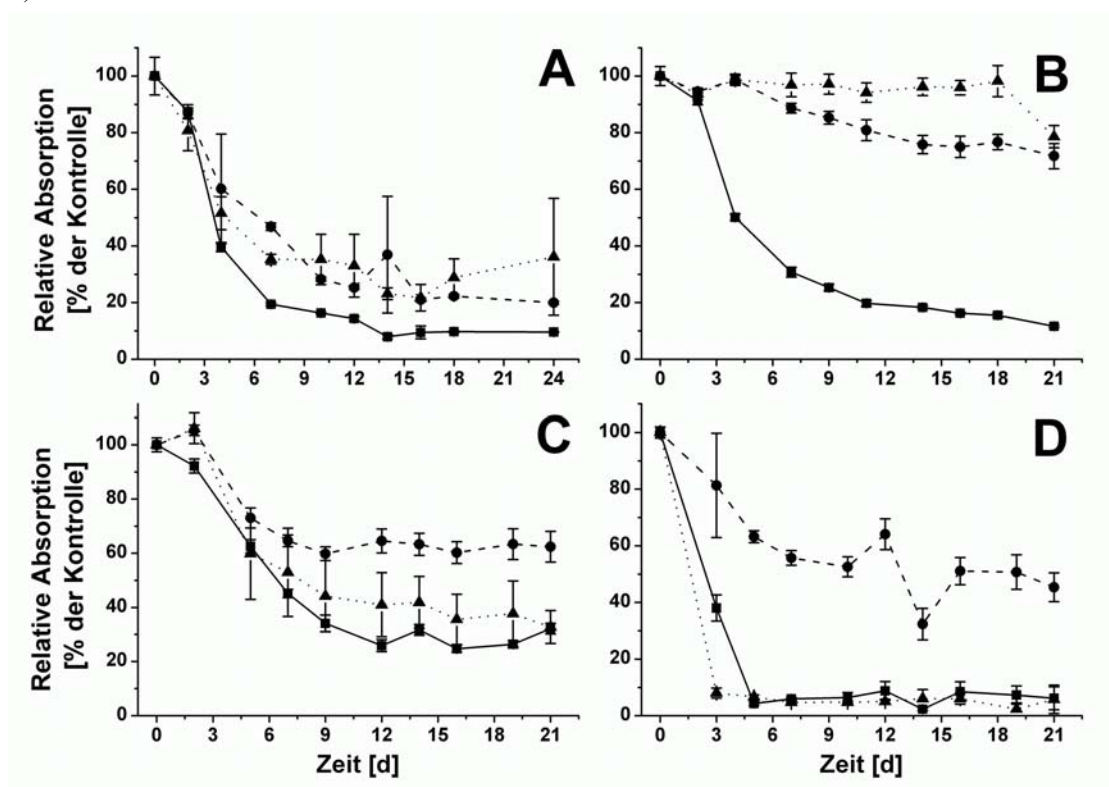


Abbildung 13: Relative Absorptionen (Integrale der Spektren von 380 – 740 nm) in Flüssigkulturen von drei aquatischen Pilzstämmen in Bezug zu Kontrollen, die uninokuliert blieben (■ - UHH 5-1-03, ● - KI-S5, ▲ - Tt-S1). Verwendet wurden die Farbstoffe *Acid Blue 62* (A), *Reactive Blue 19* (B), *Direct Blue 71* (C) und *Acid Black 210* (D). Dargestellt sind Mittelwerte von je drei Kulturen $\pm$ Standardabweichungen. Die Medien enthielten 2 % ME und 500 μM des jeweiligen Farbstoffes. Weitere Einzelheiten siehe Abschnitt 2.2.2.

ABu62 (Abbildung 13A) konnte von allen verwendeten Pilzstämmen effizient entfärbt werden. Die höchste Entfärbung wurde durch den Stamm UHH 5-1-03 erreicht. Proben von

Kulturtag 7 wurden für massenspektrometrische Untersuchungen verwendet (Abschnitt 3.2.6). Im Gegensatz zu ABu62 wurde der strukturell verwandte Farbstoff RBU19 nur von Stamm UHH 5-1-03 effizient entfärbt (Abbildung 13B). Der Azofarbstoff DBu71 wurde von allen Stämmen in unterschiedlichem Maße entfärbt (Abbildung 13C), die Entfärbung erreichte bei allen Stämmen nach einem Zeitraum von etwa 14 Tagen ein stammspezifisches Niveau. ABk210, ebenfalls ein Vertreter der Azofarbstoffe, wurde von allen Stämmen außer KI-S5 zu über 90 % entfärbt (Abbildung 13D). Die maximale Entfärbung in Kulturen der Stämme Tt-S1 und UHH 5-1-03 wurde bereits nach drei bzw. fünf Tagen erreicht.

In Kulturen der Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5, welche ABu62 enthielten, konnten hohe Laccaseaktivitäten gemessen werden (Abbildung 14A), die am Kulturtag 10 ihr Maximum erreichten. Offensichtlich hatte der Farbstoff einen stimulierenden Effekt auf die Laccasebildung, da in Flüssigkulturen ohne Farbstoff bedeutend geringere Aktivitäten gemessen wurden (maximal 20,9 U·L⁻¹, Abschnitt 3.5.1). In Kulturen des Stammes KI-S5 mit RBU19 wurde ein erhöhter Laccasetiter im Vergleich zu Kulturen ohne RBU19 gemessen (Abbildung 35B). Bei Zugabe von DBu71 war Laccasebildung auf geringem Niveau in allen Kolben nachweisbar. Die Stämme Tt-S1 und KI-S5 zeigten die höchsten Enzymaktivitäten (Abbildung 35C). Wenn das Medium ABk210 enthielt, produzierte keiner der Stämme nennenswerte Laccaseaktivitäten (Aktivität in allen Fällen < 5 U·L⁻¹, Daten nicht gezeigt).

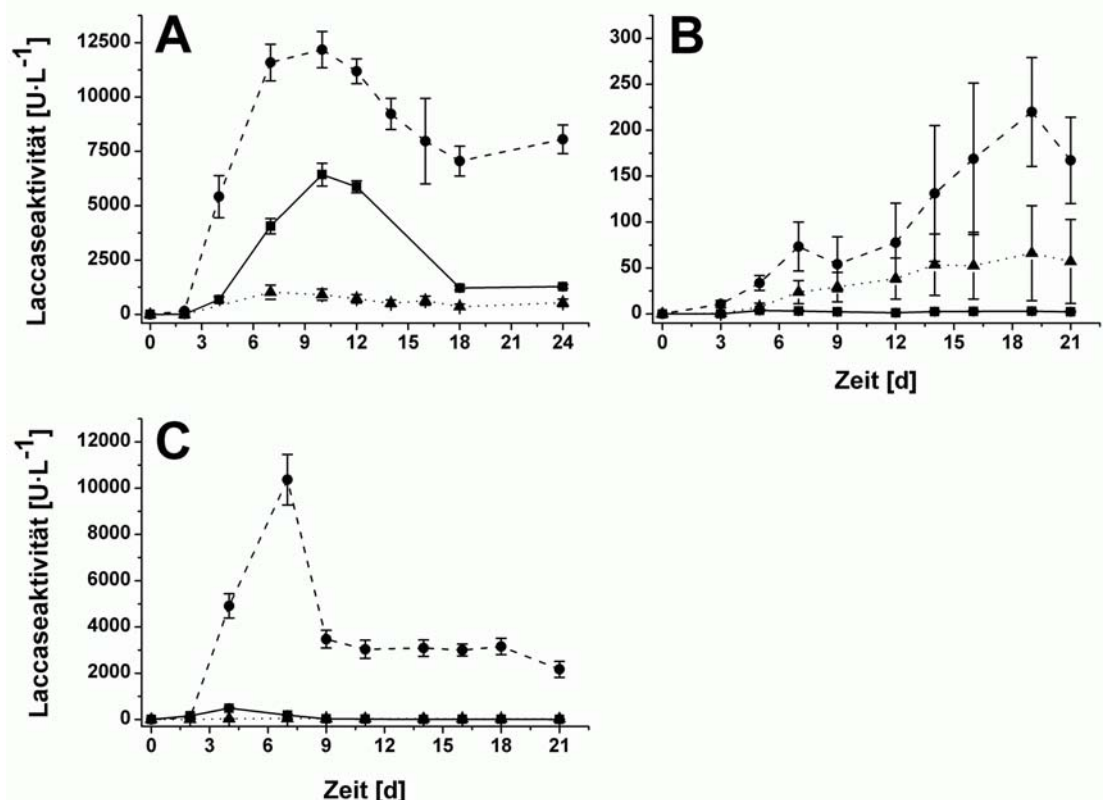


Abbildung 14: Mittelwerte und Standardabweichungen (drei parallele Kulturen) von Laccaseaktivitäten in Flüssigkulturen von drei aquatischen Pilzstämmen (■ - UHH 5-1-03, ● - KI-S5, ▲ - Tt-S1). Verwendet wurden die Farbstoffe *Acid Blue 62* (A), *Reactive Blue 19* (B) und *Direct Blue 71* (C). Die Medien enthielten neben 2 % ME 500 µM des jeweiligen Farbstoffes. Für weitere Einzelheiten siehe Abbildung 13 und Abschnitt 2.2.2.

Nach Beendigung des Experimentes wurden mithilfe der Biotrockenmassen die spezifischen Entfärbungsraten (Tabelle 12) berechnet. Der Stamm UHH 5-1-03 entfärbte die Farbstoffe

ABu62, RBU19 und ABk210 mit vergleichbarer Effizienz ($14,8 - 16,8 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$). Dies entspricht etwa 75 % der für DBu71 bestimmten spezifischen Entfärbungsrate. Der Stamm KI-S5 muss, obwohl im Fall von ABu62 eine rund 25 % höhere spezifische Entfärbungsrate im Vergleich zu UHH 5-1-03 bestimmt wurde, als insgesamt weniger geeignet eingeschätzt werden, da er RBU19 (rund 40 %), DBu71 (rund 55 %) und ABk210 (rund 75 %) mit geringer Effizienz als Stamm UHH 5-1-03 entfärbte. Stamm Tt-S1 zeigte insignifikant höhere spezifische Entfärbungsraten im Vergleich zu Stamm UHH 5-1-03 für die Farbstoffe ABu62 und DBu71, eine rund 20 % höhere spezifische Entfärbungsrate für ABk210, jedoch im Fall von RBU19 eine etwa 70 % niedrigere spezifische Entfärbungsrate als Stamm UHH 5-1-03.

Tabelle 12: Spezifische Entfärbungsraten in Flüssigkulturen von drei aquatischen Pilzstämmen (UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1), ausgedrückt als prozentuale Entfärbung (siehe Abbildung 13) pro Tag und Biotrockenmasse (21 Tage Inkubation für RBU19, DBu71 und ABk210; 24 Tage Inkubation für ABu62). Dargestellt sind Mittelwerte von je drei Kulturen und der Gesamtfehler.

Farbstoff	Spezifische Entfärbung ($\text{\%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$)		
	UHH 5-1-03	KI-S5	Tt-S1
<i>Acid Blue 62</i>	$14,78 \pm 0,6$	$18,22 \pm 0,1$	$15,51 \pm 3,2$
<i>Reactive Blue 19</i>	$16,64 \pm 0,9$	$7,03 \pm 0,3$	$5,28 \pm 0,4$
<i>Direct Blue 71</i>	$20,70 \pm 1,3$	$11,28 \pm 0,9$	$22,59 \pm 3,2$
<i>Acid Black 210</i>	$16,78 \pm 2,0$	$13,01 \pm 0,8$	$20,28 \pm 1,4$

Die Entfärbungsversuche von Einzelfarbstoffen in Erlenmeyerkolben bestätigten die Ergebnisse der Entfärbungsversuche in Mikrotiterplatten. Der aquatische Pilz UHH 5-1-03 zeigte die höchsten Entfärbungen (Abbildung 13) und für alle Farbstoffe eine spezifische Entfärbungsrate von über $14 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$ (Tabelle 12). Die Stämme KI-S5 und Tt-S1 erreichten insbesondere im Hinblick auf die wesentlich geringere Entfärbung des Farbstoffes RBU19 nicht die Effizienz des Stammes UHH 5-1-03.

3.2.2. Einzelfarbstoffe in Modellabwässern mit Malzextrakt

Nach der Evaluierung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Kapitel 3.1 sollte im nächsten Schritt überprüft werden, inwiefern die Modifikation der Medienzusammensetzung hinsichtlich praktisch relevanter Parameter einen Einfluss auf die Entfärbungsleistungen der einzelnen verwendeten Stämme hatte.

Der Farbstoff ABu62 wurde in einem sauren Färbebad verwendet (pH 5), welches geringe Mengen an Na_2SO_4 enthielt ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Abschnitt 2.2.2). Unter diesen Bedingungen war die Entfärbung des Farbstoffes im Vergleich zu den in Abbildung 13 gezeigten Entfärbungen (keine Modellabwasserbedingungen) entweder vermindert (Stämme KI-S5 und UHH 5-1-03) oder konnte nicht nachgewiesen werden (Stamm Tt-S1, Abbildung 15). Keiner der Stämme entfärbte die Lösung innerhalb des Versuchszeitraums vollständig. Die Kulturen der Stämme UHH 5-1-03 und Tt-S1 zeigten nur begrenztes Wachstum ($0,16 \pm 0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. $0,19 \pm 0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Differenz zum Inokulum am Ende des Versuches). Proben dieses Versuches (Tag 7) wurden für Metabolitenuntersuchungen verwendet (Abschnitt 3.2.6).

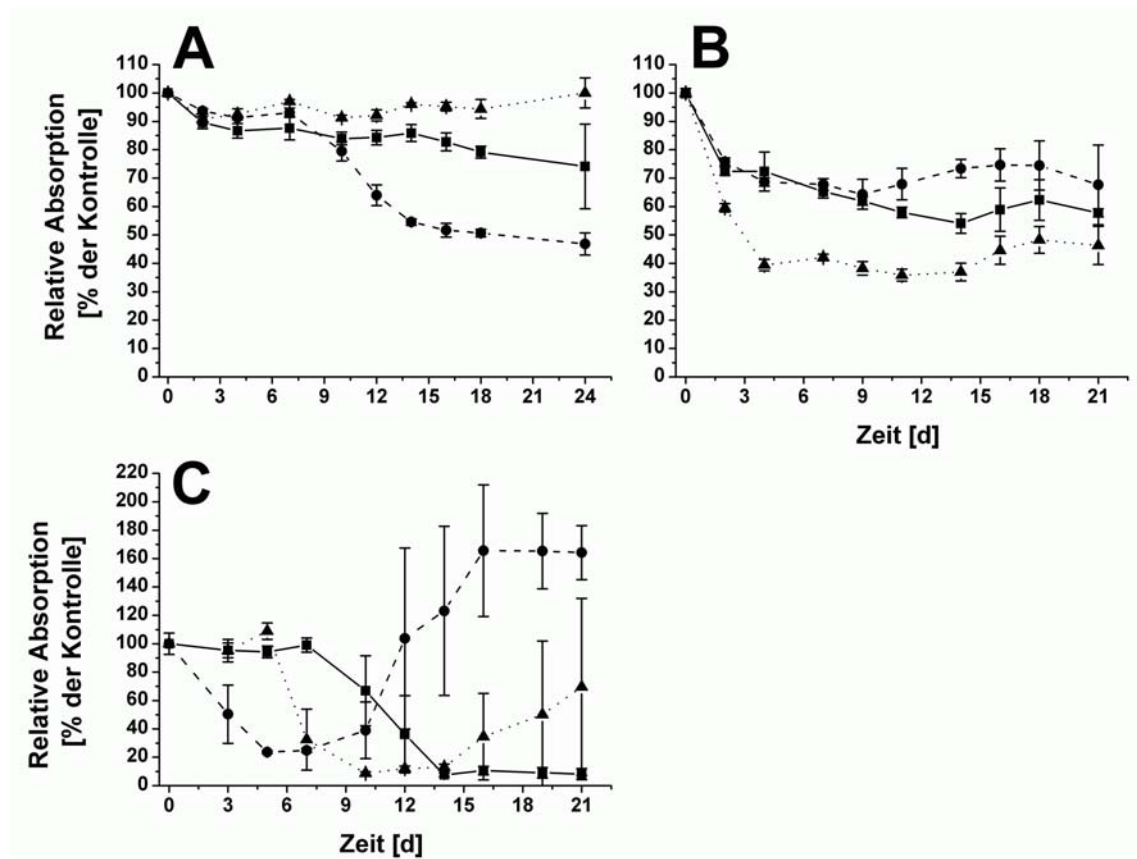


Abbildung 15: Relative Absorptionen (Integrale der Spektren von 380 – 740 nm) in Flüssigkulturen von drei aquatischen Pilzstämmen in Bezug zu abiotischen Kontrollen (■ - UHH 5-1-03, ● - KI-S5, ▲ - Tt-S1). Verwendet wurden die Farbstoffe *Acid Blue 62* (A), *Reactive Blue 19* (B) und *Acid Black 210* (C). Dargestellt sind Mittelwerte von je drei Kulturen $\pm$ Standardabweichungen. Die Medien enthielten neben 2 % ME 500 μ M des jeweiligen Farbstoffes und den Applikationsklassen der Farbstoffe entsprechende pH-Werte und Gehalte an verschiedenen Salzen (siehe Tabelle 4).

Im Fall der Reaktivfarbstoffe, für die exemplarisch RBU19 eingesetzt wurde, kommt nach Hydrolyse der Farbstoffe (siehe Abschnitt 2.2.2) ein basisches, stark salzhaltiges Färbemedium zum Einsatz (pH 10, 7 g·L⁻¹ Na₂SO₄, 2 g·L⁻¹ Na₂CO₃). Im Vergleich zu Abbildung 13 (ohne Zugabe von Salzen zum Medium) zeigten die aus salzhaltigen Gewässern isolierten Pilzstämme KI-S5 und Tt-S1 erhöhte Entfärbungsleistungen. Pilzstamm UHH 5-1-03 entfärbte die Lösung zu etwa 40 %.

Während der Entfärbung des Lederfarbstoffes ABK210 unter Modellabwasserbedingungen (pH 5) wurden erhebliche Unterschiede zwischen parallelen Kulturen beobachtet, die in hohen Standardabweichungen resultierten (Abbildung 15C). Eine Ausnahme hiervon bildeten die Kulturen des Stammes UHH 5-1-03, welche den Farbstoff nahezu vollständig entfärbten. Die Stämme KI-S5 und Tt-S1 zeigten nach anfänglicher Entfärbung der Lösung eine Absorptionszunahme. Im Fall von KI-S5 hatte die behandelte Lösung zum Ende des Experimentes eine bedeutend höhere Absorption als die mitgeführte Kontrolle.

In den Kulturen des Stammes KI-S5, welcher die höchste Entfärbung von ABu62 zeigte, konnten maximale Laccaseaktivitäten von rund 300 U·L⁻¹ gemessen werden (Abbildung 16A). Mit dem Beginn der Laccaseproduktion nach Kulturtag 7 kam es zu einer Abnahme der Absorption in den Kolben (Abbildung 15). In Kulturen der Stämme UHH 5-1-03 und Tt-S1 konnten keine Laccaseaktivitäten über 1 U·L⁻¹ gemessen werden.

Trotz des basischen pH-Wertes waren die Stämme KI-S5 und UHH 5-1-03 unter den Bedingungen des Reaktivfärbekolbchens in der Lage, aktive Laccase(n) ins Medium abzugeben (Abbildung 16B). Die Kulturen aller Pilzstämmen, die ABk210 enthielten, zeigten nur geringe Laccaseaktivitäten unter $3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt).

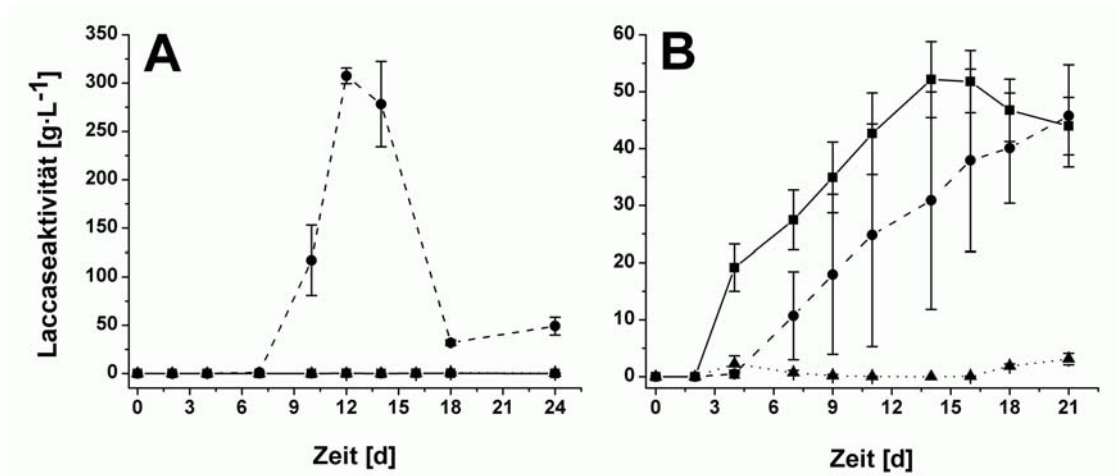


Abbildung 16: Mittelwerte und Standardabweichungen (drei parallele Kulturen) von Laccaseaktivitäten in Flüssigkulturen von drei aquatischen Pilzstämmen (■ - UHH 5-1-03, ● - KI-S5, ▲ - Tt-S1). Verwendet wurden die Farbstoffe *Acid Blue 62* (A) und *Reactive Blue 19* (B). Die Medien enthielten neben 2 % ME 500 μM des jeweiligen Farbstoffes und den Applikationsklassen der Farbstoffe entsprechende pH-Werte und Gehalte an verschiedenen Salzen. Für weitere Einzelheiten siehe Abbildung 15 und Tabelle 4.

Die spezifischen Entfärbungsraten (Tabelle 13) lassen eine erhöhte Entfärbungsleistung für RBU19 bei den Stämmen aus salzhaltigen Gewässern im Vergleich zu den in Tabelle 12 (keine Anwendung der Modellabwasserbedingungen) dargestellten Ergebnissen erkennen. Die Farbstoffe in sauren Medien wurden im Vergleich zu den in Tabelle 12 dargestellten Ergebnissen nicht oder mit geringerer Effizienz durch die Stämme KI-S5 und Tt-S1 entfärbt. Auffällig ist die gegenüber den Versuchen ohne Modellabwasserbedingungen erhöhte spezifische Entfärbungsleistung des Stammes UHH 5-1-03 für ABu62 und ABk210.

Die Entfärbungsversuche von Einzelfarbstoffen unter Modellabwasserbedingungen offenbarten deutliche Unterschiede zu den in Abschnitt 3.2.1 dargestellten Ergebnissen. Die Stämme KI-S5 und Tt-S1 zeigten insbesondere unter den stark salzhaltigen Kulturbedingungen der Reaktivfarbstoffe erhöhte spezifische Entfärbungsraten (Tabelle 12, Tabelle 13), gleichzeitig gaben die Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 eine aktive Laccase in das Medium ab (Abbildung 16). Allerdings entfärbten die Stämme KI-S5 und Tt-S1 nicht alle Farbstoffe.

Tabelle 13: Spezifische Entfärbungsraten in Flüssigkulturen von drei aquatischen Pilzstämmen (UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1), ausgedrückt als prozentuale Entfärbung (siehe Abbildung 15) pro Tag und bezogen auf die Biotrockenmasse (21 Tage Inkubation für RBU19 und ABk210; 24 Tage Inkubation für ABu62). Dargestellt sind Mittelwerte von je drei Kulturen und der Gesamtfehler. Gegeben sind nur Raten für Fälle, in denen eine signifikante Entfärbung gegenüber den jeweiligen Kontrollen ($P < 0,05$ nach Student's t-Test) gemessen wurde.

Farbstoff	Spezifische Entfärbung ($\% \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$)		
	UHH 5-1-03	KI-S5	Tt-S1
<i>Acid Blue 62</i>	$184,21 \pm 52,5$	$9,52 \pm 0,6$	-
<i>Reactive Blue 19</i>	$11,39 \pm 0,2$	$11,10 \pm 1,6$	$11,25 \pm 1,4$
<i>Acid Black 210</i>	$19,89 \pm 0,7$	-	-

3.2.3. Farbstoffgemische in Modellabwässern mit Malzextrakt

In Abbildung 17 sind die Farbstoffabsorptionen von vier Modellabwässern mit Farbstoffgemischen und ME (Tabelle 4) während der Inkubation mit jeweils drei aquatischen Pilzstämmen (UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1) gezeigt.

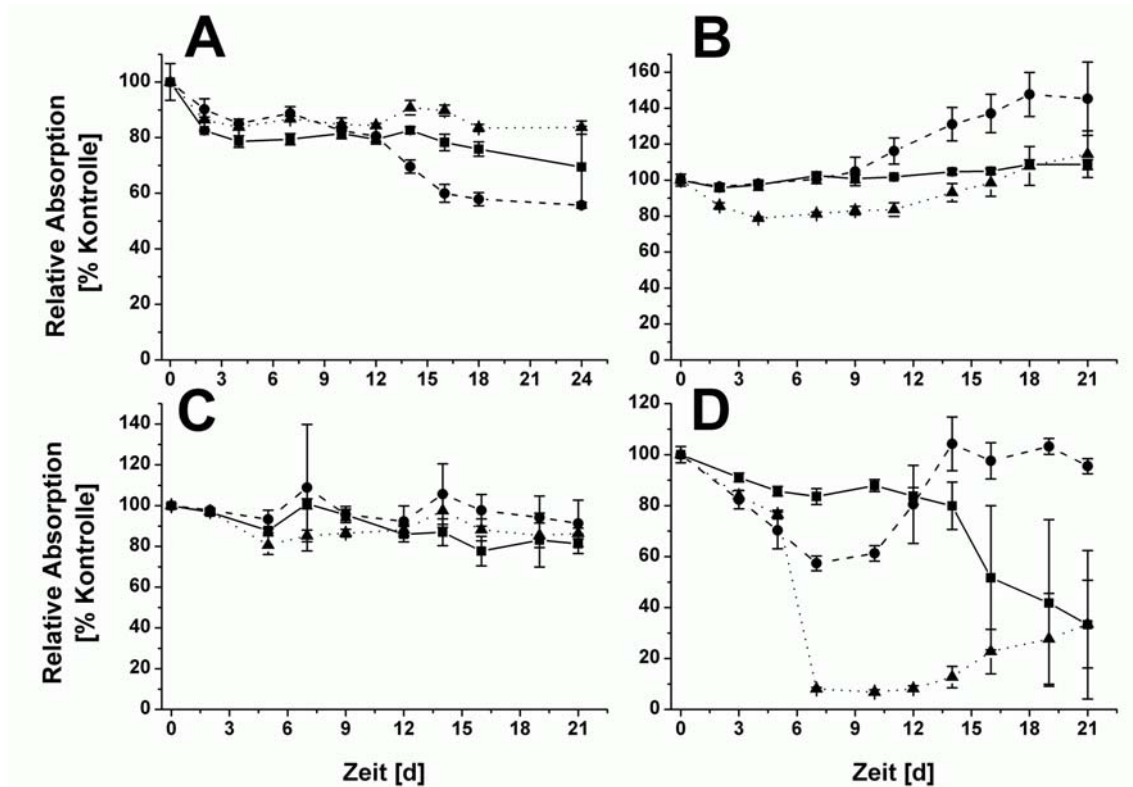


Abbildung 17: Relative Absorptionen (Integrale der Spektren von 380 – 740 nm) in Flüssigkulturen unter Modellabwasserbedingungen von drei aquatischen Pilzstämmen in Bezug zu Kontrollen, die uninokuliert blieben (■ - UHH 5-1-03, ● - KI-S5, ▲ - Tt-S1). (A) Saures Modellabwasser für Wolle, (B) Modellabwasser für Baumwollreaktivfarbstoffe, (C) Modellabwasser für Baumwolldirektfarbstoffe, (D) Saures Modellabwasser für Leder. Dargestellt sind Mittelwerte von je drei Kulturen $\pm$ Standardabweichungen. Die Medien enthielten neben 2 % ME ein Gemisch von Farbstoffen sowie verschiedene Salze und Säuren, wie in Tabelle 4 vermerkt.

Das saure Modellabwasser für Wolle wurde von allen verwendeten Stämmen in signifikantem Maße entfärbt (Abbildung 17A). In Kulturen des Stammes KI-S5 konnten parallel hohe Laccaseaktivitäten gemessen werden (Abbildung 18). Gleichzeitig mit dem Beginn der Laccaseproduktion wurde eine Abnahme der Absorption in Kolben des Stammes KI-S5 gemessen (beginnend am Kulturtag 10). Die Laccaseaktivitäten von Stamm UHH 5-1-03 und Stamm Tt-S1 blieben während des gesamten Experimentes unter $1 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Stamm KI-S5 zeigten die Stämme UHH 5-1-03 und Tt-S1 ein geringes Wachstum ($0,13 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. $0,19 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Trockenmassezunahme während des Versuches). Daher wurde für diese Stämme eine höhere spezifische Entfärbungsrate erhalten, obwohl die höchste Entfärbung durch den Stamm KI-S5 erreicht wurde (Tabelle 14).

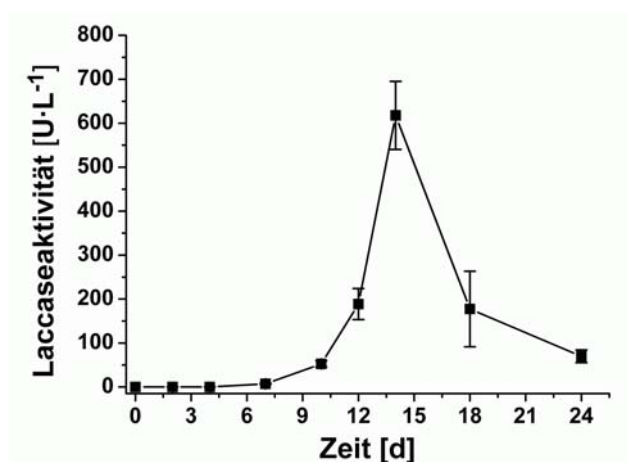


Abbildung 18: Mittelwerte und Standardabweichungen von Laccaseaktivitäten in drei parallelen Flüssigkulturen des Stammes Kl-S5 unter Bedingungen des sauren Modellabwassers für Wolle (Tabelle 4). Das Medium enthielt zusätzlich 2 % ME. Für weitere Einzelheiten siehe Abbildung 17 und Abschnitt 2.2.2. Laccaseaktivitäten der Stämme UHH 5-1-03 und Tt-S1 blieben unter diesen Bedingungen $< 1 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$.

Das Modellabwasser für Reaktivfarbstoffe wurde von keinem Stamm entfärbt (Abbildung 17B). Ein Anstieg der Absorption wurde in Kulturen des Stammes Kl-S5 beobachtet. Dies war, nach anfänglicher Entfärbung der Lösungen, auch für Stamm Tt-S1 der Fall. Die gemessene Laccaseaktivität überstieg in keinem Fall $0,8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt).

In den Kolben, die das Modellabwasser für Direktfarbstoffe enthielten (Abbildung 17C), wurde eine geringe Entfärbung gemessen, die in Kulturen der Stämme UHH 5-1-03 und Tt-S1 signifikant war. Die spezifischen Entfärbungsraten dieser beiden Stämme waren niedrig, aber vergleichbar (Tabelle 14). In keinem Fall konnten Laccaseaktivitäten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Das saure Modellabwasser für Leder wurde von den Stämmen Tt-S1 und UHH 5-1-03 entfärbt (Abbildung 17D). Während eine nahezu vollständige Entfärbung in Kulturen des Stammes Tt-S1 nach sieben Kulturtagen zu verzeichnen war, stieg die Absorption, beginnend am Kulturtag 12, bis zum Ende des Experimentes an. Unterschiede in der Entfärbungsleistung zwischen einzelnen Kolben des Stammes UHH 5-1-03 führten zu hohen Standardabweichungen, dennoch konnte eine signifikante Entfärbung erreicht werden. Obwohl eine ähnliche Entfärbung durch den Stamm Tt-S1 am Ende des Experimentes verglichen mit Stamm UHH 5-1-03 gemessen wurde, unterschieden sich die spezifischen Entfärbungsraten durch die geringere Biotrockenmasse des Stammes Tt-S1 ($6,56 \pm 1,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ im Vergleich zu $8,45 \pm 0,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). In den Kulturen des Stammes Kl-S5 wurde eine anfängliche Entfärbung gemessen, am Ende des Experimentes konnte jedoch keine signifikante Abnahme der Absorption mehr festgestellt werden. Die Laccaseaktivitäten waren in allen Kolben gering (maximal $9,37 \pm 17,3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, Daten nicht gezeigt).

Tabelle 14: Spezifische Entfärbungsraten von Farbstoffgemischen in Flüssigkulturen dreier aquatischer Pilzstämme (UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1) unter Modellabwasserbedingungen, ausgedrückt als relative Entfärbung (%) pro Tag (d, Abbildung 17) und Gramm Trockenmasse (g TM), bezogen auf den letzten Tag des Versuches. Gegeben sind nur Raten für Fälle, in denen eine signifikante Entfärbung gegenüber den jeweiligen Kontrollen ($P < 0,05$ nach Student's t-Test) gemessen wurde.

Modellabwasser	Spezifische Entfärbung ($\% \cdot d^{-1} \cdot (g \text{ TM})^{-1}$)		
	UHH 5-1-03	KI-S5	Tt-S1
Saures Färbebad für Wolle	429,10 $\pm$ 65,7	14,94 $\pm$ 0,8	176,93 $\pm$ 4,3
Reaktivfärbebad für Baumwolle	-	-	-
Direktfärbebad für Baumwolle	5,65 $\pm$ 0,4	-	6,10 $\pm$ 0,2
Saures Färbebad für Leder	30,16 $\pm$ 6,3	-	40,91 $\pm$ 7,7

3.2.4. Einzelfarbstoffe ohne zusätzliche Nährstoffquelle

In den Abschnitten 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 wurden die Entfärbungsleistungen der untersuchten Pilzstämme jeweils unter der Verwendung von ME als Kohlenstoff- und Energiequelle getestet. Aufgrund des dadurch möglichen Wachstums und somit zunehmender Biomasse war es nicht möglich, die mit großer Wahrscheinlichkeit auftretende Sorption der Farbstoffe an das Myzel zu quantifizieren. Um die Sorption als einen Faktor der Entfärbung von Lösungen ausschließen zu können, wurden Entfärbungsversuche mit Pilzkulturen ohne zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequellen in zwei Zyklen durchgeführt („ruhende“ Biomasse). Dazu wurden die Pilzstämme zunächst in Malzextraktmedium kultiviert, nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde das Myzel in Farbstofflösungen ohne ME überführt. Nach einwöchiger Inkubation wurde das Myzel in eine frische Farbstofflösung transferiert und erneut inkubiert. Nach dem ersten Zyklus, in dem keine Zunahme der Biotrockenmassen stattfand, war davon auszugehen, dass alle eventuell auftretenden Sorptionsprozesse ein Equilibrium erreicht hatten. Somit wurde eine Beteiligung von Sorptionsprozessen an der Entfärbung im zweiten Zyklus unwahrscheinlich gemacht. Gleichzeitig konnte so die Eignung der Stämme hinsichtlich der Entfärbungsleistung über einen längeren Zeitraum ohne zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequellen untersucht werden.

In keinem Fall wurden die Entfärbungsraten des ersten Zyklus im zweiten Zyklus erreicht (Abbildung 19). Als mögliche Ursachen kommen eine Sorption der Farbstoffe an das Myzel während des ersten Zyklus sowie eine verringerte Entfärbungsleistung der Stämme im zweiten Zyklus in Betracht, die möglicherweise zusammenwirkten. In keinem Kolben konnte eine Laccaseaktivität über $2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Der Stamm UHH 5-1-03 entfärbte während des ersten Zyklus alle Farbstoffe nahezu vollständig. Im zweiten Zyklus war der Stamm in der Lage, die Absorptionen der Lösungen mit ABu62, DBu71 und ABk210 um mehr als 50 % zu verringern. Einzig für den Farbstoff RBu19

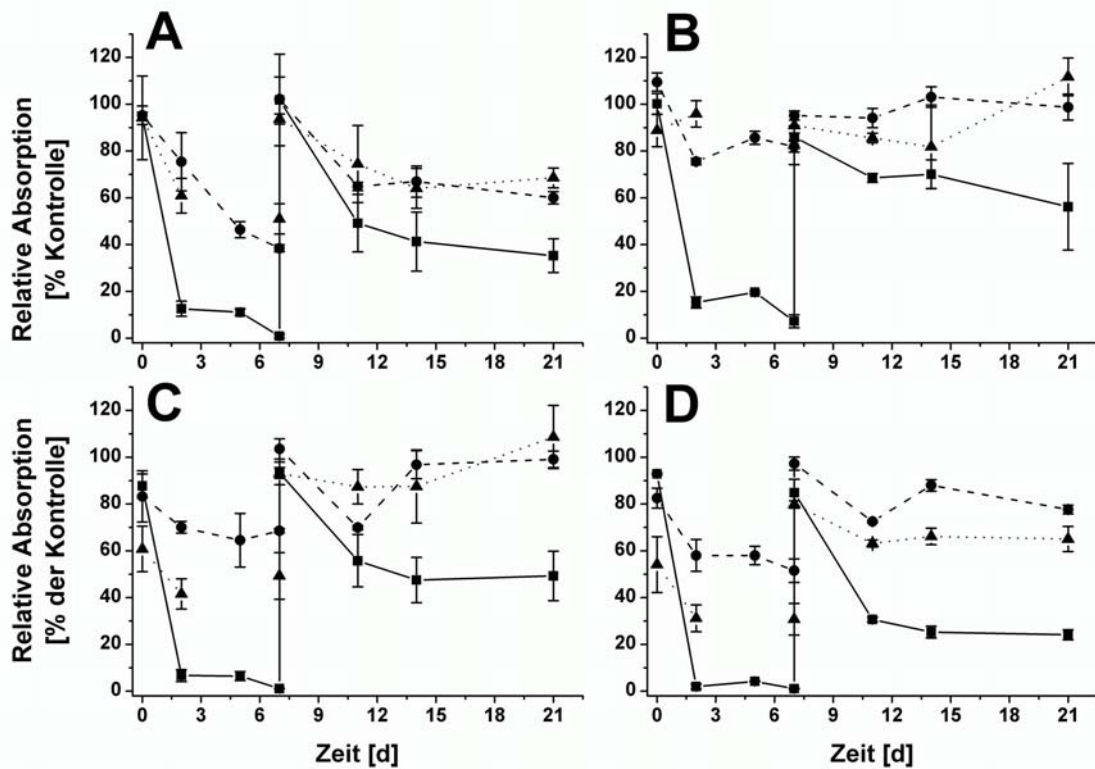


Abbildung 19: Relative Absorptionen (Integrale der Spektren von 380 – 740 nm) in Flüssigkulturen mit zuvor angezogener Biomasse von drei aquatischen Pilzstämmen in Bezug zu Kontrollen, die uninokuliert blieben (■ - UHH 5-1-03, ● - KI-S5, ▲ - Tt-S1). Verwendet wurden die Farbstoffe *Acid Blue 62* (A), *Reactive Blue 19* (B), *Direct Blue 71* (C) und *Acid Black 210* (D) (jeweils 500 µM). Dargestellt sind Mittelwerte von je drei Kulturen ± Standardabweichungen. Am Kulturtag 7 wurde das Myzel in neue Farbstofflösungen transferiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

wurde eine geringere Entfärbung erreicht (> 40 %). Stamm KI-S5 erreichte im ersten Zyklus eine maximale Entfärbung von rund 61 % (ABu62). Am Ende des zweiten Zyklus war nur in Kulturen mit ABu62 und ABk210 eine signifikante Absorptionsabnahme zu verzeichnen. Bei Stamm Tt-S1 war die Absorption der Lösungen mit DBu71 und ABk210 zum Zeitpunkt der ersten Probenahme bereits um etwa 40 % gesunken. Stamm Tt-S1 konnte keinen Farbstoff während des ersten Zyklus vollständig entfärben. Während des zweiten Zyklus kam es für ABu62 und ABk210 zu einer geringen Absorptionsabnahme, in Kolben mit RBU19 und DBu71 war eine Absorptionszunahme zu beobachten.

Tabelle 15: Spezifische Entfärbungsraten von Farbstofflösungen, inkubiert mit Myzel von drei aquatischen Pilzstämmen (UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1) und dargestellt als prozentuale Entfärbung (siehe Abbildung 19) pro Tag und bezogen auf die Biotrockenmasse (g TM). Gegeben ist sind Mittelwerte von drei parallelen Kulturen ± Gesamtfehler. Es sind keine spezifischen Entfärbungsraten für Fälle gegeben, bei denen keine signifikante Entfärbung auftrat ($P > 0,05$ nach Student's t-Test).

Farbstoff	Spezifische Entfärbung ($\% \cdot d^{-1} \cdot (g \text{ TM})^{-1}$)		
	UHH 5-1-03	KI-S5	Tt-S1
<i>Acid Blue 62</i>	$19,66 \pm 3,3$	$17,74 \pm 1,2$	$19,53 \pm 2,1$
<i>Reactive Blue 19</i>	$13,66 \pm 1,0$	-	-
<i>Direct Blue 71</i>	$16,01 \pm 1,6$	-	-
<i>Acid Black 210</i>	$23,36 \pm 1,5$	$12,22 \pm 0,6$	$20,78 \pm 0,9$

Für Stamm UHH 5-1-03 wurden in diesem Versuch höhere spezifische Entfärbungsraten für ABu62 und ABk210 (Tabelle 15), verglichen mit den in Tabelle 12 dargestellten Werten in Anwesenheit von ME bestimmt. Der Stamm KI-S5 war nicht in der Lage, RBU19 und DBu71 zu entfärben. Für ABu62 und ABk210 wurden ähnliche spezifische Entfärbungsraten bestimmt (vgl. Tabelle 12). Stamm Tt-S1 konnte RBU19 und DBu71 nicht entfärben. Die spezifischen Entfärbungsraten für ABu62 und ABk210 (Tabelle 15) sind im Rahmen der Standardabweichungen vergleichbar (Tabelle 12). Da für die Proben dieses Versuches am Ende des zweiten Zyklus eine Verringerung der Farbstoffkonzentration aufgrund von Sorptionseffekten unwahrscheinlich war (siehe oben) und eine Konzentrationsabnahme somit auf eine Umsetzung der Farbstoffe durch die Pilzkulturen zurückzuführen war, wurde neben der Messung mit fotometrischen Methoden eine massenspektrometrische Quantifizierung der Farbstoffe durchgeführt. Dabei wurde der *multiple reaction mode* verwendet, welcher eine sehr spezifische und quantitative Detektion bestimmter Verbindungen ermöglicht. Die Ergebnisse sind vergleichend in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Änderungen der Farbstoffkonzentration und Absorption nach Behandlung von Einzelfarbstoffen (500 µM) durch drei Stämme aquatischer Pilze (UHH 5-1-03, KI-S5, Tt-S1) in Erlenmeyerkolben relativ zu parallel mitgeführten Kontrollen, die uninokuliert blieben (Dauer 14 Tage). Farbstoffkonzentrationen wurden massenspektrometrisch (MS/MS) im *multiple reaction mode* (MRM) ohne vorherigen Säulenauftrennung bestimmt. Für fotometrische Absorptionsmessungen wurden Spektren in einem Bereich von 380-740 nm integriert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 3) von parallelen Kulturen. FS-Konz. – Farbstoffkonzentration.

Farbstoff	UHH 5-1-03		KI-S5		Tt-S1	
	FS-Konz. (%)	Absorption (%)	FS-Konz. (%)	Absorption (%)	FS-Konz. (%)	Absorption (%)
<i>Acid Blue 62</i>	3,83 ± 3,1	35,29 ± 7,3	0,18 ± 0,1	60,00 ± 2,7	3,46 ± 2,6	68,52 ± 4,5
<i>Reactive Blue 19</i>	81,51 ± 8,3	56,16 ± 18,5	95,63 ± 3,7	98,74 ± 5,5	83,51 ± 1,8	111,7 ± 8,1
<i>Direct Blue 71</i>	57,63 ± 12,7	49,28 ± 0,5	88,67 ± 8,6	99,08 ± 3,5	83,91 ± 5,4	108,7 ± 13,5
<i>Acid Black 210</i>	0,33 ± 0,2	24,14 ± 2,2	8,67 ± 1,5	77,67 ± 1,9	7,93 ± 1,0	65,04 ± 5,4

In Übereinstimmung mit den spektrofotometrisch gewonnenen Daten war Stamm UHH 5-1-03 auch auf Basis der massenspektrometrischen Ergebnisse der Effizienteste unter den untersuchten Stämmen. Tabelle 16 ist zu entnehmen, dass die Abnahme der Farbstoffkonzentration nicht in allen Fällen mit einer entsprechenden Abnahme der Gesamtfärbung der Lösung verbunden war. In den Fällen, in denen eine nahezu vollständige Entfernung der Farbstoffe aus den Lösungen durch massenspektrometrische Methoden bestimmt wurde (ABu62 und ABk210), war die Absorption der Lösungen nicht in vergleichbarem Maß herabgesetzt. Wird vorausgesetzt, dass die gemessene Konzentrationsabnahme durch eine Biotransformation erreicht wurde, kann die Entfärbung somit nicht mit einer Biotransformation in den entsprechenden Lösungen gleichgesetzt werden. Die Entfärbung stellt jedoch das zentrale Kriterium hinsichtlich einer praktischen Anwendung dar, daher ist die Bestimmung der Absorption zur Evaluierung geeigneter Stämme unabdingbar. Davon getrennt müssen die beteiligten Mechanismen untersucht werden, die wie in Abschnitt

3.1.3 gezeigt, zu gefärbten Transformationsprodukten führen können und somit ebenfalls wertvolle Informationen für die Auswahl eines geeigneten Organismus liefern.

Die für diesen Versuch gewählten Bedingungen bestätigten die Robustheit der in Kapitel Abschnitt 3.2.1 dargestellten Daten und belegen weiterhin, dass, zumindest für die in diesem Abschnitt untersuchten Farbstoffe, Biotransformationsreaktionen als verantwortlich für die Entfärbung angenommen werden können und eine Entfärbung durch Sorption ausgeschlossen ist. Darüber hinaus bestätigte sich, dass die Stämme Kl-S5 und Tt-S1 im Gegensatz zu Stamm UHH 5-1-03 nicht in der Lage waren, alle verwendeten Farbstofflösungen effizient zu entfärben.

3.2.5. Farbstoffgemische in Modellabwässern ohne Malzextrakt

Die Entfärbung von Farbstoffgemischen in Modellabwässern durch aquatische Pilze ohne zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequelle im Medium wurde in zwei Zyklen durchgeführt, um den Einfluss von Sorptionsprozessen an den gemessenen Entfärbungen während des zweiten Zyklus (Abbildung 20) ausschließen zu können (vgl. vorheriger Abschnitt).

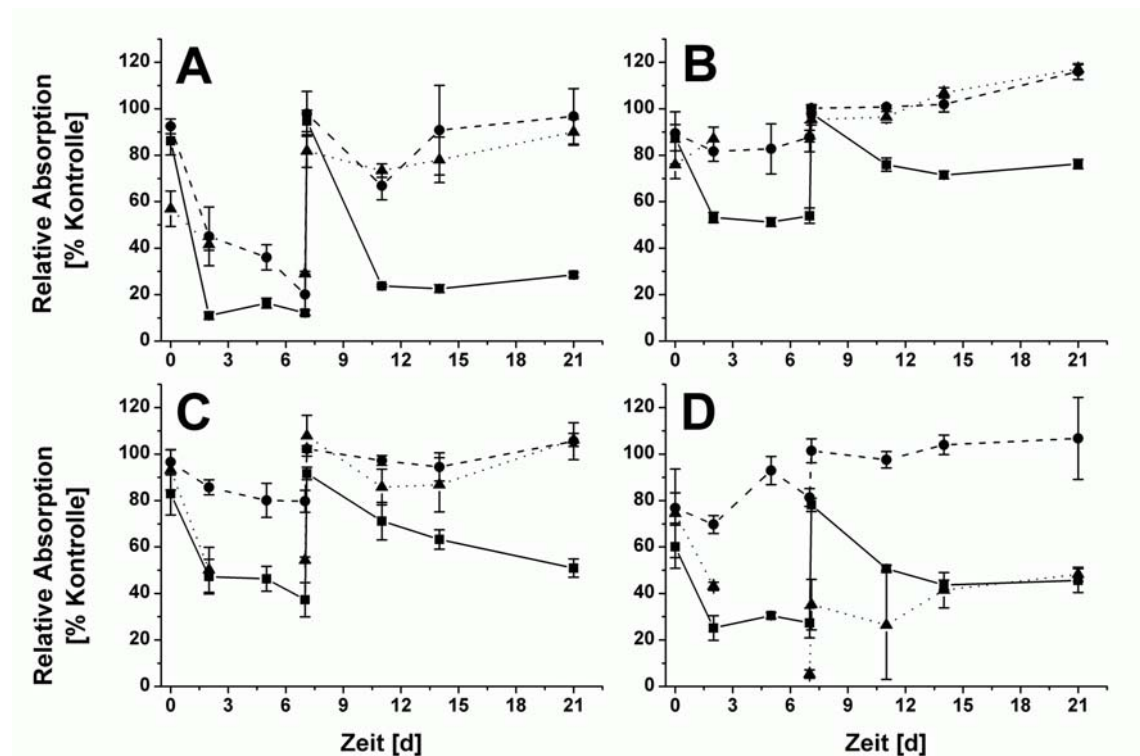


Abbildung 20: Entfärbung von Modellabwässern (Tabelle 4) durch zuvor angezogene Biomasse dreier aquatischer Pilzstämme (■ - UHH 5-1-03, ● - Kl-S5 und ▲ - Tt-S1) ohne zusätzliche Nährstoffquelle im Medium. (A) Saures Modellabwasser für Wolle, (B) Modellabwasser für Baumwollreaktivfarbstoffe, (C) Modellabwasser für Baumwolldirektfarbstoffe, (D) Saures Modellabwasser für Leder. Gezeigt sind Mittelwerte von drei parallelen Kulturen und Standardabweichungen der relativen Absorptionen (integrierte Spektren von 380-740 nm) bezogen auf abiotische Kontrollen. Nach sieben Tagen wurden die Modellabwässer durch frische Lösungen ersetzt.

Da die verwendeten Modellabwässer eine praxisrelevante Zusammensetzung besaßen und keine weiteren Nährstoffe verwendet wurden, die zur Erhöhung des CSB beigetragen hätten, wurde am Ende des Versuchs eine CSB-Messung als zusätzlicher Parameter zur Einschätzung

der Effizienz der biologischen Behandlung der Modellabwässer durchgeführt (Tabelle 17). In keinem Fall wurde eine Laccaseaktivität $> 1 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ verzeichnet (Daten nicht gezeigt).

Stamm Tt-S1 entfärbte beide saure sowie das Modellabwasser für Direktfarbstoffe während des ersten Zyklus. Mit Ausnahme des Modellabwassers für Leder konnte keine signifikante Entfärbung im Vergleich zur Kontrolle während des zweiten Zyklus gemessen werden. Da die Absorption im Modellabwasser für Leder am Ende des Versuches höher als zu Beginn des zweiten Zyklus war, wurde die spezifische Entfärbungsrate nicht berechnet. Stamm KI-S5 entfärbte keines der Modellabwässer während des zweiten Zyklus. Stamm UHH 5-1-03 war in der Lage, alle Modellabwässer während des ersten und des zweiten Zyklus effizient zu entfärben. Die spezifischen Entfärbungsraten betrugen $29,74 \pm 0,9 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$ für das saure Modellabwasser für Wolle, $7,73 \pm 0,9 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$ für das Modellabwasser für Reaktivfarbstoffe, $15,45 \pm 1,2 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$ für das Modellabwasser für Direktfarbstoffe und $18,04 \pm 1,2 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$ im Fall des sauren Modellabwassers für Leder.

Die CSB-Werte der behandelten Lösungen wurden am Ende des Versuches bestimmt (Tabelle 17). Die Abnahme des CSB war nicht an die Absorptionsabnahme gekoppelt (Abbildung 20). Stamm UHH 5-1-03 senkte den CSB in einem höheren Maße als die übrigen Stämme. Eine Ausnahme bildet das saure Modellabwasser für Wolle, hier zeigte Stamm KI-S5 den höchsten Rückgang.

Tabelle 17: Änderungen des chemischen Sauerstoffbedarfs und der Absorption nach Behandlung von Modellabwässern ohne zusätzliche Nährstoffquelle (Tabelle 4) durch zuvor angezogene Biomasse dreier Stämme aquatischer Pilze (UHH 5-1-03, KI-S5, Tt-S1) relativ zu parallel mitgeführten Kontrollen, die uninokuliert blieben (Dauer 14 Tage). CSB-Werte wurden mit der genormten Dichromat-Methode bestimmt. Spektren wurden in einem Bereich von 380-740 nm aufgenommen und integriert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 3$) von parallelen Kulturen.

Modellabwasser	UHH 5-1-03		KI-S5		Tt-S1	
	CSB (%)	Absorption (%)	CSB (%)	Absorption (%)	CSB (%)	Absorption (%)
Saures Färbebad für Wolle	$86,21 \pm 3,1$	$28,54 \pm 1,0$	$23,07 \pm 4,2$	$96,69 \pm 12$	$82,52 \pm 9,6$	$89,94 \pm 5,6$
Reaktivfärbebad für Baumwolle	0	$76,23 \pm 2,0$	$5,22 \pm 5,6$	$116,0 \pm 3,5$	$34,78 \pm 10$	$117,1 \pm 1,9$
Direktfärbebad für Baumwolle	$24,01 \pm 0,9$	$50,94 \pm 3,9$	$46,34 \pm 7,2$	$105,5 \pm 8,0$	$36,20 \pm 3,8$	$106,1 \pm 2,8$
Saures Färbebad für Leder	$58,28 \pm 15$	$45,56 \pm 5,1$	$95,71 \pm 20$	$106,7 \pm 18$	$76,69 \pm 39$	$48,28 \pm 3,1$

Unter den verwendeten Bedingungen war UHH 5-1-03 der einzige Stamm, der Modellabwässer nach wiederholter Zugabe entfärbte. Bei Berücksichtigung aller Modellabwässer war er außerdem der effizienteste Stamm hinsichtlich der Reduzierung des CSB, was gleichzeitig auf breite Einsatzmöglichkeiten im Hinblick auf unterschiedlich zusammengesetzte Färbereiabwässer hindeutet. Aus diesen Gründen wurde er für weitergehende Experimente in Bioreaktoren im Labormaßstab (Abschnitt 3.3) ausgewählt.

3.2.6. Massenspektrometrie des Abbaus von *Acid Blue 62*

Für die Untersuchungen kam Flüssigkeitschromatografie in Verbindung mit Elektrosprayionisation und zweidimensionaler Massenspektrometrie zum Einsatz (Abschnitt 2.3.7). Verwendet wurden Proben der Entfärbungsversuche von ABu62 in Flüssigkulturen mit ME (Kulturtag 7, Abschnitt 3.2.1), der Entfärbungsversuche von ABu62 in Flüssigkulturen unter Modellabwasserbedingungen mit ME (Kulturtag 7, Abschnitt 3.2.2) und der Entfärbungsversuche von ABu62 in Flüssigkulturen ohne ME (Kulturtag 7 des zweiten Entfärbungszyklus, Abschnitt 3.2.4). Darüber hinaus wurde eine enzymatisch behandelte Lösung von ABu62 untersucht (gereinigte Laccase aus UHH 5-1-03, 72 h Inkubation, Abschnitt 3.4.2). Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 18 und Anhang III dargestellt.

Tabelle 18: Massenspektrometrische Daten (ESI-MS/MS), Retentionszeiten (LC) und Vorkommen von *Acid Blue 62* und dessen Biotransformationsprodukten in behandelten Farbstofflösungen. Verwendet wurden die Pilzstämmen UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1 sowie gereinigte Laccase aus UHH 5-1-03. Dargestellt sind nur Verbindungen, die in den entsprechenden Kontrollen nicht nachweisbar waren. 1 – Proben nach siebentägiger Inkubation mit Pilzkulturen mit ME und 500 µM *Acid Blue 62*, 2 – Proben nach siebentägiger Inkubation mit Pilzkulturen mit ME unter Modellabwasserbedingungen und 500 µM *Acid Blue 62*, 3 – Proben nach siebentägiger Inkubation von 500 µM *Acid Blue 62* mit Pilzkulturen ohne ME, 4 – Proben nach 72-stündiger Inkubation von 500 µM *Acid Blue 62* mit gereinigter Laccase aus UHH 5-1-03 (500 U·L⁻¹). Fett dargestellt sind die Fragmentionen von *Acid Blue 62*. R_t – Retentionszeit.

Nr.	<i>m/z</i> des Molekülions und relative Intensitäten [%]	<i>m/z</i> der Fragmentionen und relative Intensitäten [%]	R _t [min]	UHH 5-1-03				KI-S5			Tt-S1		
				1	2	3	4	1	2	3	1	2	3
I	302 ([M-Na] ⁺ , 51)	238 (100)	12,54	+			+						
II	427 ([M-Na] ⁺ , 9)	407 (3); 399 (100); 381 (21); 335 (10); 316 (34)	13,76	+	+	+		+	+	+	+	+	+
III	441 ([M-Na] ⁺ , 100)	423 (7); 399 (68); 381 (9); 358 (3); 335 (14); 316 (11)	13,59	+	+			+	+	+	+	+	+
IV	457 ([M-Na] ⁺ , 100)	439 (6); 411 (3); 399 (82); 381 (6); 335 (7); 316 (5)	13,51	+	+	+		+	+	+	+		+
V	459 ([M-Na] ⁺ , 34)	441 (16); 411 (4); 347 (4); 317 (100); 303 (3)	11,06	+			+	+	+	+	+		
VI	471 ([M-Na] ⁺ , <1)	427 (<1); 410 (<1); 399 (100); 381 (9); 335 (3); 316 (10)	12,41	+									
VII	511 ([M-Na] ⁺ , 57)	493 (3); 481 (2); 465 (1); 449 (2); 437 (1); 431 (5); 408 (2); 399 (100); 381 (6); 358 (9); 335 (2); 316 (4)	13,28	+				+			+		
VIII	541 ([M-Na] ⁺ , 83)	523 (8); 511 (4); 505 (4); 493 (3); 423 (1); 399 (100); 381 (3); 335 (1)	13,00	+				+					
IX	543 ([M-Na] ⁺ , 100)	525 (6); 513 (10); 399 (30)	13,72	+				+			+		
X	673 ([M-Na] ⁺ , <1)	557 (3); 539 (6); 495 (30); 481 (4); 463 (4); 441 (100); 409 (43); 381 (8)	13,39	+									
XI	713 ([M-Na] ⁺ , 100)	649 (<1); 633 (2); 605 (7); 541 (<1); 525 (<1); 384 (12); 317 (2)	24,60	+			+			+			+
	399 ([M-Na] ⁺ , 100)	381 (35); 335 (18); 316 (62)	15,72	+	+	+		+	+	+	+	+	+

Alle in Tabelle 18 dargestellten Metaboliten konnten in den Kulturen von UHH 5-1-03, die ME und ABu62 enthielten, nachgewiesen werden. Dargestellt sind nur Verbindungen, die in keiner Kontrolle nachweisbar waren. Unter Modellabwasserbedingungen wurden ausschließlich die Metabolite II, III, IV und V detektiert, dies gilt ebenfalls für die Proben des Stammes UHH 5-1-03, die keinen ME enthielten. In Lösungen ohne ME der Stämme Kl-S5 und Tt-S1 wurde darüber hinaus der Metabolit XI nachgewiesen. In laccasebehandelten Farbstofflösungen wurden die Metabolite I, V und XI gefunden. Stamm Kl-S5 bildete unter allen Bedingungen die Metabolite II-V, wohingegen der Metabolit I nicht nachweisbar war. Gleiches gilt für den Stamm Tt-S1. Ebenso wurden die Metabolite VII und IX in den malzextrakthaltigen Kulturen der Stämme Kl-S5 und Tt-S1 detektiert, jedoch nicht unter den sonstigen Kulturbedingungen.

Acid Blue 62 ($422 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{SNa}$) wurde in Form des Moleküliions $[\text{M}\cdot\text{Na}]^{-}$ mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 399 detektiert. Dem Farbstoff wurden die in Tabelle 18 angegebenen Fragmentationen zugeordnet. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Proben war die Konzentration des Moleküliions nach der Behandlung mit Laccase aus UHH 5-1-03 unter die Nachweisgrenze gefallen. Gleichzeitig wurden verschiedene Verbindungen in den Lösungen detektiert, die durch ihr Fragmentationenmuster auf modifizierte ABu62-Moleküle schließen lassen (Verbindungen II, III, IV, VI, VII, VIII, IX und X in Tabelle 18, Fragmente von ABu62 fett markiert). Diese sind somit als Biotransformationsprodukte des Farbstoffs anzusehen, da diese Verbindungen in entsprechenden Kontrollen nicht nachzuweisen waren. Abbildung 21 zeigt Strukturvorschläge für einige dieser Verbindungen.

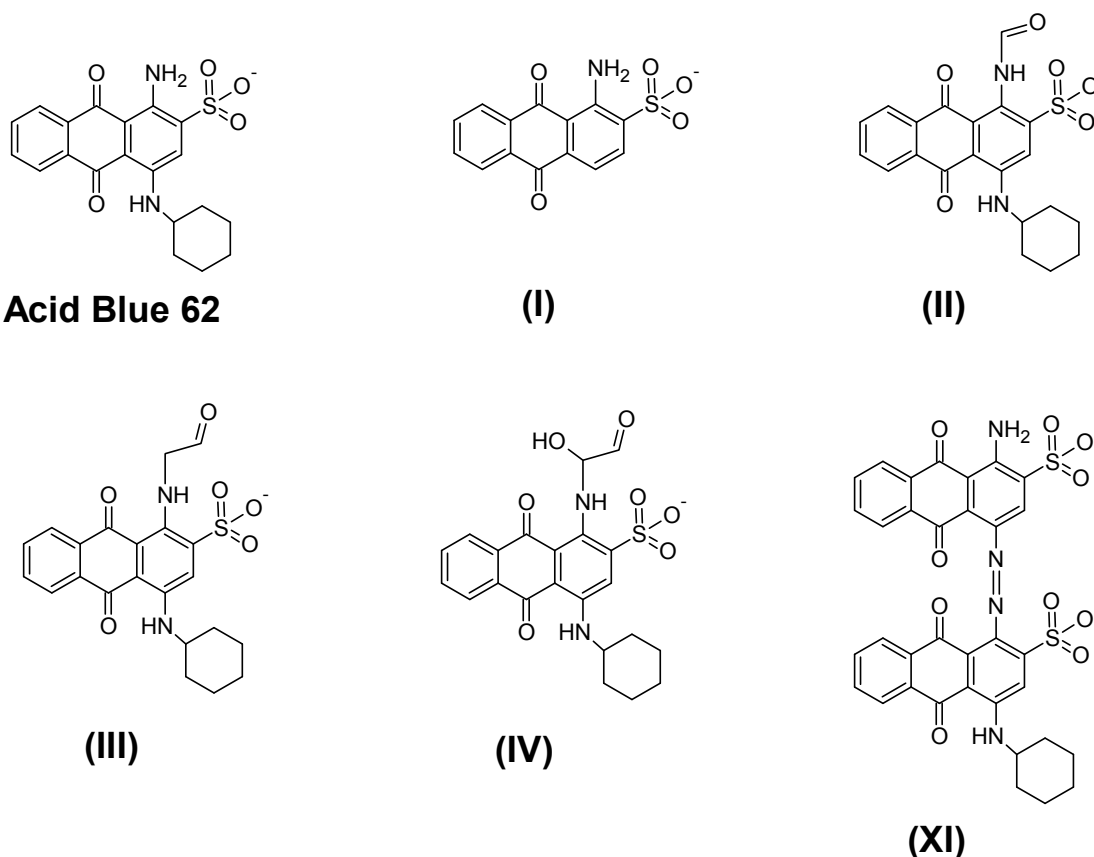


Abbildung 21: Strukturvorschläge für Biotransformationsprodukte von *Acid Blue 62*. Römische Ziffern beziehen sich auf Tabelle 18.

In allen in dieser Abbildung dargestellten Strukturen wurde eine Funktionalisierung des ABu62-Moleküls vorausgesetzt und Strukturvorschläge auf dieser Basis gemacht. Im Falle des Metaboliten II spricht die Massendifferenz von 28 amu zwischen Molekülion und dem Fragment m/z 399 für die Abspaltung von $-\text{CO}$ vom ABu62-Gerüst. Die Differenz von 42 amu zwischen dem Molekülion von Metabolit III und dem Fragment m/z 399 lässt sich mit dem Verlust einer $-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ Einheit erklären. Die Differenz von 28 amu zwischen den Fragmenten m/z 439 und m/z 411 des Metaboliten (IV) sind wiederum auf den Verlust von $-\text{CO}$ zurückzuführen, die Differenz des Molekülions zum Fragment m/z 399 lässt eine Funktionalisierung des ABu62-Moleküls mit einer $-\text{C}_2\text{HO}_2$ Gruppe vermuten. Die genaue Struktur dieser und der höhermolekularen Metaboliten, für die an dieser Stelle keine Strukturvorschläge gemacht wurden, müssen mit weiteren analytischen Methoden bestätigt werden. Für die Metaboliten I und XI wurden Strukturen angegeben, die von Vanhulle *et al.* (277) während der Biotransformation von ABu62 durch verschiedene Weißfäulepilze mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert und deren Struktur durch ^1H und ^{13}C NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz) bestätigt wurde. Im Falle des Metaboliten XI wurde das $[\text{M}-2\text{Na}]^{2-}$ Molekülion mit m/z 356 ebenfalls identifiziert (Anhang III). Die Strukturen der Metabolite I und XI werden aufgrund der gleichen Fragmentierungsmuster, wie in Messungen von Vanhulle *et al.* (277) als gesichert angesehen (S. Vanhulle, persönliche Mitteilung).

3.3. Entfärbungsversuche in Bioreaktoren

Mit Versuchen in Bioreaktoren sollte untersucht werden, ob eine Immobilisierung von Myzel des Stammes UHH 5-1-03 im Vergleich zu nicht immobilisierter Biomasse geeignet ist, um Farbstofflösungen zu behandeln. Des Weiteren sollte mit diesen Versuchen ein weiterer Schritt in Richtung einer denkbaren praktischen Anwendung gemacht werden. Der Stamm UHH 5-1-03 wurde auf Basis der in Abschnitt 3.2.5 dargestellten Ergebnisse ausgewählt.

3.3.1. Entfärbung von *Reactive Blue 19* in einem *airlift*-Reaktor

In diesem Versuch wurde die Entfärbung von RBU19 unter realitätsnahen Bedingungen (Zugabe von Na_2CO_3 zur Lösung, alkalischer pH-Wert) durch immobilisiertes Myzel des Stammes UHH 5-1-03 untersucht. Die Immobilisierung unter Nutzung kommerziell erhältlicher Dunstabzugshaubenfilter als Träger- bzw. Aufwuchsmaterial stellte sich als kostengünstige und effektive Art der Immobilisierung von Myzel des Stammes UHH 5-1-03 heraus. Es konnte eine große Menge an immobilisierter Biomasse (Trockengewicht 0,87 g) für die Verwendung im Bioreaktor hergestellt werden. Darüber hinaus erwies sich die gewählte Methode zur Immobilisierung als einfach zu handhaben. Nach der Inkubation der Filtermatten war mit bloßem Auge kein nicht immobilisiertes Myzel im Kulturüberstand zu erkennen, nur geringe Mengen Biomasse waren an der Wand des Kulturgefäßes angewachsen (Abbildung 22).



Abbildung 22: Fotografie eines 8 x 11 cm großen Stückes Dunstabzugshaubenfilter mit immobilisiertem Pilzmyzel von UHH 5-1-03 nach einwöchiger Inkubation mit 2 % ME.

In Abbildung 23 sind die Absorptionen und der pH-Wert während dreier aufeinanderfolgender Farbstoffzugaben in einem Bioreaktor gegeben. Die Entfärbungsleistung nahm mit jeder Farbstoffzugabe ab. Dies spricht für eine Erschöpfung der Entfärbungskapazität des Myzels, wobei die Unterschiede zwischen erstem und zweitem Zyklus zumindest teilweise mit Sorptionseffekten erklärt werden können (vgl. Ergebnisse des ersten und zweiten Entfärbungszyklus in Abbildung 19 und Abschnitt 3.2.4). Der pH-Wert der Lösung blieb während der Behandlung nahezu unverändert. Die Zirkulation der Farbstofflösung durch die eingeblasene Luft war während des gesamten Experimentes gegeben, es erfolgte kein Verstopfen des Reaktors.

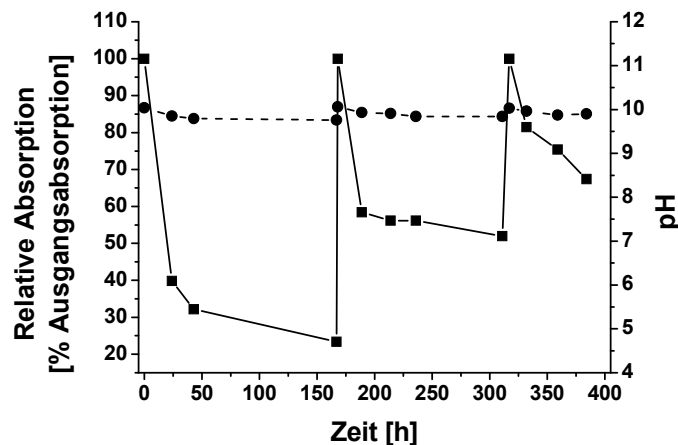


Abbildung 23: Entfärbung von *Reactive Blue 19* ($600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ bei pH 10) in einem *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf im Labormaßstab durch den aquatischen Pilzstamm UHH 5-1-03, immobilisiert auf Dunstabzugshaubenfiltermaterial (8 x 11 cm). Dargestellt sind die relativen Absorptionen bei 590 nm bezogen auf die Ausgangsabsorption des jeweiligen Zyklus sowie die pH-Werte der Lösung. Die eingesetzten 0,78 g Biotrockenmasse entsprachen einer Zelldichte von rund $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Mit diesem Versuch konnte die prinzipielle Anwendbarkeit des Bioreaktordesigns und des immobilisierten Myzels zur Entfärbung einer Farbstofflösung unter praxisrelevanten Bedingungen gezeigt werden. Abbildung 24 verdeutlicht die Position des immobilisierten Myzels im Reaktor sowie die Entfärbung der RBU19-Lösung.

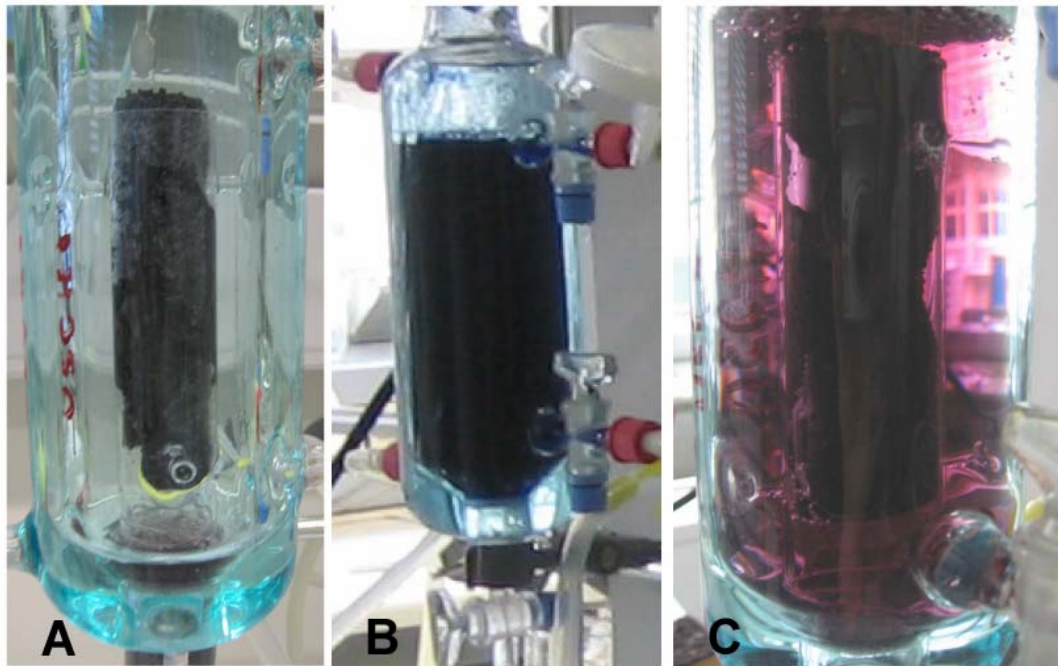


Abbildung 24: (A) Zylindrisch eingerollter Dunstabzugshaubenfilter (11 x 8 cm) mit immobilisiertem Myzel von Stamm UHH 5-1-03 im Leitzylinder eines *airlift*-Reaktors mit innerem Umlauf. (B) Reaktor zu Beginn des ersten Entfärbungszyklus mit $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Reactive Blue 19. (C) Reaktor am Ende des ersten Entfärbungszyklus (sieben Tage).

3.3.2. Entfärbung von *Direct Blue 71* in Bioreaktoren

In diesem Versuch sollten, nachdem die prinzipielle Anwendbarkeit der Bioreaktoren und des immobilisierten Myzels in Abschnitt 3.3.1 gezeigt wurde, verschiedene Prozessdesigns miteinander verglichen werden, um ein optimales Regime zur Behandlung von Farbstofflösungen in Bioreaktoren zu identifizieren (Abbildung 25). Verwendet wurde der im vorherigen Abschnitt beschriebene *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf und ein Reaktor mit kleineren Stücken immobilisierter Biomasse (1 x 1 cm), die aufgrund einer größeren Oberfläche einen erhöhten Massentransport erwarten ließen und durch allseitige Umströmung eventuell ungenügende Sauerstoffversorgung an der Wandung des Ringzylinders vorbeugen sollten. Des Weiteren wurde nicht immobilisierte Biomasse eingesetzt. Die Verwendung von kleineren Stücken immobilisierten Myzels war in Hinsicht auf eine spätere Maßstabsvergrößerung vielversprechender, da, im Gegensatz zu den verwendeten Filtermatten, eine Verwendung sowohl in einem entsprechend aufgebauten *airlift*-Reaktor, als auch in Blasensäulen möglich ist. Diese besitzen einen einfacheren Aufbau und sind somit kostengünstiger in Anschaffung und Wartung.

DBu71 wurde in diesem Experiment in einer höheren Konzentration ($1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) als RBu19 ($0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) und unter Bedingungen eines anderen Modellabwassers (Direktfärbepad für Baumwolle, Tabelle 4) eingesetzt. Auf diese Weise konnte gleichzeitig die Eignung des gewählten Pilzstammes hinsichtlich der Behandlung verschiedenartiger Abwässer (vgl. Einleitung) untersucht werden. Die Zugabe frischer Farbstofflösung erfolgte insgesamt dreimal nach vorheriger Entfernung der behandelten Lösung.

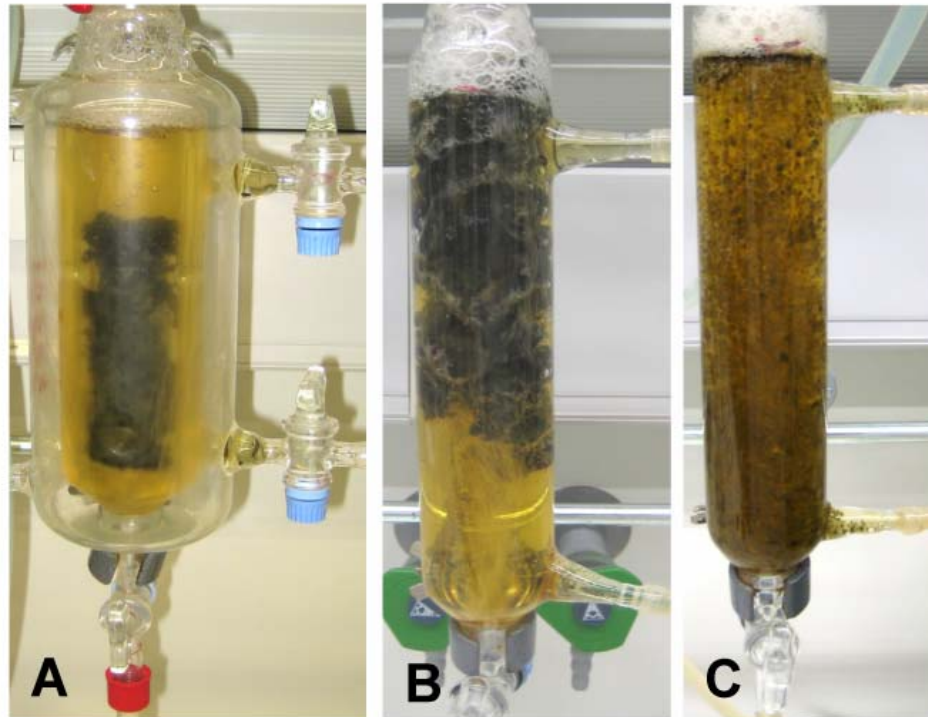


Abbildung 25: Bioreaktoren zur Testung unterschiedlicher Prozessdesigns zur Entfärbung von farbstoffhaltigen Lösungen. Um die Sichtbarkeit zu erhöhen, wurden die Reaktoren im dargestellten Fall mit 2 % Malzextraktlösung befüllt. (A) *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf und auf 11 x 8 cm Dunstabzugshaubenfilter immobilisiertem Myzel von UHH 5-1-03. (B) Blasensäule mit auf 1 cm² Dunstabzugshaubenfilter immobilisiertem Myzel von UHH 5-1-03. (C) Blasensäule mit nicht immobilisierter Biomasse von UHH 5-1-03.

Die effizienteste Entfärbung konnte mit Myzel erreicht werden, welches auf Filterstücken immobilisiert war. Eine Entfärbung von über 90 % konnte in drei aufeinanderfolgenden Zyklen gemessen werden, daher ist diese Immobilisierungsstrategie am besten für eine weitere Maßstabsvergrößerung geeignet (Tabelle 19). Abnehmende Entfärbungsraten wurden mit nicht immobilisierten Myzels und bei Verwendung einer Filtermatte mit immobilisiertem Myzel festgestellt (Tabelle 19). Im *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf ist deutlich die mit jedem Zyklus abnehmende spezifische Entfärbungsrate zu erkennen, während die Filterstücken mit immobilisierter Biomasse eine annähernd gleichbleibende Entfärbungsrate über alle drei Zyklen zeigten. Die Verwendung der nicht immobilisierten Biomasse führte zu einer Agglomeration, die einen negativen Einfluss auf die Entfärbungsraten unter diesen Bedingungen hatte. Myzel heftete sich an die verwendeten Silikonschläuche und die Sinterglasfritte an. Das behinderte die Probenahme und die Säuberung der Apparatur. Diese Probleme traten bei Verwendung von immobilisiertem Myzel nicht auf.

Tabelle 19: Entfärbung von *Direct Blue 71* unter Bedingungen des Modellabwassers für Direktfarbstoffe (Tabelle 4). Stamm UHH 5-1-03 wurde immobilisiert auf Dunstabzugshaubenfiltermatten (11 x 8 cm, *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf, $2,35 \text{ (g TM)} \cdot \text{L}^{-1}$) und immobilisiert auf Stücken des Filtermaterials (1 cm^2 , Blasensäule, $3,18 \text{ (g TM)} \cdot \text{L}^{-1}$) eingesetzt. In einer Blasensäule wurde nicht immobilisiertes, „freies“ Myzel verwendet ($3,04 \text{ (g TM)} \cdot \text{L}^{-1}$). Farbstofflösungen wurden nach 161 und 265 h ersetzt. Belüftet wurde mit $10 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ steriler Luft. Dargestellt sind Absorptionen relativ zum Beginn des jeweiligen Zyklus sowie spezifische Entfärbungsraten, bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmasse und Inkubationszeit.

Zyklus (Dauer in Tagen)	Entfärbung (%)			Spez. Entfärbungsrate (% Entfärbung $\cdot (\text{d} \cdot \text{g TM})^{-1}$)		
	Filtermatte	Filter- stücke	Freies Myzel	Filtermatte	Filter- stücke	Freies Myzel
1 (7)	90,0	95,1	95,7	18,5	20,5	21,8
2 (4)	68,9	96,6	87,8	17,0	25,0	24,0
3 (5)	47,7	92,4	75,6	11,7	23,9	20,7

3.3.3. Entfärbung eines Modellabwassers in Bioreaktoren

Es wurde im Gegensatz zum vorherigen Abschnitt ein Farbstoffgemisch unter Bedingungen des sauren Modellabwassers für Wolle eingesetzt (Tabelle 4). Myzel wurde auf einer Dunstabzugshaubenfiltermatte immobilisiert und in einem *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf eingesetzt. Daneben wurden zwei Blasensäulen mit kleinen Stücken immobilisierten Myzels getestet. Eine dieser Blasensäulen wurde unter unsterilen Bedingungen verwendet (Tabelle 20). Die Zugabe der Farbstofflösungen erfolgte in Zyklen.

Für die Behandlung des sauren Modellabwassers für Wolle war Myzel des Stammes UHH 5-1-03 am besten geeignet, welches auf kleinen Filterstücken immobilisiert war (Tabelle 20), was die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts bestätigte. Unter sterilen Bedingungen war während des ersten Zyklus die Entfärbung nach Immobilisierung auf Filterstücken höher als nach Immobilisierung auf Filtermatten. Vergleichbare Ergebnisse wurden im zweiten Zyklus erhalten. In allen Fällen kam es mit jeder Zugabe von frischem Modellabwasser zu einer Abnahme der Entfärbungsraten, dennoch wurden Unterschiede zwischen den Reaktoren unter sterilen und unsterilen Bedingungen beobachtet. Nach Immobilisierung auf Filterstücken blieben die Entfärbungen während des ersten Zyklus unter unsterilen Bedingungen hinter denen unter sterilen Bedingungen zurück, waren aber während des zweiten und dritten Zyklus etwa doppelt so hoch wie in den beiden übrigen Ansätzen. Dies ist vielversprechend in Hinsicht auf die Behandlung von realen Abwässern im größeren Maßstab unter unsterilen Bedingungen. Gründe hierfür sind unbekannt. Denkbar wäre der Einfluss von vorhandenen Bakterien, entweder direkt auf die Entfärbung oder indirekt durch Stimulation des Myzels.

Die Ergebnisse der vorherigen Abschnitte berücksichtigend, eignen sich einfache Blasensäulen in Verbindung mit auf kleinen Filterstückchen immobilisiertem Myzel des Stammes UHH 5-1-03 für eine effiziente Entfärbung von chemisch unterschiedlich zusammengesetzten Farbstofflösungen und sind daher vielversprechend für eine Maßstabsvergrößerung. Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen ist eine Behandlung unter unsterilen Bedingungen nicht mit Nachteilen verbunden.

Tabelle 20: Entfärbung des sauren Modellabwassers für Wolle. Stamm UHH 5-1-03 wurde auf Dunstabzugshaubenfiltermatten (11 x 8 cm) zur Verwendung in einem *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf ($2,82 \text{ (g TM)} \cdot \text{L}^{-1}$) und auf Filterstücken (1 cm^2) zum Einsatz in Blasensäulen immobilisiert. Je eine Blasensäule wurde unter sterilen Bedingungen ($3,22 \text{ (g TM)} \cdot \text{L}^{-1}$) und unter unsterilen Bedingungen ($2,98 \text{ (g TM)} \cdot \text{L}^{-1}$) verwendet. Gegeben sind die Entfärbungen (Integrale der Spektren von 380-740 nm) relativ zu den Absorptionen zu Beginn jedes Zyklus und spezifische Entfärbungsraten.

Zyklus (Dauer in Tagen)	Entfärbung (%)			Spezifische Entfärbung (% Entfärbung $\cdot \text{d}^{-1} \cdot (\text{g TM})^{-1}$)		
	Filter- matte (steril)	Filter- stücke (steril)	Filter- stücke (unsteril)	Filter- matte (steril)	Filter- stücke (steril)	Filter- stücke (unsteril)
1 (2)	44,9	60,1	38,9	23,2	38,9	27,2
2 (2)	23,5	22,0	42,1	12,1	14,2	29,5
3 (5; 4*)	11,6	14,8	27,2	3,0	3,8	7,6

* - Nach acht Tagen Gesamtlauzeit trat ein Leck am *airlift*-Reaktor mit innerem Umlauf auf, so dass der Versuch für diesen Reaktor nach 186 h beendet werden musste.

3.3.4. Entfärbung eines Modellabwassers in aufskalierten Bioreaktoren

Während eines Gastaufenthaltes bei der Firma Wetlands SPRL (Louvain-la-Neuve, Belgien) wurde eine Variante des Airliftreaktors in größerem Maßstab (10 L Gesamtvolumen, Abschnitt 2.2.4) zur Behandlung des sauren Modellabwassers für Wolle durch den Stamm UHH 5-1-03 verwendet. Zusätzlich zur Entfärbung wurde der Verlauf des CSB und des pH-Wertes gemessen (Abbildung 26). In diesem Experiment wurde aufgrund der geringeren eingesetzten Zelldichte auf eine Erneuerung des Modellabwassers verzichtet.

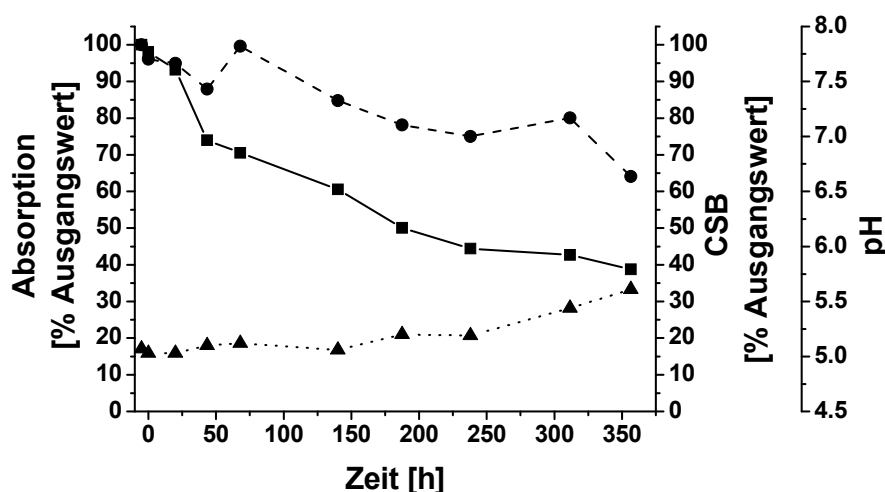


Abbildung 26: Absorption (■, integrierte Spektren von 380 – 740 nm bezogen auf Ausgangswert), CSB (●, bezogen auf Ausgangswert) und pH-Wert (▲) in einem *airlift*-Reaktor (10 L des sauren Modellabwassers für Wolle) mit 4,9 g immobilisiertem Myzel von Stamm UHH 5-1-03 (1 cm^3 Dunstabzugshaubenfilterstücke, Zelldichte $0,49 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) unter unsterilen Bedingungen.

Stamm UHH 5-1-03 entfärbte das Modellabwasser innerhalb von 357 h zu 61 %. Der initiale Abfall der Absorption bis zu einer Inkubationsdauer von 43,5 h ist wahrscheinlich mit einer Sorption von Farbstoffen an das Myzel und die Gerätschaften zu erklären. Ab einer Inkubationsdauer von 68 h war eine parallele Abnahme des CSB und der Absorption zu

beobachten. Es ist zu vermuten, dass mit einer verlängerten Inkubationsdauer sowohl die Entfärbung, als auch die Verringerung des CSB, weiter hätten gesteigert werden können. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Stamm UHH 5-1-03 zur Entfärbung von Modellabwässern im größeren Maßstab geeignet ist und dabei nicht nur zu einer Entfärbung, sondern auch zu einer deutlichen Reduktion des CSB in der Lage ist.

Um für weitere Experimente im größeren Maßstab genügend immobilisierte Biomasse von Stamm UHH 5-1-03 bereitstellen zu können, wurde ein Kultivierungsverfahren zur Immobilisierung in einem Aluminiumgefäß mit 3 L Arbeitsvolumen entwickelt (Abbildung 27). Als Medium wurde 12,5 % TS verwendet, welcher im Vergleich zu ME kostengünstiger ist.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich, war eine Immobilisierung mit dem gewählten Kultivierungssystem auch im größeren Maßstab realisierbar. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.1 war kein Myzel im Kulturüberstand zu erkennen, am Spülsaum des Mediums waren nur geringe Mengen Biomasse angewachsen. Mit der verwendeten Verdünnung von TS wurde eine unerwartet hohe Biomassebildung erreicht, in weiteren Experimenten kann daher die TS-Konzentration gesenkt werden, um ein optimales Filter/Biomasse-Verhältnis zu erreichen.

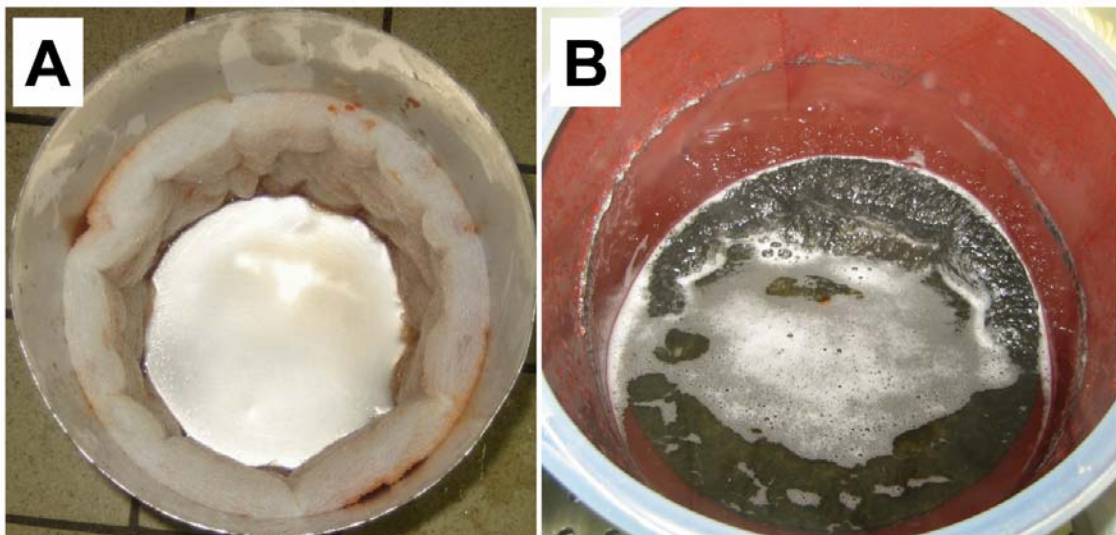


Abbildung 27: Immobilisierung von Stamm UHH 5-1-03 auf Dunstabzugshaubenfilter in 3 L Arbeitsvolumen. (A) Fotografie einer Dunstabzugshaubenfiltermatte (54 x 15 cm) im Kultivierungsgefäß vor Zugabe des Mediums (3 L Arbeitsvolumen). (B) Fotografie des Dunstabzugshaubenfilters mit immobilisiertem Myzel von UHH 5-1-03 nach einwöchiger Inkubation in 12,5 % Tomatensaft.

3.4. Laccase des Stammes UHH 5-1-03

3.4.1. Produktion, Reinigung und strukturelle Charakterisierung

Der Stamm UHH 5-1-03 wurde aufgrund seiner hohen Entfärbungsleistungen für die Untersuchung seiner Laccase ausgewählt. Er bildete Laccase in Flüssigkulturen, welche mit den Laccaseinduktoren Kupfersulfat und Vanillinsäure versetzt waren. In Erlenmeyerkolben überstieg die Aktivität von nicht induzierten Kulturen eine Aktivität von $20,9 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ nicht. In induzierten Kulturen wurde in Erlenmeyerkolben eine maximale Aktivität von $1219 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht (Abschnitt 3.5.1). Im Fermenter erreichte die Kultur eine maximale Aktivität von $540 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ an Kulturtag 7.

Die Reinigung des Enzyms fand in drei Schritten statt (Tabelle 21). Hydrophobe Interaktionschromatografie wurde nach der Konzentrierung des Enzyms mit Ultrafiltration als erster Reinigungsschritt angewandt. Die Laccase eluierte bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung von 19,4 % (0,76 M). Nach der Größenausschlusschromatografie, nach der die Laccase ebenfalls als einzelner Peak eluierte (18 mL Elutionsvolumen), wurde eine 110-fache Aufreinigung erzielt (Anhang II).

Die Größe des nativen Proteins wurde mittels Größenausschlusschromatografie bestimmt. Dafür wurde ein Pharmacia ÄktaExplorer 100 FPLC System und eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 pg* Gelfiltrationssäule verwendet, um eine höhere Auflösung zu gewährleisten (vgl. Abschnitt 2.5.2). Die gereinigte Laccase eluierte bei Pufferbedingungen von pH 6 und 0,15 M NaCl bei einem Volumen von 77,1 mL, welches einer Molmasse des Proteins von 74,4 kDa entspricht. Neben diesem wurden keine weiteren Peaks oder Schultern beobachtet. In sehr guter Übereinstimmung mit der durch Größenausschlusschromatografie ermittelten Molmasse führte die Analyse des gereinigten Proteins mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu einem einfach geladenen Moleküllenpeak mit einer Masse von 75,6 kDa.

Tabelle 21: Aufreinigungstabelle der Laccase des Stammes UHH 5-1-03. HIC – hydrophobe Interaktionschromatografie, SEC – Größenausschlusschromatografie.

Reinigungs-schritt	Volumen (mL)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität (U)	Spezifische Aktivität ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Ausbeute (%)	Reinigungs-faktor (-fach)
Kulturfiltrat	3310	27804	1787	0,06	100	1
Ultrafiltration	35	122	196	1,6	11	25
HIC	74	18	60	3,2	3,3	51
SEC	148	2,4	17	7	0,94	110

Die Bildung eines Laccasedimers (theoretische Größe anhand der MALDI-TOF-MS-Daten für das Monomer: 151,2 kDa) wurde mit Größenausschlusschromatografie untersucht. Dazu wurde ein Laufpuffer bei verschiedenen pH-Werten ohne weitere Salze eingesetzt, da nur ein Peak mit der Größe des Monomers detektiert wurde, wenn der Laufpuffer der Gelfiltration NaCl enthielt (siehe vorheriger Absatz). Bei verschiedenen pH-Werten eluierte die Laccase (evaluiert anhand der Absorption bei 280 nm und der Aktivität in den aufgefangenen Fraktionen) entweder im Bereich von 75-81 mL und / oder 100-104 mL (Anhang II). Da ein Puffer ohne NaCl verwendet wurde, war keine exakte Größenbestimmung möglich. Laut Herstellerangaben ist die Aufnahme einer validen Eichgerade mit den Eichproteinen an das Vorhandensein einer gewissen Salzkonzentration im Puffer gebunden. Unter Bedingungen ohne NaCl eluierten die Standards Conalbumin (75 kDa) und Aldolase (158 kDa) bei 101,3 bzw. 76,6 mL und rechtfertigen somit die Annahme, dass die Laccase als Dimer und Monomer eluierte.

Die mithilfe externer Software integrierten Peakflächen der Absorptionspeaks und der prozentuale Anteil der Laccaseaktivität des Dimers an der insgesamt eluierten Laccaseaktivität bei pH-Werten von 3 bis 8 sind in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Dimerisierung der Laccase des Stammes UHH 5-1-03 bei verschiedenen pH-Werten. Gezeigt sind die relativen Anteile des Dimers an der insgesamt eluierten Laccase, basierend auf der Proteinabsorption bei 280 nm (die Summe der Flächenintegrale des Di- und des Monomerpeaks wurde gleich 100 % gesetzt) und auf Basis der eluierten Laccaseaktivität (100 % entspricht der Gesamtaktivität in den Fraktionen 72-84 und 97-107). Verwendet wurde NaAc-Puffer bei einem Fluss von 1 mL·min⁻¹.

pH	Dimer (% der Fläche unter den laccasespezifischen Absorptionspeaks bei 280 nm)	Dimer (% der eluierten Gesamtaktivität)
3	4	7
4	35	47
5	91	89
6	93	100
7	99	100
8	96	100

In der IEF wurde der isoelektrische Punkt des gereinigten Proteins mit > 8,3 bestimmt. Es war sowohl nach Aktivitätsfärbung (Daten nicht gezeigt) als auch nach Coomassie-Färbung eine klar definierte Bande erkennbar (Abbildung 28A).

Die gereinigte und denaturierte Laccase zeigte drei Banden in einer SDS-PAGE (apparente Molmassen: 85 kDa, 81 kDa und 78 kDa, Abbildung 28B), welche regelmäßige Abstände und abnehmende Intensitäten hatten. Diese Banden waren reproduzierbar während aller Stufen des Aufreinigungsprozesses nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Alle drei Banden konnten mithilfe laccasespezifischer Antikörper (Abbildung 28D) als Laccasen identifiziert werden. Aufgrund der genetischen Daten (es wurde nur ein Laccasegen identifiziert, welches auch exprimiert wurde, vgl. Abschnitt 3.4.7) kann vermutet werden, dass es sich dabei um unterschiedlich glykosylierte Formen desselben Proteins handelt. Daher wurde die gereinigte Laccase deglykosyliert und mit SDS-PAGE analysiert. Nach Deglykosylierung und SDS-PAGE wurden ebenfalls mehrere Banden detektiert (Abbildung 28C). Dies könnte durch unvollständige Deglykosylierung unterschiedlich glykosylierter Laccaseformen begründet sein, obwohl eine gegenüber den Angaben des Herstellers des Deglykosylierungskits verlängerte Inkubationszeit verwendet wurde. Die intensivsten Banden zeigten eine Migration ähnlich dem 66-kDa-Standard und spiegeln somit die Größe des theoretischen, zuckerfreien Proteins wider, welches basierend auf den genetischen Daten berechnet wurde (64,3 kDa, siehe Abschnitt 3.4.7).

Da die Laccase nicht in nativen Zustand migrierte, konnten keine Informationen durch die native PAGE gewonnen werden. Aktivität wurde an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

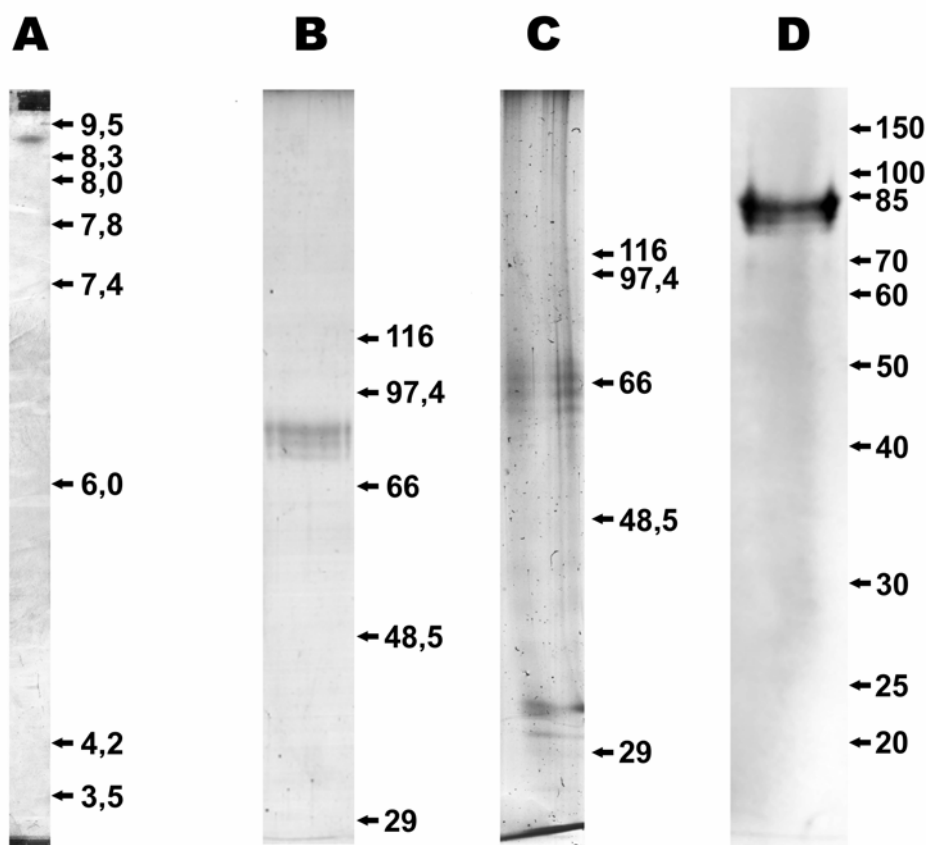


Abbildung 28: Gelelektrophoresen der Laccase des Stammes UHH 5-1-03: (A) Coomassie gefärbte IEF, (B) Coomassie gefärbte SDS-PAGE, (C) Coomassie gefärbte SDS-PAGE der deglykosylierten Laccase, (D) Chemilumineszenz der Antikörper markierten Laccase (127). Die Zahlen geben den pI (A) bzw. die Größe (kDa; B, C, D) von parallel mitgeführten Markern an.

3.4.2. Substratspezifität

Es wurde der Umsatz von verschiedenen Laccasesubstraten (ABTS, DMP, SGZ, Guajakol) sowie von vier Farbstoffen (ABu62, ABk210, DBu71, RBu19) durch die gereinigte Laccase des Stammes UHH 5-1-03 untersucht. Das Enzym oxidierte alle eingesetzten Substrate mit Ausnahme von Tyrosin (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität gegenüber ABTS konnte durch Zugabe von Wasserstoffperoxid nicht erhöht werden. Daher wurde eine Tyrosinase- bzw. Peroxidaseaktivität der Laccase ausgeschlossen.

Für die Farbstoffe ABu62, ABk210, DBu71 und RBu19 wurde die Absorptionsveränderung bei einer Wellenlänge von 590 nm während der Inkubation mit gereinigter Laccase über 72 h verfolgt (Abbildung 29). Parallel wurden die Aktivitäten der Laccase gegenüber ABTS über den gesamten Zeitraum gemessen. Nach 72 h war in jedem der aktiven Ansätze mindestens 30 % der Ausgangsaktivität gegenüber ABTS nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die Laccase konnte alle eingesetzten Farbstoffe umsetzen. Während es bei ABu62, DBu71 und RBu19 zu einer Absorptionsabnahme kam, wurde bei ABk210 eine Absorptionszunahme beobachtet. Bei ABu62, DBu71 und RBu19 kam die Entfärbung nach 48 h zum Erliegen, die Absorption blieb bis zum Ende des Versuches unverändert (rund 80 % (ABu62) und jeweils rund 40 % (DBu71, RBu19) Entfärbung). Spektren wurden nach 48 h Inkubation aufgenommen (Abbildung 30).

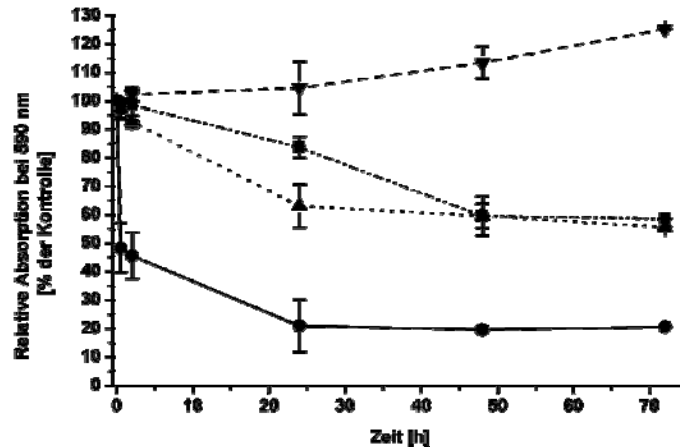


Abbildung 29: Relative Absorption (590 nm) von Farbstofflösungen (● - *Acid Blue 62*, ■ - *Reactive Blue 19*, ▲ - *Direct Blue 71*, ▼ - *Acid Black 210*; jeweils 500 μM in NaAc-Puffer pH 5,0) während der Inkubation mit gereinigter Laccase aus UHH 5-1-03 (500 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, 10 mU) bei RT. Als Kontrollen dienten Farbstofflösungen, die hitzeinaktiviertes Enzym enthielten. Dargestellt sind Mittelwerte von vier parallelen Ansätzen und Standardabweichungen.

Während des Umsatzes von ABu62 kam es zur Bildung eines Peaks mit einer maximalen Absorption bei 500 nm. Die gemessene Absorption bei 590 nm nach 48 h ist wahrscheinlich auf die Absorption eines entstandenen Metaboliten zurückzuführen, der auch bei 590 nm eine Absorption zeigte. Im Fall von RBu19, DBu71 und ABk210 veränderten sich die Absorptionsintensitäten in verschiedenen Wellenlängenbereichen relativ zueinander. Es konnten keine neuen Peaks identifiziert werden.

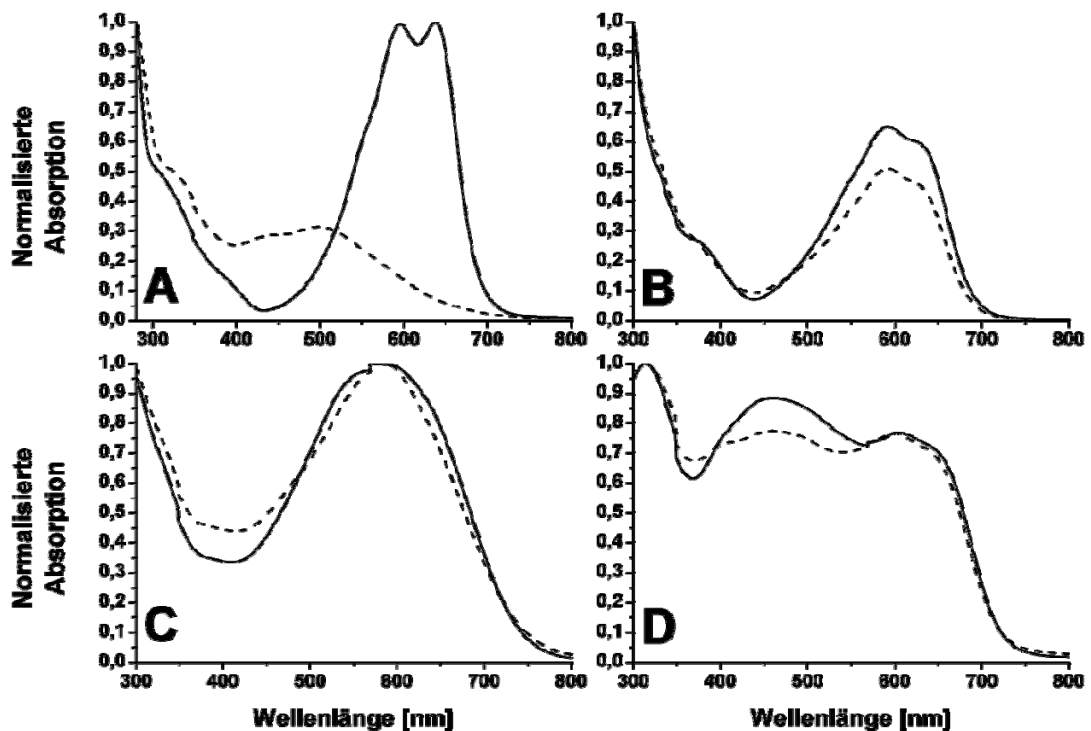


Abbildung 30: Normalisierte Spektren von Farbstofflösungen (500 μM in NaAc-Puffer pH 5,0; (A) – ABu62, (B) – RBu19, (C) – DBu71, (D) – ABk210) nach 48 h mit 500 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ gereinigter Laccase von UHH 5-1-03 bei RT (gestrichelte Linien) im Vergleich zu Kontrollen, die hitzeinaktiviertes Enzym enthielten (durchgezogene Linien). Es wurden jeweils vier Parallelen für die Messung vereinigt.

Katalytische Parameter des gereinigten Enzyms wurden für die in Tabelle 23 dargestellten Substrate bestimmt. Die höchsten Affinitäten des Enzyms wurden gegenüber ABTS ($K_m =$

8 μM) und SGZ ($K_m = 20 \mu\text{M}$) gemessen, die K_m -Werte für DMP und Guajakol, beides monoaromatische phenolische Verbindungen waren relativ hoch ($K_m = 266 \mu\text{M}$ bzw. $648 \mu\text{M}$).

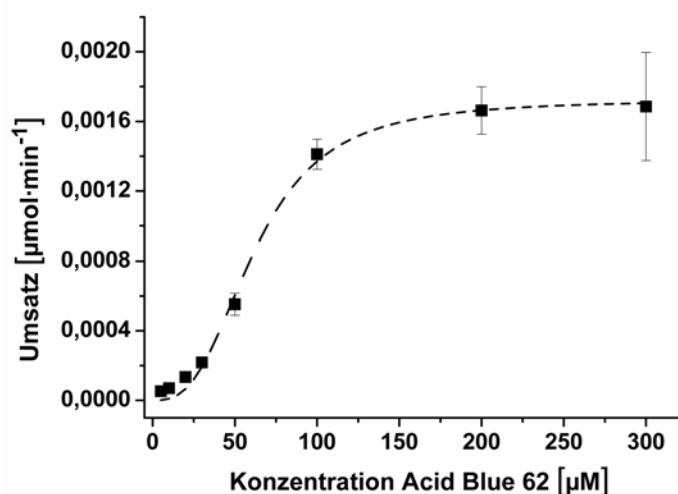


Abbildung 31: Initiale Umsatzgeschwindigkeit von *Acid Blue 62* bei steigenden Konzentrationen durch Laccase des Stammes UHH 5-1-03. Die Messwerte ($n = 4$) $\pm$ Standardabweichung wurden mit der Hill-Gleichung genähert (gestrichelte Linie, $R^2 = 0,99569$).

ABu62 zeigte als einziges getestetes Substrat einen sigmoidalen Kurvenverlauf, wenn die Aktivität gegen die Substratkonzentration aufgetragen wurde (Abbildung 31). Für die Berechnung der katalytischen Parameter von ABu62 wurde daher die Hill-Gleichung verwendet. Basierend auf dem k_{cat} / K_m – Verhältnis, war ABTS das mit Abstand am effektivsten umgesetzte Substrat ($1252 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$), gefolgt von ABu62 ($580 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$).

Tabelle 23: Kinetische Eigenschaften der gereinigten Laccase des Stammes UHH 5-1-03 gegenüber verschiedenen Substraten. Die Messungen wurden in 100 mM McIlvaine-Puffer in mindestens vier Parallelen durchgeführt.

Substrat	K_m oder $S_{0.5}^*$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
ABTS	8	10,6	1252
DMP	266	4,3	16
SGZ	20	1,5	74
Guajakol	648	4,6	7
ABu62	62*	36,0	580

* - Im Fall von *Acid Blue 62* wurde eine Kinetik beobachtet, die nicht dem Michaelis-Menten-Typ zuzuordnen war. Daher wurde in diesem Fall die halb sättigende Substratkonzentration mit Hilfe der Hill-Gleichung errechnet.

3.4.3. pH-Optimum und –stabilität

Die Aktivitätsprofile der gereinigten Laccase für verschiedene Substrate und pH-Werte sind in Abbildung 32A dargestellt. Die höchste Aktivität gegenüber ABTS wurde bei einem pH von 2,5 gemessen. Obwohl die Aktivitäten mit steigendem pH-Wert sanken, war das Enzym auch bei pH 8 noch aktiv. Die Oxidation von DMP ergab ein glockenförmiges Aktivitätsprofil mit messbaren Aktivitäten über den gesamten getesteten pH-Bereich und einem pH-Optimum von 4,5 (Abbildung 32A). Die optimalen pH-Werte für die Oxidation von Guajakol, SGZ und

ABu62 betragen 5,0, 5,5 bzw. 5,5, wobei Guajakol nur bei pH Werten über 3 und SGZ nicht unter pH 4,5 oxidiert wurde.

Wie Abbildung 32B zu entnehmen ist, war das untersuchte Enzym bei den pH-Werten vier, sieben und acht am stabilsten. Am Ende des Versuches (355 h) konnte bei diesen pH-Werten eine Restaktivität von 57 % (pH 4) bis 65 % (pH 7), bezogen auf die Ausgangsaktivität, gemessen werden. Bei den pH-Werten fünf und sechs wurde ein Abfall der Aktivität innerhalb von vier Stunden um 25 % (pH 5) bzw. 28 % (pH 6) beobachtet. Dieser Unterschied zu den Restaktivitäten bei höheren pH-Werten blieb bis zum Ende des Experimentes erhalten. Bei einem pH-Wert von 2 wurde das Enzym innerhalb von 355 h vollständig inaktiviert.

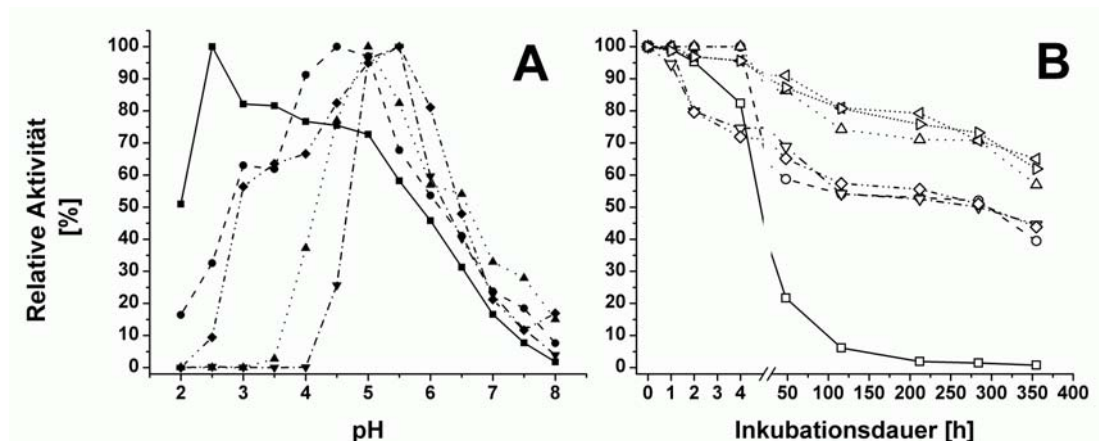


Abbildung 32: (A) Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität gereinigter Laccase des Stammes UHH 5-1-03 gegenüber den Substraten ABTS (■), DMP (●), Guajakol (▲), SGZ (▼) und ABu62 (◆). Messungen wurden bei Raumtemperatur in 100 mM Mcllvaine-Puffer durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei parallelen Ansätzen bezogen auf die maximal gemessene Aktivität (S.D. < 11 %). (B) Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der gereinigten Laccase. Messungen wurden bei 15 °C in 100 mM Mcllvaine-Puffer mit 3 mM ABTS als Substrat bei den pH-Werten 2,0 (□), 3,0 (○), 4,0 (△), 5,0 (▽), 6,0 (◁), 7,0 (▷) und 8,0 (◇) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei parallelen Ansätzen bezogen auf die Ausgangsaktivität (S.D. < 10 %). Die Zeitachse ist der Übersichtlichkeit halber unterbrochen.

3.4.4. Temperaturoptimum und – stabilität

Die Temperaturabhängigkeit der Oxidation von ABTS durch die gereinigte Laccase wurde in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 75 °C gemessen (Abbildung 33A). Die Aktivität des Enzyms stieg linear bis zu einer Temperatur von 65 °C, welche als Optimaltemperatur für die Oxidation von ABTS bestimmt wurde.

Die Temperaturstabilität der gereinigten Laccase wurde für die Oxidation von ABTS in einem Bereich von 4 °C bis 45 °C über einen Zeitraum von 288 h untersucht (Abbildung 33B). Die Zeitachse in Abbildung 33B ist unterbrochen aufgetragen, um den Beginn und den Verlauf des Experimentes in ausreichender Auflösung darzustellen. Bei 35 °C und 45 °C wurde ein Abfall der Aktivität auf 50 % des Ausgangswertes innerhalb der ersten Stunde beobachtet. Das Enzym wurde bei 35 °C und 45 °C nach 288 h bzw. 24 h nahezu vollständig inaktiviert. Es wurden keine Unterschiede im Rahmen der Standardabweichung in den Aktivitätsverläufen von 4 °C bis RT festgestellt. Nach einem anfänglichen Abfall der Aktivitäten um 54 % (4 °C), 41 % (15 °C) und 43 % (RT) blieben die Aktivitäten bis zum Ende des Versuches nahezu konstant.

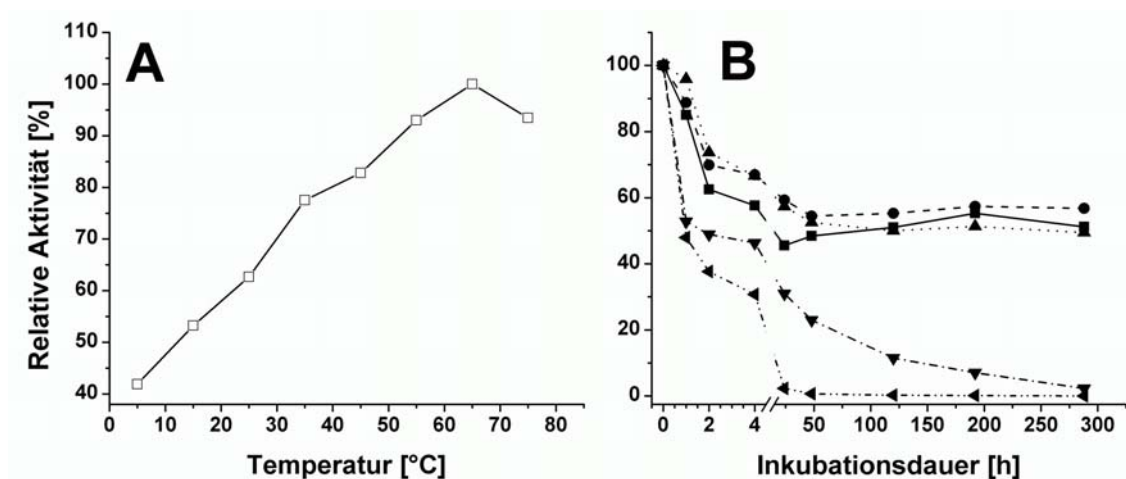


Abbildung 33: (A) Relative Enzymaktivität der gereinigten Laccase des Stammes UHH 5-1-03 gegenüber 3 mM ABTS in 100 mM Mc-Ilvaine-Puffer (pH 4,0) bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt sind Mittelwerte von Vierfachbestimmungen mit S.D. < 4 %. (B) Relative Aktivität (% der Ausgangsaktivität) der gereinigten Laccase gegenüber 3 mM ABTS in NaAc-Puffer (pH 5,0) bei 4 °C (■), 14 °C (●), RT (▲), 35 °C (▼) und 45 °C (◄). Dargestellt sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen mit S.D. < 9 %, die Zeitachse ist der Übersichtlichkeit halber unterbrochen.

3.4.5. Inhibition der Laccase

Untersuchungen zur Inhibition der gereinigten Laccase wurden mit ABTS als Substrat und verschiedenen aus der Literatur entnommenen Laccaseinhibitoren, Lösungsmitteln, Salzen und organischen Säuren durchgeführt (Tabelle 24).

Im Fall von Natriumazid (NaN_3) konnte auch bei einer Konzentration von 15 mM noch weniger als 1 % der eingesetzten Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Restaktivität von 25 % wurde bei einer Natriumfluoridkonzentration (NaF) von 10 mM bestimmt. Die Laccase war, mit Ausnahme von Acetonitril, aktiv bei hohen Konzentrationen verschiedener Lösungsmittel. Acetonitril inhibierte das Enzym zu 50 % bei einer Konzentration (4,5 %), die um etwa eine Zehnerpotenz geringer war als bei den übrigen verwendeten Lösungsmitteln. Es waren Lösungsmittelkonzentrationen von rund 80 % (60 % im Fall von DMSO) nötig, um das Enzym vollständig zu inaktivieren. Karbonat, Sulfat und Chlorid inhibierten die Laccase zu 50 % bei Konzentrationen zwischen 69 und 90 mM. Karbonat inaktivierte das Enzym bei rund fünfmal geringeren Konzentrationen (200 mM) als Chlorid und Sulfat vollständig. Das Enzym war sehr empfindlich gegenüber Ameisensäure (IC_{50} 230 μM), jedoch nicht gegenüber Essigsäure (36 % Inhibition bei 1 M).

Tabelle 24: Einfluss von potenziellen Laccaseinhibitoren auf die Oxidation von 3 mM ABTS in 100 mM McIlvaine-Puffer (pH 4,0) durch die gereinigte Laccase des Stammes UHH 5-1-03. Der Versuch wurde in vier parallelen Ansätzen durchgeführt und die Konzentration, die zu 50 % Inaktivierung des Enzyms führte (IC_{50}), wurde mit Hilfe von Kurvenanpassungen berechnet. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne die Zugabe von Inhibitoren.

Substanz	IC_{50}	Konzentration, die zu vollständiger Inhibierung führte
EDTA	19 mM	> 25 mM*
Harnstoff	2,25 M	> 5 M*
NaN ₃	110 µM	> 15 mM*
NaF	3,7 mM	> 10 mM*
NaCl	80 mM	> 1 M*
Na ₂ CO ₃	69 mM	200 mM
Na ₂ SO ₄	90 mM	> 1 M*
Aceton	31 % (v/v)	80 % (v/v)
Acetonitril	4,5 % (v/v)	> 80 % (v/v)*
DMSO	40 % (v/v)	60 % (v/v)
Ethanol	52 % (v/v)	> 80 % (v/v)*
Isopropanol	60 % (v/v)	> 80 % (v/v)*
Methanol	52 % (v/v)	80 % (v/v)
Ameisensäure	230 µM	> 1 M*
Essigsäure	-	>> 1 M*

* - Eine vollständige Inhibition des Enzyms wurde bei der höchsten getesteten Konzentration des Inhibitors nicht erreicht.

3.4.6. Sequenzierungsstrategie zur Analyse von Gen und Transkript

Laccaseproteine besitzen vier hochkonservierte Kupferbindungsstellen (265). Ausgehend von der bekannten Aminosäuresequenz dieser cbr wurden degenerierte Primer, welche an die cbrI und cbrIII-codierenden DNA-Regionen binden, entworfen (128). Diese Primer wurden verwendet, um sowohl in genomischer DNA als auch in cDNA von Stamm UHH 5-1-03 laccasespezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Das jeweils einzige PCR-Produkt der Primerkombination Cu1AF/Cu3R sowohl aus genomischer DNA als auch cDNA hatte eine Größe von rund 1050 Basenpaaren (bp). Es wurde in beiden Fällen gereinigt und kloniert. Zwei (DNA) bzw. fünf (cDNA) unabhängige Klone wurden zur Sequenzierung eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass alle Sequenzen aus diesen Klonen identisch waren. Die spezifischen Primer 513-For1 und 513-Rev1 wurden auf Basis dieser Sequenz entwickelt. Um das 3'-Ende der cDNA zu erhalten, wurde die 3'-RACE-Methode (*rapid amplification of cDNA ends*, schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden) angewandt (78).

Der AP-Primer wurde in Verbindung mit dem laccasespezifischen Primer 513-For1 verwendet, um Teilstücke der cDNA (rund 850 bp) zu amplifizieren. Diese wurden anschließend kloniert und vollständig sequenziert (drei unabhängige Klone). Ausgehend von dieser Sequenz wurde der Primer 513-For2 entworfen und die 3'-RACE wiederholt. Dabei entstand ein rund 480 bp großes Fragment. Zwei Klone dieses Fragments konnten nach der Sequenzierung die bereits bekannte Sequenz am 3'-Ende bestätigen. Die genomische DNA-

Sequenz wurde nach inverser PCR mit den Primern 513-For1 und 513-Rev1 vervollständigt. Mit den resultierenden Fragmenten wurde eine *nested* PCR mit den Primern 513-For2 und 513-Rev1 durchgeführt. Die direkten Sequenzierungen sowie die Sequenzierungen von klonierten PCR-Produkten dieser Fragmente (*Hind*III $\approx$ 950 bp, *Pvu*I $\approx$ 1000 bp, *Xho*I $\approx$ 1600 bp, *Eco*RI $\approx$ 2000 bp) trugen zur Vervollständigung der genomischen DNA-Sequenz des Laccasegens am 5'- und 3'-Ende bei. Ausgehend von dieser Sequenz wurde der Primer 513-Rev2 entwickelt. Zur Verifizierung des Ergebnisses der inversen PCR des *Eco*RI-Ansatzes wurde eine weitere *nested* PCR mit den Primern 513-For2 und 513-Rev2 und dem PCR-Produkt aus dem *Eco*RI-Ansatz (2000 bp) durchgeführt. Das entstehende Fragment (rund 1500 bp) bestätigte nach der Sequenzierung von drei unabhängigen Klonen die bereits bekannte Sequenz. Um das Start-Codon und die Exon-Intron-Grenzen zu verifizieren, welche durch die inversen PCRs gefunden wurden, kam der dafür entwickelte Primer 513-Start-For3 (beinhaltet das Start-Codon ATG) zum Einsatz. Die PCR der cDNA mit dem Primern 513-Start-For3 und dem Primer 513-Rev1 erzeugte ein Fragment mit einer Größe von rund 550 bp. Der Primer 513-Stop-Rev3 (beinhaltet das Stopp-Codon TGA) wurde entworfen, um die Sequenz, welche nur durch 3'-RACE erhalten wurde, auf Introns zu überprüfen. Die PCR der genomischen DNA mit dem Primerpaar 513-For1 und 513-Stop-Rev3 ergab ein Fragment mit einer Größe von etwa 550 bp. Beide erwähnten PCR-Produkte wurden kloniert und mindestens zwei unabhängige Klone wurden sequenziert, um sowohl die genomische DNA- als auch die cDNA-Sequenz der Laccase des Stammes UHH 5-1-03 zu vervollständigen.

3.4.7. Laccasegen und theoretische Eigenschaften des Proteins

In der genomischen DNA von UHH 5-1-03 wurde ein Laccasegen mit einer Größe von 3072 bp gefunden. Die vollständige Sequenz ist in der EMBL-Datenbank (*European Molecular Biology Laboratory*, Europäisches Molekularbiologielabor, Heidelberg) unter der Zugriffsnummer EU267173 hinterlegt. Die mRNA-Sequenz dieses Gens in Kulturen, welche eine extrazelluläre Laccaseaktivität aufwiesen, konnte ebenfalls nachgewiesen und entschlüsselt werden. Die vollständige mRNA-Sequenz (2130 bp), vom Start-Codon bis zum Poly(A)-Ende) ist unter der Zugriffsnummer EU267174 verfügbar.

Mit einer Größe von 1982 bp codiert der offene Leserahmen für 607 Aminosäuren (aa) und enthält drei Introns. Zwei davon liegen stromaufwärts von der *cbr*I (Größe: 43 bzw. 50 bp), das dritte Intron liegt unmittelbar stromabwärts von *cbr*IV (Größe 68 bp). Alle Introns folgen der GT-AG-Regel (128).

Die Kenntnis der Aminosäuresequenz, die aus der Nukleotidsequenz des Laccasegens abgeleitet werden konnte, erlaubt es, Aussagen über die theoretischen Eigenschaften des Laccaseproteins zu treffen. Das Programm iPSORT berechnete, dass es sich um ein sekretorisches Protein mit einem Signalpeptid handelt. Das Programm SignalP ermittelte die höchst wahrscheinliche Spaltungsstelle des Signalpeptids zwischen den Aminosäuren 20 und 21. Dies führt zu einem hypothetischen sekretierten Protein mit einer Größe von 587 aa, einer entsprechenden Molmasse von 64,3 kDa und einem theoretischen *pI* von 8,1 (ProtParam-Programm). Die hypothetische Molmasse stimmt mit der experimentell bestimmten Molmasse des deglykosylierten Laccaseproteins überein (Abbildung 28C). Auch der theoretische *pI* liegt

```

..|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
-747 acgagggtctctctgactgtaccaatggacttcgataacaattatacgggtgagatgaaggggtgggagaaagttttggccaccaaactgtaaactgaacgc
-647 caacagggttcgaaacgaatgttatctaatgcaattctgagttgtgtgggtcatatTTTTgttcaatcctaatacgaggtcctaactcagaatatcagttctac
-547 ctggatatagataaaataaatcattgatcaaacatcaataatcacttgagctatcttcatcttgaagtaagtaattcagtatcactttgcgccagaatctg
-447 aagccttgaagccctagtcacgaaggccactgtaaatggcaatctccgaaactgtccgcaagctgtatgccgcccactcgcgccttgagccacagtcctg
-347 gtcattccaaatctccgtcactcgtctccatcagaggtaaccataccttttctctcgTGCAGActggatcagttctactacaacggccatgggaaTGCACG
-247 CgaccacacatctgagtggttgccttgacgatacatgatggacaggaatagaaccaaccaatattctagcgaacatggaatctgatCCGGGatgcccgtgaag
-147 tatgattgaatcagTATAAgaagaggggttctcgtccagcttcaagtctccagagcagttcttctgcacgtcctcaccacactttccttcattctcttcca
                                     → 513-Start-For3                                     513-Rev2
-47  ctcattcttttacacaccacatttcgttatcagcagtgaccaaaccaccATGAAGTCAATCTTTACCTTAGGAGTAGCCCTTTTAGGGCTCTCCAGTCATGT
                                     M K S I F T L G V A L L G L S S H V18
←
54  CCAAGGGGCAGCTGTCAAGGTTGAGCGGATGGAGATGACTCGAATCCAACCTCGCAATGATCTTGTGGAGCGTCAATCCGCAGCGTGTGGTAGTAACGGG
    Q G A A V K V E R M E M T R I Q P R N D L V E R Q S A A C G S N G 51
154 CCCAATTCTAGGCATTGCTGGACTCCTGGATTTAgtgagttgccaatcatgaagaaggattaggctaataatctcagCTTCTTCGACCGATATGTACAAC
    P N S R H C W T P G F                                     T S S T D M Y N 70

254 TCTTGGCCCAATACTGGTCAAATCGTGTCTGACAACTCTCAGGATCGGAACTACCTGCAACCCAGATGGAAATGGTTCCCGAGTCTGTATGCTTATCA
    S W P N T G Q I V S Y N L R I E N T T C N P D G N G S R V C M L I 103

354 ATGGCCGTATGCCTGGACCTACTATTGTAGCGAACTGGGGTGgtaagtagtgtcatcactggcaaaaaaattgccagcactaacatacatagACACTATT
    N G R M P G P T I V A N W G                                     D T I 120
                                     → Cu1AF                                     513-Rev1 ←
454 CGCGTCACTGTTTCGCAACCTCCTGCAACACAACGGGACATCCATCCATTGGCACGGCTTTTCGCATGTTAAACAAGGTTATTTCAGGACGGCACGAATGGTG
    R V T V R N L L Q H N G T S I H W H G F R M L N K V I Q D G T N G 153

554 TTAAGTGAATGCGCTTTGGCCCCcGGAGACATCAAGACTTACGAGTTCCAGGCTACCGAGTATGGTACTACTTGGTATCATTCTCACTTCTCCCACCAGTA
    V T E C A L A P G D I K T Y E F Q A T E Y G T T W Y H S H F S H Q Y187

654 TGGTGATGGTGTAGTCGGCACTGTCCAGATCAACGGACCTGCTACTGCCAACTACGACGTGGATCTTGGTGTTATGCCCATGACTGACTGGTACTACATC
    G D G V V G T V Q I N G P A T A N Y D V D L G V M P M T D W Y Y I 220

754 ACTGCCTTCCAAGCCGCTCGTTCGCGCTGCTACAGGAGGCGGTGGCCACCTCTGCCAGACAATGTCTCATCAACGGTACATCCAAGAACGCAGCTGGCG
    T A F Q A A R R A A T G G G G P P L P D N V L I N G T S K N A A G 253

854 GTGGAGCCTGGAACAAGGTTTCCATCCAGAGCGGAAAGCGATACCGTCTCAGATTGGTCAACACTGCCGTAGATACCAACTTTATGGTCAATCTCGACAA
    G G A W N K V S I Q S G K R Y R L R L V N T A V D T N F M V N L D N287

```


954 CCACAACCTTCCAGGTCATCGCAACCGACTTCGTACCTGTGCGAGCCATACAACACAAGCTACCTCCAGATTGGCATTGGCCAACGCTACGATGTCATTTTC
 H N F Q V I A T D F V P V E P Y N T S Y L Q I G I G Q R Y D V I F 320

1054 ACTGCCAATCAAACCTGCTGGAACTACTGGTTCCGCGCTGTGGCTAACTCGAACTGTCAATCTCGTGCCGCGCCGTGAGGGTCGTGCCGTATTACCTACC
 T A N Q T A G N Y W F R A V A N S N C Q S R A A R E G R **A V F T Y** 353

1154 AGGGCCAGACTGTGCGCGATCCCACCAGTAACGCACAAGGCAACCCACCAACTGGATGTACCGACCCCGTTACCACCCCAAAGATCGTGAAGACCGTACC
Q G Q T V A D P T S N A Q G N P P T G C T D P V T T P I V K **T V P** 387

1254 TAGCAGCACTTTTGGCGCTCAAGCCAAGAGCCTCCCCGTTGCTTTTCGGCCCCGTCGCGGTGCAGAACAACCTCGTCCTCTGGACCATCAACGGAACATCC
S S T F A A Q A K S L P V A F G P V A V Q N N L V L W T I N G T S 420
 → 513-For1

1354 CAAGTCGTCGACCCGGGCAACCCACCATCAAGTACGTTGCAGAGAACAACAACAACTTCCCCCAGGCCTTGAATGT**CGTCGAAGTCTCATCTACCTCTG**
 Q V V D P G N P T I K Y V A E N N N N F P Q A L N V V E V S S T S 453
 Cu3R ←

1454 CCACCACCTGGACCTACTGGGTGATCCAACAAGCCGCCAACGCACCTCCCATCGCCACCCGATCCATCTCCACGGCCACGACAGCTACATCCTAGGCCA
 A T T W T Y W V I Q Q A A N A P P I A **H** P I **H** L **H** G **H** D S Y I L G Q 487

1554 AGGCACCGGCCAATTCAACGTCACCACCCACTTCAGCCAACCTCCGCTTCAACAACCCGCCTCGTCGCGACGTCGCCCAGCTCCAAGGTGGAGGCTGGTTA
 G T G Q F N V T T H F S Q L R F N N P P R R D V A Q L Q G G G W L 520

1654 GTCCTTGCCCTACCCGACCGACAACCCCGGAGCATGGCTCATGCACTGCCACATTGCCGtaagtcctccctccctcccccacatatcccccaataaccaca
 V L A Y P T D N P G A W L M **H C H** I A 539

1754 aactaaccttccaaacaaaaaataagTTCCACGTCGGCATGGGCCTATCCATCCAATTCTCGAACGCAAACAAAGCATCAACCTACCGGCCCC**CAGGCTCG**
 F **H** V G M G L S I Q F L E R K Q S I N L P A P G S 564
 513-For2

1854 CAATGGTTCCAAAACCTGCAATAATTGGGCGGCGTACAAGGCGGGCAACACGGATGTTTATCCGCAGGATGATTCTGGTTTGAGGAAGAGGTGGCCTGCAC
 Q W F Q N C N N W A A Y K A G N T D V Y P Q D D S G L R K R W P A 597
 513-Stop-Rev3 ←

1954 TTGGGGCTGAGAATTCTATGGCTGAGTGGTGAaaaagagaaaaatgattttatgaaaatattatcattttgtggtatggtattggtattggtttcacttgc
 L G A E N S M A E W 607

2054 ttttcttcttttcttttttttttggaaatctaacctttcagtcactogtttgatattcttaacgtogttttatgtatgctgattttacaagcttcgacttcg
 2154 agtacatattactctctcttctgtttatatttggcatttgcgactttttggattgctatatttggctatcttcatgtatatatttggtttgaaagatatg

2254 caatggtattttatttgggtgcattgctttttctatgagtttatgcatgtgcagtttgatatatggtatgaa

Abbildung 34: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Laccasegens von Stamm UHH 5-1-03. Grau sind die verwendeten Primer markiert (Pfeile geben die Primerorientierung an). Promotersignale (TATA-Box und GC-Boxen) sind in normalen schräg gestellten Buchstaben vermerkt. Klein geschriebene Buchstaben markieren Introns und nicht codierende untranslatierte Regionen. Konservierte Histidin- und Cysteinreste, die an der Kupferbindung beteiligt sind, sind umrandet. Vorhergesagte Glykosylierungsstellen sind unterstrichen. Die angenommene Schnittstelle des Signalpeptids (Aminosäuren 19-22) und das DSGL-Motiv (Aminosäuren 588-591) sind fett geschrieben. Das ausgefüllte Dreieck markiert die Polyadenylierungsstelle der mRNA. Die Nummern auf der linken Seite beziehen sich auf die Nukleotidsequenz, die Nummern auf der rechten Seite auf die Aminosäuresequenz.

nahe am experimentell bestimmten Wert (Abbildung 28A). Die Vorhersage von N-Glycosylierungsstellen ergab fünf hochwahrscheinliche Stellen, überwiegend zwischen *cbrI* und *cbrIV* (Abbildung 34). Am carboxyterminalen Ende (16 aa vor dem Stopp-Codon) wurde das für Ascomycetenlaccasen typische Sequenzmotiv DSG_L gefunden.

3.4.8. Nachweis der Expression des Laccasegens

Zur Identifizierung tryptischer Peptide des gereinigten Enzyms wurden laccasespezifische Banden aus einer SDS-PAGE ausgeschnitten und über Nacht mit Trypsin verdaut. Die Größe der entstandenen Peptide wurde mit Tandemmassenspektrometrie bestimmt.

Nach dem Abgleich der MS/MS-Daten gegen die *in silico* translatierte cDNA-Sequenz der Laccase auf einem MASCOT-Server konnten vier Peptide mit einer totalen MOWSE-Wertung von 223 ($P < 0,05$) identifiziert werden, die 12 % der zugrunde gelegten Sequenz abdeckten. Somit konnte die Expression des von der cDNA- und genomischen Sequenz abgeleiteten Proteins nachgewiesen werden. Die identifizierten Peptide sind in Abbildung 34 eingezeichnet.

3.5. Optimierung der Laccaseproduktion

3.5.1. Reactive Blue 19 als Elizitor und Tomatensaft als Medium

Die Verläufe von Laccaseaktivitäten in Überständen von Flüssigkulturen der Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 bei Verwendung verschiedener Elizitoren und Medien ist in Abbildung 35 dargestellt.

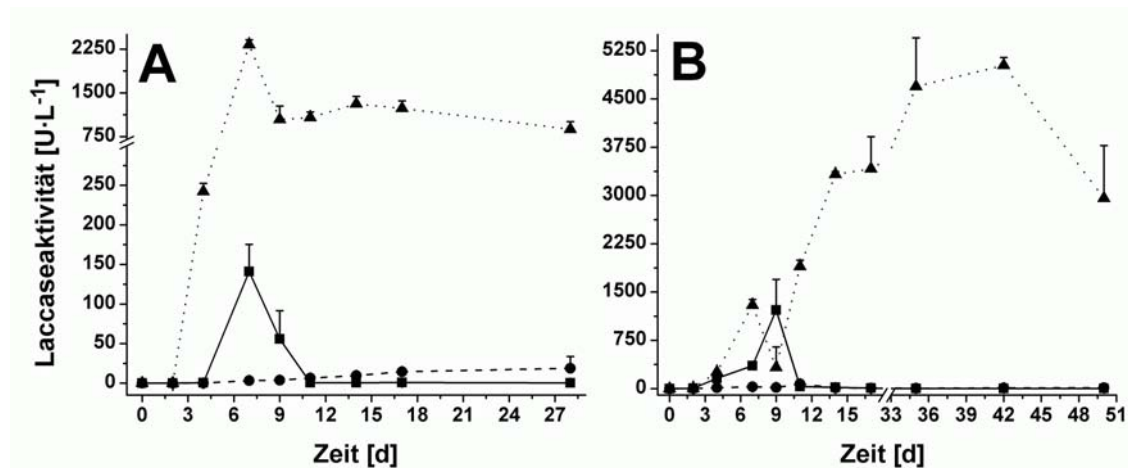


Abbildung 35: Laccaseaktivitäten in Flüssigkulturen der aquatischen Pilzstämme UHH 5-1-03 (A, Abszisse unterbrochen) und KI-S5 (B, Ordinate unterbrochen) unter verschiedenen Bedingungen: ■ - 2 % ME, 50 μM CuSO₄, 1 mM Vanillinsäure; ▲ - 2 % ME, 600 mg·L⁻¹ RBU19; ● - 12,5 % TS. Laccaseaktivitäten in Kulturen, die nur 2 % ME enthielten, überschritten zu keinem Zeitpunkt 20,9 U·L⁻¹ (UHH 5-1-03) bzw. 3,3 U·L⁻¹ (KI-S5). Dargestellt sind Mittelwerte von drei parallelen Ansätzen und Standardabweichungen.

Die Zugabe von Kupfersulfat und Vanillinsäure zu Malzextraktmedium war die etablierte Methode zur Erhöhung der Laccaseproduktion in anderen aquatischen Pilzen in unserem Labor (118). Unter diesen Bedingungen erreichten die Laccasetiter Werte von 1219 ± 475 U·L⁻¹ (UHH 5-1-03) und 141 ± 34 U·L⁻¹ (KI-S5). Im Gegensatz dazu wurden durch die Zugabe von RBU19 zu Malzextraktmedium in beiden Stämmen bedeutend höhere Laccaseaktivitäten erreicht. Der Stamm UHH 5-1-03 zeigte eine maximale Laccaseaktivität von 5022 ± 121 U·L⁻¹

nach der Zugabe von RBU19. Dies entspricht einer mehr als viermal höheren Aktivität als in Malzextraktkulturen, in denen die Laccaseproduktion mit Kupfersulfat und Vanillinsäure stimuliert wurde (Abbildung 35A). Allerdings war der Zeitpunkt des Erreichens der höchsten Aktivität deutlich verschoben (von Kulturtag 9 auf Kulturtag 42). Die maximalen Aktivitäten in Kulturen des Stammes KI-S5 erreichten $2324 \pm 128 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ am siebten Kulturtag und waren somit 16,5-mal höher verglichen mit Kulturen, die mit Kupfersulfat und Vanillinsäure versetzt wurden (Abbildung 35B). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Eignung von RBU19 als Stimulator der Laccaseproduktion in den verwendeten Stämmen aquatischer Pilze.

TS war ein geeignetes Medium zur Kultivierung der Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5. Diese Feststellung beruht auf Beurteilung des Wachstums mit bloßem Auge, da eine Trockenmassebestimmung aufgrund des Fruchtfleisches des TS, welches im Zuge der Kultivierung von den Pilzen verstoffwechselt wurde, nicht möglich war. Im Vergleich zu Malzextraktkulturen ohne Elizitoren wurden höhere Aktivitäten in Kulturen beider Stämme gemessen. Die maximalen Laccasetiter in 12,5 % TS betrugen $74,7 \pm 11 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ am Kulturtag 11 für UHH 5-1-03 (Abbildung 35A) und $18,8 \pm 15 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ am Kulturtag 28 für KI-S5 (Abbildung 35B). Dies entspricht einer 3,6-mal höheren Laccaseproduktion bei Stamm UHH 5-1-03 und einer 5,7-mal höheren Aktivität bei Stamm KI-S5, jeweils verglichen mit nicht induzierten Malzextraktkulturen.

3.5.2. Identifizierung optimaler Produktionsbedingungen

Um den Einfluss der oben genannten Verbindungen und von TS auf die Laccaseproduktion der Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 genauer einschätzen zu können, wurde ein statistisches Versuchsdesign (Abschnitt 2.2.2.1) gewählt.

Der Verlauf der Laccaseaktivitäten für vier repräsentative Kombinationen (*treatment*, T) der verwendeten Konzentrationen von RBU19, CuSO_4 und TS für Stamm UHH 5-1-03 und KI-S5 sind in Abbildung 36 dargestellt.

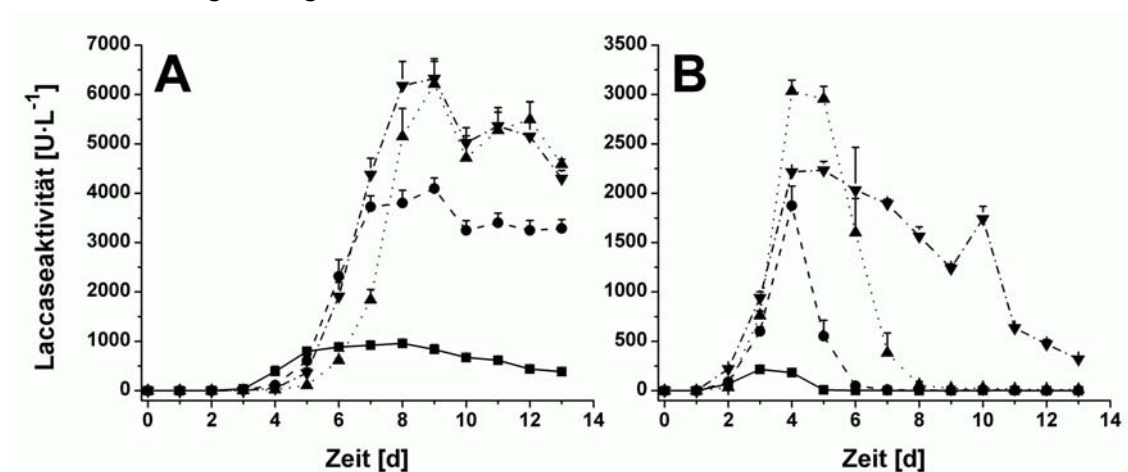


Abbildung 36: Laccaseaktivitäten in Flüssigkulturen (Erlenmeyerkolben) der Stämme UHH 5-1-03 (A) und KI-S5 (B) unter verschiedenen Bedingungen: ■ - 10 % TS, $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19; ● - 20 % TS, $150 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19; ▲ - 30 % TS, $250 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19, ▼ - (A) 30 % TS, $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19; (B) 10 % TS, $250 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19. Dargestellt sind Mittelwerte von drei parallelen Ansätzen (Zentralpunkt, ●: $n = 9$) und Standardabweichungen.

Die maximalen Enzymaktivitäten wurden nach einer erheblich verkürzten Kultivierungsdauer (neun Tage), verglichen mit RBU19-versetzten Malzextraktkulturen, erreicht. Dies entspricht einer zeitbezogenen Produktion von $702 \text{ U} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ im Falle des effektivsten *treatments*, verglichen mit $120 \text{ U} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ im Versuch mit ME und RBU19 (Abbildung 35).

Die Laccaseaktivitäten des Kulturtages 8 wurden für die statistische Analyse ausgewählt (Tabelle 5). Die höchsten Aktivitäten wurden in *treatment 7* (T7) gemessen, diese Ansätze enthielten die höchste Konzentration an TS (30 %) und RBU19 ($450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), aber die geringste Kupfersulfatkonzentration ($50 \text{ } \mu\text{M}$). Im Vergleich zum Zentralpunkt (20% TS, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19, $150 \text{ } \mu\text{M}$ CuSO_4) war die Aktivität um Faktor 1,6 erhöht.

Eine polynomiale Gleichung zweiter Ordnung wurde verwendet (Formel 6), um ein Modell für die experimentellen Daten der Laccaseproduktion im Stamm UHH 5-1-03 zu erhalten. Der multiple Korrelationskoeffizient R^2 betrug 0,9822.

$$\begin{aligned} \text{Laccase (U} \cdot \text{L}^{-1}) = & 1231 + 558 X_{\text{Tomatensaft}} - 176 X_{\text{CuSO}_4} + 1759 X_{\text{RBU19}} - 23 X_{\text{Tomatensaft}} X_{\text{CuSO}_4} \\ & + 776 X_{\text{Tomatensaft}} X_{\text{RBU19}} - 269 X_{\text{CuSO}_4} X_{\text{RBU19}} - 45 X_{\text{Tomatensaft}} X_{\text{CuSO}_4} X_{\text{RBU19}} \end{aligned}$$

Formel 6

In Formel 6 ist X der codierte Wert (zwischen -1 und $+1$) der Faktoren (Tabelle 5). Es wurde eine gute Korrelation zwischen den realen und den berechneten Werten erreicht (Tabelle 5). Eine Varianzanalyse der Hauptfaktoren und Interaktionen wurde durchgeführt (Tabelle 25). Alle Koeffizienten waren statistisch signifikant ($P < 0,000001$), mit Ausnahme von CuSO_4 ($P < 0,01$). Die Interaktion TS x CuSO_4 und die Dreifachinteraktion waren nicht signifikant. Dennoch wurden die nicht signifikanten Terme in die Gleichung einbezogen, um die Hierarchie des Modells zu bewahren.

Zusammengefasst hatten TS und RBU19 einen positiven Einfluss auf die Laccaseproduktion von UHH 5-1-03, der direkt proportional zur Konzentration war.

Tabelle 25: Varianzanalyse der Effekte der Mediumkonzentration (TS) und der Induktorkonzentrationen (RBU19 und CuSO_4) sowie deren Interaktionen auf die Laccaseproduktion von Stamm UHH 5-1-03 in Erlenmeyerkolben. SQ – Summe der Quadrate, FG – Freiheitsgrad(e), MQ – Mittel der Quadrate, F – Fischer-Wert, P – Signifikanzniveau.

	SQ	FG	MQ	F	P
Konstante	9927596	1	9927596	1210292	0,000000
TS	7482180	1	7482180	912167	0,000000
CuSO_4	744037	1	744037	90707	0,0060
RBU19	74297562	1	74297562	9057758	0,000000
Interaktionen					
TS x CuSO_4	13592	1	13592	0,1657	0,687571
TS x RBU19	14464550	1	14464550	1763401	0,000000
CuSO_4 x RBU19	1738268	1	1738268	211916	0,000114
Fehler	1968635	24			
Gesamt-SQ	110687068	32			

Im Falle des Stammes KI-S5 wurden die maximalen Laccaseaktivitäten am Kulturtag 4 gemessen (Abbildung 36B). Auch für diesen Stamm war die Zeitspanne bis zum Erreichen der maximalen Enzymaktivität im Vergleich zu Malzextraktkulturen, welche mit RBU19 versetzt

waren (sieben Tage, Abbildung 35B), merklich verkürzt. Die mit Kl-S5 in diesem Versuch maximal erreichte Enzymaktivität entspricht einer erhöhten zeitbezogenen Produktion von $759 \text{ U} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, verglichen mit $332 \text{ U} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ im Versuch mit Malzextraktmedium und RBU19 (Abbildung 35).

Die statistische Analyse der Laccaseproduktion in Stamm Kl-S5 wurde mit den Ergebnissen des Kulturtages 5 durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war die Laccaseaktivität in den Ansätzen, welche die höchsten eingesetzten Konzentrationen an TS und CuSO_4 sowie RBU19 enthielt, im Vergleich zum Zentralpunkt (20 % TS, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RBU19, $150 \text{ } \mu\text{M}$ CuSO_4 ; Tabelle 5) um Faktor 5,4 erhöht. Eine Erhöhung der CuSO_4 -Konzentration auf $250 \text{ } \mu\text{M}$ führte in allen Fällen zu einer erhöhten Aktivität, ausgenommen bei einer RBU19-Konzentration von $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ und 30 % TS. Bei einer CuSO_4 -Konzentration von $250 \text{ } \mu\text{M}$ führte die Erhöhung der RBU19-Konzentration zu einer steigenden Laccaseaktivität auch bei der niedrigsten eingesetzten Tomatensaftkonzentration.

Auch für Stamm Kl-S5 wurde eine Polynomgleichung zweiter Ordnung verwendet, um die experimentellen Daten der Laccaseproduktion in einem Modell zu erfassen (Formel 7). Der multiple Korrelationskoeffizient R^2 betrug in diesem Fall 0,9893.

$$\begin{aligned} \text{Laccase (U} \cdot \text{L}^{-1}) = & -441 + 180 X_{\text{Tomatensaft}} + 565 X_{\text{CuSO}_4} + 722 X_{\text{RBU19}} - 232 X_{\text{Tomatensaft}} X_{\text{CuSO}_4} \\ & + 406 X_{\text{Tomatensaft}} X_{\text{RBU19}} + 313 X_{\text{CuSO}_4} X_{\text{RBU19}} + 6.825 X_{\text{Tomatensaft}} X_{\text{CuSO}_4} X_{\text{RBU19}} \end{aligned}$$

Formel 7

In Formel 7 ist X der codierte Wert (zwischen -1 und $+1$) für die verwendeten Faktoren (Tabelle 5). Die experimentell bestimmten und die auf Basis des Modells berechneten Laccaseaktivitäten (Tabelle 5) zeigten eine gute Übereinstimmung. Tabelle 26 zeigt die Varianzanalyse der Hauptfaktoren und deren Interaktionen für Stamm Kl-S5. Alle Koeffizienten der Gleichung waren statistisch signifikant ($P < 0,000001$), ausgenommen die Dreifachinteraktion (TS x CuSO_4 x RBU19). Auch in diesem Fall wurde diese in die Gleichung aufgenommen, um die Hierarchie des Modells zu erhalten. Zusammengefasst hatten alle getesteten Faktoren mit steigender Konzentration einen positiven Effekt auf die Laccaseproduktion des Stammes Kl-S5. RBU19 hatte den größten Einfluss, gefolgt von CuSO_4 .

Tabelle 26 Varianzanalyse der Effekte der Mediumkonzentration (TS) und der Induktorkonzentrationen (RBU19 und CuSO_4) sowie deren Interaktionen auf die Laccaseproduktion von Stamm Kl-S5 in Erlenmeyerkolben. SQ – Summe der Quadrate, FG – Freiheitsgrad(e), MQ – Mittel der Quadrate, F – Fischer-Wert, P – Signifikanzniveau.

	SQ	FG	MS	F	P
Konstante	1275075	1	1275075	948692	0,000000
TS	776423	1	776423	577681	0,000000
CuSO_4	7677941	1	7677941	5712603	0,000000
RBU19	12524408	1	12524408	9318509	0,000000
Interaktionen					
TS x CuSO_4	1294873	1	1294873	963422	0,000000
TS x RBU19	3973419	1	3973419	2956335	0,000000
CuSO_4 x RBU19	2360611	1	2360611	1756361	0,000000
Fehler	322569	24			
Gesamt-SQ	30206437	32			

3.5.2.1. Interaktionen zwischen *Reactive Blue 19* und Tomatensaft

Es wurde ein synergistischer Effekt von RBU19 und TS auf die Laccaseproduktion des Stammes UHH 5-1-03 festgestellt (Tabelle 5). Eine Erhöhung der RBU19-Konzentration führte bei einer TS-Konzentration von 10 % und 50 μM CuSO_4 (T1 und T2 in Tabelle 5) zu einer Steigerung der Laccasetiter um Faktor 3,5. Bei einer TS-Konzentration von 30 % und 50 μM CuSO_4 war der durch die Erhöhung der RBU19-Konzentration bewirkte Anstieg der Laccaseaktivität 13-fach höher (T6 und T7). Eine Änderung der CuSO_4 -Konzentration auf 250 μM führte zu keiner Veränderung der Aktivität in Bezug auf RBU19 und TS (T6 bis T9).

Der gleiche synergetische Effekt wurde auch für Stamm KI-S5 beobachtet (Tabelle 5). Bei Verwendung von 50 μM CuSO_4 produzierte Stamm KI-S5 nahezu keine Laccase bei einer RBU19-Konzentration von 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, unabhängig von der eingesetzten Tomatensaftkonzentration (T1 und T6). Dies änderte sich, wenn die RBU19-Konzentration auf 450 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ angehoben wurde. In diesem Fall hatte die TS-Konzentration einen erheblichen Einfluss auf die gemessenen Laccasetiter (T1, T2, T6 und T7). Bei Einsatz von 10 % TS war die Laccaseproduktion sehr niedrig (T1 und T2), wohingegen ein 67,5-facher Anstieg bei Erhöhung der TS-Konzentration auf 30 % beobachtet wurde (T2 und T7).

3.5.3. Maßstabsvergrößerung der Laccaseproduktion

Die optimalen Bedingungen für die Laccaseproduktion, wie in Abschnitt 3.5.2 bestimmt, wurden für die Laccaseproduktion in Rührkesselreaktoren (2 L Arbeitsvolumen) für Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 verwendet (Abbildung 37).

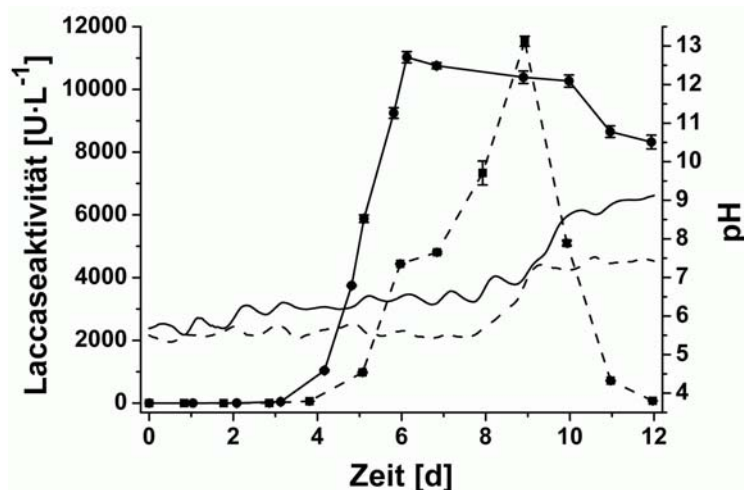


Abbildung 37: Laccaseproduktion in einem 2-L-Rührkesselreaktor durch die Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5. Durchgezogene Linien - Laccaseaktivitäten (●) und pH-Werte für UHH 5-1-03, gestrichelte Linien - Laccaseaktivitäten (■) und pH-Werte für KI-S5. Fermentationen wurden mit 30 % TS, 450 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ RBU19 und 50 μM (UHH 5-1-03) bzw. 250 μM (KI-S5) CuSO_4 durchgeführt. Für die Laccaseaktivität sind die Mittelwerte von vier parallelen Messungen und die Standardabweichung dargestellt, die pH-Werte wurden kontinuierlich bestimmt.

Im Fermentationslauf mit Stamm UHH 5-1-03 begann die Laccaseproduktion am zweiten Kulturtag. Die Aktivität stieg bis zum sechsten Kulturtag an und erreichte ein Maximum von $11026 \pm 177 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$. Gleichzeitig wurde ein leichter Anstieg des pH-Wertes verzeichnet. Laccaseaktivitäten von mehr als $10000 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ wurden bis zum zehnten Kulturtag gemessen. Zu diesem Zeitpunkt kam es zu einem starken Anstieg des pH-Wertes, welcher von einem Abfall

der Laccaseaktivität gefolgt wurde. Im Vergleich zu den Experimenten in Erlenmeyerkolben konnte die Laccaseproduktion bei einer gleichzeitigen Verkürzung der Kultivierungsdauer um drei Tage um mehr als $4700 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ gesteigert werden. Dies entspricht einer zeitbezogenen Enzymproduktion von $1838 \text{ U}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ gegenüber $702 \text{ U}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ bei optimalen Bedingungen in Erlenmeyerkolben (vergleiche Abschnitt 3.5.2).

Die Kultur des Stammes Kl-S5 begann nach drei Kulturtagen Laccase zu bilden, die Aktivität erreichte ein Maximum von $11534 \pm 161 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ am neunten Kulturtag (Abbildung 37). Danach fiel die Aktivität stark ab. Es konnte ein Anstieg des pH-Wertes beobachtet werden, welcher am achten Kulturtag begann. Verglichen mit den Experimenten in Erlenmeyerkolben war eine längere Kultivierungsdauer nötig, um den maximalen Laccasetiter zu erreichen. Dennoch war die zeitbasierte Produktion deutlich erhöht (Fermenter: $1282 \text{ U}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$, Erlenmeyerkolben: $759 \text{ U}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$; vgl. Abschnitt 3.5.2).

4. Diskussion

4.1. Klassifizierung der Stämme

Auf Basis der Identifizierungsdaten (Abschnitt 3.1.1) kann für die drei im Rahmen der vorliegenden Arbeit intensiver untersuchten Stämme UHH 5-1-03, Kl-S5 und Tt-S1 (vgl. Abschnitt 3.1.3) mit Bestimmtheit festgehalten werden, dass es sich nicht um aquatische Hyphomyceten bzw. aeroaquatische Hyphomyceten handelt. Zum einen wurden keine speziellen Sporenformen gefunden, die auf eine Anpassung an die aquatische Umgebung hindeuten, zum anderen sind die Stämme UHH 5-1-03 und Kl-S5 Coelomyceten-Anamorphe. Allerdings kann daraus nicht geschlussfolgert werden, dass es sich um terrestrische Pilze handelt. Shearer *et al.* (242) treffen dazu folgende Aussage: Die Gruppe der „diversen mitosporen Süßwasserascomyceten“ (*miscellaneous freshwater mitosporic ascomycetes*, siehe Einleitung) enthält generell Pilze, deren Konidien nicht markant an eine aquatische Umwelt angepasst sind. Der Stamm UHH 5-1-03 konnte aufgrund molekularbiologischer Daten in die systematische Nähe der Ordnung *Pleosporales*, Gattung *Leptosphaeria* gestellt werden. Aus dieser Ordnung wurden zahlreiche Vertreter in aquatischen Habitaten identifiziert (insgesamt 91 Arten nach Reid und Paice (242) und 62 Arten in tropischen Gewässern nach Goh und Hyde (88)). Arten der Gattung *Leptosphaeria* wurden auf seneszenten Blättern von *Typha latifolia* (Rohrkolben) nachgewiesen (287). Die anamorphe Form des Stammes Kl-S5 kann der Gattung *Coniothyrium* bzw. *Microsphaeropsis* zugeordnet werden. Aus beiden Gattungen wurden bereits Vertreter von holzigen Substraten in aquatischen Habitaten isoliert (*Freshwater Ascomycete Database*, Süßwasser-Ascomyceten-Datenbank; <http://www.life.uiuc.edu/fungi>). Die Gattung *Alternaria*, zu der Stamm Tt-S1 gehört, ist eine häufig vorkommende terrestrische Pilzgattung, die Vertreter der primären Saprophyten auf terrestrischen Pflanzen beinhaltet. Ihr Vorkommen ist jedoch auch für aquatische Umgebungen beschrieben worden (266). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass insbesondere Stamm Tt-S1 an hohe Salzgehalte, wie sie auch an seinem Isolationsstandort anzutreffen sind, angepasst ist (Tabelle 2, Abbildung 12). Aus den oben genannten Gründen erscheint eine Einordnung der verwendeten Stämme in die Gruppe der diversen mitosporen Süßwasserascomyceten plausibel (242).

4.2. Eignung von aquatischen Pilzen zur Farbstoffbehandlung

Screening und Stammauswahl

Insgesamt 132 Pilzisolat aus aquatischen Umgebungen wurden auf ihre Fähigkeit zur Entfärbung des Azofarbstoffs RBk5 und des Anthrachinonfarbstoffs RBU19 in Agarplattenkulturen getestet. Darunter befanden sich 33 Stämme, die beide Farbstoffe zumindest teilweise entfärbten, 20 Stämme entfärbten nur RBU19 und sechs Stämme entfärbten nur RBk5. Es waren somit 45 % der getesteten aquatischen Isolate (59 Stämme) in der Lage, zumindest einen Farbstoff zu entfärben. Die Fähigkeit zur Entfärbung von Textilfarbstoffen wurde für 21 Stämme eingehender in einem miniaturisierten Flüssigkulturtestsystem evaluiert (Tabelle 9). Ein genauer Vergleich des Entfärbungsvermögens der leistungsfähigsten aquatischen mitosporen Stämme mit dem von ausgewählten Weißfäulepilzstämmen ergab, dass

ein Großteil der eingesetzten Farbstoffe von bestimmten aquatischen Stämmen ähnlich effektiv entfärbt wurde, wie durch den leistungsfähigsten Weißfäulepilz (Tabelle 10, Abbildung 10). Unter bestimmten Bedingungen entfärbten mitospore aquatische Isolate Farbstoffe sogar in einem höheren Maße als der effizienteste Weißfäulepilz (Abschnitt 3.1.3). In der Literatur sind bereits Stämme mitosporer Schimmelpilze beschrieben, die Farbstoffe entfärbten (114). Nach Kenntnis des Autors wurde allerdings die Entfärbung von synthetischen Textilfarbstoffen durch aquatische Hyphomyceten bis zum heutigen Tag nicht beschrieben.

Mehrere Arbeitsgruppen haben publiziert, dass Anthrachinonfarbstoffe mit höheren Raten als Azofarbstoffe durch Weißfäulepilze entfärbt werden (1, 114). Diese Beobachtung kann allerdings nicht generalisiert werden, da in der vorliegenden Arbeit anhand mehrerer Beispiele gezeigt wurde, dass sowohl aquatische Isolate als auch Weißfäulepilze bestimmte Azofarbstoffe effizienter als Anthrachinonfarbstoffe entfärbten (Tabelle 10).

Die Entfärbungsleistungen der effizientesten mitosporen aquatischen Isolate sind nicht auf einzelne Farbstoffe beschränkt (Tabelle 10). Dies stellt einen beträchtlichen Vorteil dar, variiert doch in realen Abwässern die Farbstoffzusammensetzung häufig (97, 206, 286). Mithilfe der relativ unkompliziert anzuwendenden Methodik des Mikrotiterplattenscreenings wurde ein hohes und bislang ungenutztes Potenzial von aquatischen Pilzen zur Entfärbung von Textilfarbstoffen deutlich. Die getesteten aquatischen Pilzstämmen zeigten nicht nur im Vergleich zu den mitgeführten Referenzstämmen von Weißfäulepilzen eine hohe Entfärbungsleistung. Sie schnitten auch im Vergleich mit Ergebnissen von Screenings einer großen Anzahl von Weißfäulepilzstämmen, welche im Rahmen des EU-Projektes SOPHIED unter standardisierten Bedingungen durch verschiedene Projektpartner getestet wurden, überdurchschnittlich gut ab (Daten vertraulich).

Der Farbstoff ABu62 wurde in Erlenmeyerkolben mit Malzextraktmedium durch alle hierfür ausgewählten Stämme effizient entfärbt (Abbildung 13A). Die dabei erreichten Entfärbungen sind vergleichbar mit den denen von sechs Stämmen verschiedener Weißfäulepilze (*Pycnoporus sanguineus*, *Coriolopsis polyzona*, *Perenniporia ochroleuca*, *Perenniporia tephropora*, *Trametes versicolor*), welche unter ähnlichen Bedingungen getestet wurden (277). Auch der von Vanhulle *et al.* (277) beschriebene Zeitraum von 14 Tagen, nach welchem keine Veränderungen der Absorption mehr zu beobachten waren, deckt sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit (Abbildung 13A). Die Kinetik des Abbaus von RBu19 durch UHH 5-1-03 zeigte eine deutliche initiale lag-Phase (zwei Tage, Abbildung 13B), bevor die Entfärbung einsetzte. Dies könnte auf eine Induktion von an der Entfärbung beteiligten Enzymen hindeuten (278). Ähnliche Entfärbungen von RBu19 wurden nach fünf Tagen durch Kulturen von *Pleurotus calyptratus* erreicht, nach 15 Tagen blieb die Entfärbungsleistung hinter der von Stamm UHH 5-1-03 zurück (71). ABk210 wurde sehr effizient durch Kulturen der Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 entfärbt (Abbildung 13D). Die dabei erreichte Bleichung und die benötigte Zeitspanne waren bedeutend höher bzw. kürzer als für die Entfärbung von ABk210 durch den Basidiomycetenstamm PV 002 beschrieben (279). In dieser Studie wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, nur geringe Laccaseaktivitäten während der Entfärbung gemessen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei der Entfärbung von Einzelfarbstoffen in ME die getesteten Stämme UHH 5-1-03, KI-S5 und Tt-S1 entweder ähnlich effizient bzw.

effizienter waren als Weißfäulepilzstämmen in vergleichbaren, in der Literatur beschriebenen Experimenten.

Entfärbungen unter Modellabwasserbedingungen

Hohe Konzentrationen von anorganischen Ionen, z. B. Sulfat oder Chlorid sowie alkalische pH-Werte, wie sie an einigen Isolationsstandorten vorlagen, sind ebenfalls typisch für industrielle, farbstoffhaltige Abwässer (59, 206, 240). Erhöhte Salzkonzentrationen regten das Wachstum, die Laccaseproduktion und die Entfärbung von synthetischen Farbstoffen in zwei Basidiomyceten an, welche aus marinen Umgebungen isoliert wurden (59, 210). Das Wachstum des Stammes Tt-S1 wurde ebenfalls durch erhöhte Salzkonzentrationen stimuliert (Abbildung 12). Hohe Konzentrationen an anorganischen Ionen wirken sich im Allgemeinen ungünstig auf konventionelle Abwasserbehandlungssysteme aus (17, 206), werden aber auch in natürlichen aquatischen Umgebungen gefunden. Mögliche Anpassungen dort vorkommender Organismen könnten also von Vorteil bei der Behandlung solcher Abwässer sein. Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieser Parameter anhand simulierter Abwässer mit unterschiedlichem Salzgehalt und teilweise basischen pH-Werten (Tabelle 4) untersucht. Die erhöhte Entfärbung von RBU19 durch die Stämme Tt-S1 und KI-S5 unter den stark salzhaltigen Bedingungen des Modellabwassers für Reaktivfarbstoffe kann als Indikator für die postulierte Anpassung dieser Stämme an die Bedingungen am Isolationsstandort interpretiert werden (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 15 mit Tabelle 12 und Abbildung 13). Ähnliche Schlüsse zogen Raghukumar *et al.* (210) für einen aus Meerwasser isolierten Stamm von *Flavodon flavus*, welcher in Anwesenheit von künstlichem Meerwasser in der Lage war, farbstoffhaltige Abwässer zu entfärben. Die Entfärbung von verschiedenen Modellabwässern mit Kulturen aquatischer Pilze, die ME als Kosubstrat enthielten, zeigte je nach verwendetem Modellabwasser eine unterschiedliche Effizienz der Stämme. Wesenberg *et al.* (285) beschreiben eine Entfärbung eines realen Abwassers zu 87 % durch *Clitocybula dusenii* nach 20 Tagen. In dieser Studie wurde das Abwasser allerdings mit Medium verdünnt (25 % Abwasser), es wurde mit zuvor angezogener Biomasse (Wachstum für fünf Tage vor der Zugabe von Abwasser) gearbeitet und die Bildung von MnP, welche wahrscheinlich am Abbau beteiligt war, wurde nachgewiesen. Die Autoren machten keine Angaben über weitere Bestandteile des Abwassers neben den enthaltenen Farbstoffen. Stämme von *Bjerkandera adusta* und *Phlebia tremellosa* entfärbten ein künstliches Abwasser innerhalb von neun Tagen zu mehr als 70 %. In beiden Fällen wurden Laccase- und LiP-Aktivitäten gemessen (219). Allerdings enthielt das verwendete künstliche Abwasser keine Salze und es wurden keine extremen pH-Werte verwendet. Ein mit Medium verdünntes (1:10), nicht näher definiertes Abwasser wurde durch einen Stamm von *Thelephora* sp. innerhalb von vier Tagen zu 50 % entfärbt (238). In diesem Fall kam es im Anschluss daran zu einem erneuten Anstieg der Absorption. Aufgrund der geringen Anzahl an Studien, in denen reale Abwässer bzw. Modellabwässer verwendet wurden sowie der Tatsache, dass die Abwässer in den meisten Fällen nicht näher charakterisiert wurden, kann kein umfassender Vergleich mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen angestellt werden.

4.3. Mechanismen des Farbstoffabbaus bei aquatischen Pilzen

Die in einer Vielzahl von Studien (50, 123, 189, 260) untersuchte Entfärbung von Farbstoffen mit Kulturen, die eine Nährstoff- und Energiequelle im Medium enthielten, ist für die Einschätzung des Potenzials der dabei eingesetzten Stämme zur Farbstoffbehandlung wertvoll. Die Ergebnisse derartiger Studien sind allerdings bei der Entwicklung realer, praktikabler Verfahren zur Abwasserbehandlung nur begrenzt aussagekräftig, da unter praktischen Gesichtspunkten kometabolische Bedingungen mit erhöhten Kosten verbunden und somit schwer zu realisieren sind. Im Resultat der vorliegenden Arbeit offenbarten sich deutliche Unterschiede in den Entfärbungsleistungen von Kulturen mit und ohne zusätzliche Kohlenstoff- und/oder Energiequelle, die die Relevanz der durchgeführten Untersuchungen bestätigen (Tabelle 14, Tabelle 15).

Der Abbau von Farbstoffen und anderen organischen Schadstoffen durch Pilze ist als vorwiegend kometabolisch beschrieben (8, 90, 152, 175), das heißt, die Schadstoffe werden nicht als Kohlenstoff- und/oder Energiequelle verwertet. So wurde festgestellt, dass der Weißfäulepilz *Bjerkandera* sp. BOS55 weder Anthracen abbauen, noch den Farbstoff Poly R-478 entfärben kann, wenn kein Kosubstrat im Medium vorhanden ist (138). Swamy und Ramsay (259) bestimmten für Kulturen von *Trametes versicolor* eine kritische Glukosekonzentration von $0,1 - 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, die erforderlich ist, damit eine Entfärbung verschiedener Farbstoffe stattfinden kann. Es wurde keine Entfärbung mehr festgestellt, wenn die Glukose im Medium komplett aufgebraucht war. Der Abbau von modifizierten Azofarbstoffen durch *Phanerochaete chrysosporium* war von der Saccharosekonzentration im Medium abhängig (170). Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Stamm UHH 5-1-03 war auch ohne Kosubstrat in der Lage, alle getesteten Farbstoffe über bestimmte Zeiträume zu entfärben (Abbildung 19, Abbildung 20). Allerdings nahm die Entfärbungsleistung mit der Zeit ab. Als wahrscheinlichste Ursache ist eine allmählich abnehmende metabolische Aktivität in Abwesenheit einer Kohlenstoff- und Energiequelle anzusehen. Die Verwertung von Farbstoffen als Kohlenstoff- und Energiequelle durch den Stamm UHH 5-1-03 kann nicht ausgeschlossen werden, ein entsprechender Nachweis steht noch aus. Trotzdem stellt der Einsatz von „ruhenden“ Zellen (*resting cells*) eine Alternative zur Farbstoffbehandlung durch Pilze in Anwesenheit zusätzlicher Kohlenstoff- und Energiequellen dar, da in entsprechenden Verfahren in geeigneten Zeitabständen inaktive Biomasse durch frisches, aktives Myzel ersetzt werden könnte. Der Prozess der Entfärbung von Farbstoffen in Abwesenheit von Kohlenstoff- und Energiequellen ist als Biotransformation anzusehen, da Sorption und abiotische Prozesse als Faktoren der Entfärbung und Konzentrationsabnahme durch das Experimentaldesign ausgeschlossen werden konnten (Abschnitt 2.2.2, Tabelle 16). Für die Auswahl des Stammes UHH 5-1-03 für nachfolgende Bioreaktorversuche im Labormaßstab spricht ebenfalls die Verringerung des CSB in Kulturen ohne zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequelle (Tabelle 17, Abbildung 26).

Der Nachweis von neuen Absorptionspeaks in den Kulturen des miniaturisierten Flüssigkultursystems in 40 der getesteten 168 Kombinationen (zwölf Farbstoffe und 14 Stämme) ist ein Indikator für eine Biotransformation der Farbstoffe (Tabelle 11). Dies war, für bestimmte Farbstoffe, ebenso der Fall für die effizient entfärbenden aquatischen Stämme

UHH 5-1-03, Kl-S5 und SaSe-B6. Abbauwege von Farbstoffen durch Pilzkulturen, die die Bildung von Zwischenprodukten und deren weitere Metabolisierung beinhalten, sind nur unzureichend beschrieben (286). Die bei vergleichbaren Wellenlängen auftretenden, neuen Absorptionspeaks nach der Behandlung von Farbstofflösungen mit Pilzkulturen unterschiedlicher taxonomischer Gruppen (Tabelle 3) weisen auf die Bildung identischer Metaboliten und somit auf zumindest teilweise gleiche Abbauwege bei Basidiomyceten und anderen Pilzgruppen hin. Diese Annahme konnte in der Folge für die Biotransformation des Farbstoffes ABu62 durch das aquatische Isolat UHH 5-1-03 bestätigt werden, da Metaboliten detektiert werden konnten (Abschnitt 3.2.6), welche ebenfalls durch den Abbau des Farbstoffes mit dem Weißfäulepilz *Pycnoporus sanguineus* beschrieben wurden (277). Darüber hinaus deuten stamm- und farbstoffspezifische Absorptionspeaks auf unterschiedliche Farbstoffabbauwege hin.

In den Entfärbungsversuchen in Erlenmeyerkolben wurde die Abnahme der Absorption auf Basis integrierter Spektren verfolgt. Diese Methode bietet im Gegensatz zu Messungen bei definierten Wellenlängen den Vorteil, die gesamte Färbung einer Lösung zu erfassen. Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, kommt es bei der Umsetzung von Farbstoffen oft zu einer Bildung von gefärbten Metaboliten (Tabelle 11), deren Absorptionsspektren sich mit denen der jeweiligen Ausgangsverbindungen überlagern können. Messungen bei definierten Wellenlängen bergen daher die Gefahr, dass die Entfärbungsleistung eines bestimmten Prozesses falsch eingeschätzt wird. Dies spiegelt sich auch in den Absorptionsverläufen der integrierten Spektren der Entfärbungsversuche wider (Abbildung 13). Bei einigen Stamm-Farbstoff-Kombinationen kam es zu einer Entfärbung der Lösung, bis ein bestimmtes Plateau erreicht wurde. Dies deutet auf die Biotransformation der Farbstoffe zu farbigen Metaboliten hin, welche im weiteren Versuchsverlauf nicht weiter umgesetzt wurden. In einigen Kulturüberständen kam es während der Entfärbungsversuche nach anfänglicher Entfärbung zu einer Zunahme der Absorption (Abbildung 15C). Möglicherweise wurde zunächst ein farbloses bzw. geringer gefärbtes Zwischenprodukt gebildet, welches anschließend zu einem im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbierendem Endprodukt umgesetzt wurde. Ähnliches deutet auch der Entfärbungsversuch von ABk210 mit gereinigter Laccase aus Stamm UHH 5-1-03 an (Abbildung 29). Eine alternative Erklärung wäre die Bildung von pilzeigenen Pigmenten, dies ist jedoch unwahrscheinlich, da kein Absorptionsanstieg in Kulturen beobachtet wurde, die unter denselben Bedingungen mitgeführt wurden, allerdings keinen Farbstoff enthielten.

Relevante Enzyme und mögliche Wechselwirkungen mit Farbstoffen

Die beobachtete konzentrationsabhängige Entfärbung unterschiedlicher Farbstoffe durch einige der untersuchten Pilzstämme (Abbildung 10) demonstriert stamm- oder auch artspezifische Entfärbungsleistungen der Pilze, welche auf unterschiedlichen Affinitäten farbstofftransformierender Enzyme gegenüber den Farbstoffen als Substraten beruhen könnten. Ein Beispiel dafür ist das extrazelluläre Enzym Laccase, welches von Pilzen ausgeschieden wird (14). Es ist bekannt, dass dieses Enzym am Farbstoffabbau beteiligt ist (286). So bestimmten Rodríguez *et al.* (224) für zwei Isoformen der Laccase aus *Trametes hispida* K_M -Werte von 3500 μM bzw. 3900 μM gegenüber dem Farbstoff *Reactive Blue 158*. Für die Laccase aus *Cerreña unicolor* wurde für ABu62 ein K_M -Wert von 541 μM (176) und für eine Laccase aus *Pycnoporus sanguineus* eine Halbsättigungskonzentration von 110 μM für ABu62 (267)

bestimmt. Bei Annahme einer Beteiligung der Laccase an der Entfärbung von RBU19 durch die Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5, welche Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand zeigten (Abbildung 16B) sowie bei gleichzeitiger Berücksichtigung der unterschiedlichen Abbaueffizienzen der beiden Stämme (Abbildung 15C) könnte dies auf unterschiedliche katalytische Eigenschaften der Laccasen beider Stämme hindeuten. In der Literatur sind sowohl Laccasen beschrieben, die RBU19 umsetzen können (16, 39, 64), als auch solche, die dazu nicht in der Lage sind (248).

Neben zu erwartenden Unterschieden in den katalytischen Eigenschaften der an der Entfärbung beteiligten Enzyme hat zweifellos auch ihre gebildete Menge, welche organismenabhängig variieren kann, einen Einfluss auf die Entfärbungsleistung. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass beim AQH *Clavariopsis aquatica* ein großer Teil der extrazellulären Laccaseaktivität zellassoziiert vorliegt und somit nicht im Kulturüberstand nachweisbar ist (255). Ein Teil der Laccaseaktivität in *Neurospora crassa* und *Rigidoporus lignosus* ist wahrscheinlich ebenfalls zellassoziiert bzw. sogar intrazellulär lokalisiert (77, 185, 186). Inwieweit dies auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pilzstämme relevant ist, muss durch weitere Arbeiten untersucht werden. In Hinsicht auf intrazelluläre Laccaseaktivitäten sollte dabei besonderes Augenmerk auf die Aufklärung von eventuellen Transportmechanismen für die großen und polaren Farbstoffmoleküle in die Zelle gelegt werden.

Eine mögliche Induktion von beteiligten Enzymen unter Farbstoffeinfluss ist als weiterer relevanter Faktor anzusehen (Abbildung 35, Abschnitt 4.5). So führten die Anthrachinonfarbstoffe ABu62 und RBU19 zu erhöhten extrazellulären Laccaseaktivitäten in den Stämmen UHH 5-1-03 und KI-S5 (Abbildung 14A, B). Eine Induktion der Enzymexpression kann in Analogie zur Wirkung anderer, aus der Literatur bekannter organischer Laccaseinduktoren (49, 62, 151), als wahrscheinlich angesehen werden. Der Einfluss des Farbstoffes RBU19 auf extrazelluläre Laccasetiter wurde für die Stämme UHH 5-1-03 und KI-S5 näher untersucht (Abschnitt 4.5).

Neben Laccasen können auch andere Enzyme an der Biotransformation durch Pilze beteiligt sein. Nachweislich am Abbau von Farbstoffen sind Enzyme des extrazellulären ligninolytischen Systems der Weißfäulepilze beteiligt (MnP, LiP, VP; siehe Einleitung). Eine Beteiligung von Peroxidasen an den Biotransformationsprozessen der in dieser Arbeit untersuchten aquatischen Pilzstämme ist jedoch unwahrscheinlich, da keine Peroxidasen in den Kulturüberständen nachgewiesen werden konnten. Aus dem Weißfäulepilz *P. chrysosporium* konnte eine intrazelluläre 1,4-Benzochinonreduktase isoliert und charakterisiert werden (31). Der Braunfäulepilz *Gloeophyllum trabeum* bildet ebenfalls eine intrazelluläre Reduktase, die in der Lage ist, verschiedene 1,4-Benzochinone zu reduzieren (208). Allerdings wurde eine Hemmung solcher Reduktasen durch strukturell komplexere Anthrachinone (wie die in dieser Arbeit verwendeten Anthrachinonfarbstoffe) gezeigt (207). In der Enzymdatenbank BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info>) sind keine pilzlichen Azoreduktasen (E.C. 1.7.1.6.) gelistet. In Bakterien wurden diese Azoreduktasen jedoch als hauptverantwortlich für die Biotransformation von Azofarbstoffen identifiziert (siehe Einleitung). Bei *Pseudomonas* sp. KF46 wird bspw. eine am Azofarbstoffabbau beteiligte Azoreduktase durch ihr Substrat, Orange II, induziert (299).

Metaboliten der Farbstofftransformation

Durch massenspektrometrische Untersuchungen (LC-ESI-MS/MS) konnten in Kulturen mit ABu62 und ME, in Kulturen mit ABu62 und ME unter Modellabwasserbedingungen sowie in Kulturen mit ABu62 ohne Kosubstrat identische Biotransformationsprodukte für alle untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Das Auftreten der Metaboliten II, III und IV (m/z 427, 441, 457; Tabelle 18) unter nahezu allen Bedingungen und bei allen daraufhin untersuchten Stämmen deutet auf einen identischen Biotransformationsweg von ABu62 durch Kulturen der Stämme UHH 5-1-03, Kl-S5 und Tt-S1 hin. Auffällig war, dass bis auf Metabolit I nur höhermolekulare Biotransformationsprodukte im Vergleich zum eingesetzten Farbstoff detektiert wurden. Daher wird davon ausgegangen, dass die Metabolisierung von ABu62 vorrangig über die Funktionalisierung des Farbstoffmoleküls evtl. mit niedermolekularen organischen Verbindungen des Pilzmetabolismus verläuft. Basierend auf den vorliegenden Daten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere niedermolekulare Abbauprodukte durch den methodisch limitierten Massenbereich (> 200 amu) nicht erfasst wurden. Ohne weitere Untersuchungen der isolierten Biotransformationsprodukte kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Metaboliten im Größenbereich von 471 – 673 amu (Metabolite VI – X, Tabelle 18) aus dem weiteren Abbau des unten beschriebenen ABu62-Dimerisierungsproduktes herrühren oder auf einem anderen Weg, das heißt, ohne den Umweg über die Dimerisierung aus ABu62 entstanden sind. Möglich ist auch die durch Pilzkulturen katalysierte Reaktion eines Farbstoffmoleküls z. B. mit Bestandteilen des ME, da diese Metaboliten nur in Kulturen mit ME nachgewiesen wurden.

Bei Stamm UHH 5-1-03 konnte nach Entfärbungsversuchen mit isolierter Laccase anhand der identifizierten Metabolite eine Beteiligung dieses Enzyms an der Biotransformation von ABu62 Kulturen wahrscheinlich gemacht werden. Identische Transformationsprodukte (m/z 302 und 713, Metaboliten I und XI in Tabelle 18) wurden nach der Behandlung mit isolierter Laccase und in Kulturen, in denen eine Laccaseaktivität gemessen werden konnte, gefunden. Das Fehlen dieser Transformationsprodukte und das zusätzliche Auftreten der Metaboliten II, III und IV unter Kulturbedingungen, bei denen keine Laccaseaktivität gemessen wurde, ist ein Indikator für die Beteiligung von weiteren Prozessen an der Biotransformation. Die letztgenannten Metaboliten waren in Ansätzen mit isolierter Laccase nicht nachweisbar (Tabelle 27).

Tabelle 27: Massenspektrometrisch (LC-ESI-MS/MS) identifizierte Biotransformationsprodukte von Acid Blue 62 durch Stamm UHH 5-1-03 unter verschiedenen Kulturbedingungen und durch isolierte Laccase dieses Stammes. Für weitere Einzelheiten siehe Tabelle 18.

Behandlung von 500 μ M ABu62 mit	Laccaseaktivität ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	Molekülon des Transformationsproduktes (m/z)				
		302	427	441	457	713
Pilzkultur in Malzextraktmedium	≈ 4000	+	+	+	+	+
Pilzkultur in Malzextraktmedium Modellabwasserbedingungen	$< 0,2$		+	+	+	
Laccase in Puffer	500	+				+

Vanhulle *et al.* (277) schlagen einen durch Laccase katalysierten Biotransformationsweg von ABu62 durch den Weißfäulepilz *Pycnoporus sanguineus* vor (Abbildung 38). Dabei erfolgt der Angriff des Farbstoffmoleküls radikalisch an der primären Aminogruppe bzw. am Cyclohexylaminorest unter Abspaltung des Cyclohexylrestes. In einer nachfolgenden Reaktion dimerisiert dieses Molekül mit einem weiteren Molekül ABu62 und bilden nach einer weiteren (angenommenen) laccasekatalysierten Reaktion eine Azo-Dianthrachinonverbindung (Metabolit XI, Schritt A in Abbildung 38).

Die Entstehung des Metaboliten I führen Vanhulle *et al.* (277) auf eine nicht näher spezifizierte, durch die Pilzbiomasse katalysierte Biotransformation zurück (Schritt B in Abbildung 38). In dieser Arbeit wurden nur Kulturüberstände untersucht, im Verlauf des Experimentes nahm die Konzentration des Metaboliten XI ab, Metabolit I war als vermutliches Endprodukt des Umsatzes bis zum Ende des Experimentes nachweisbar.

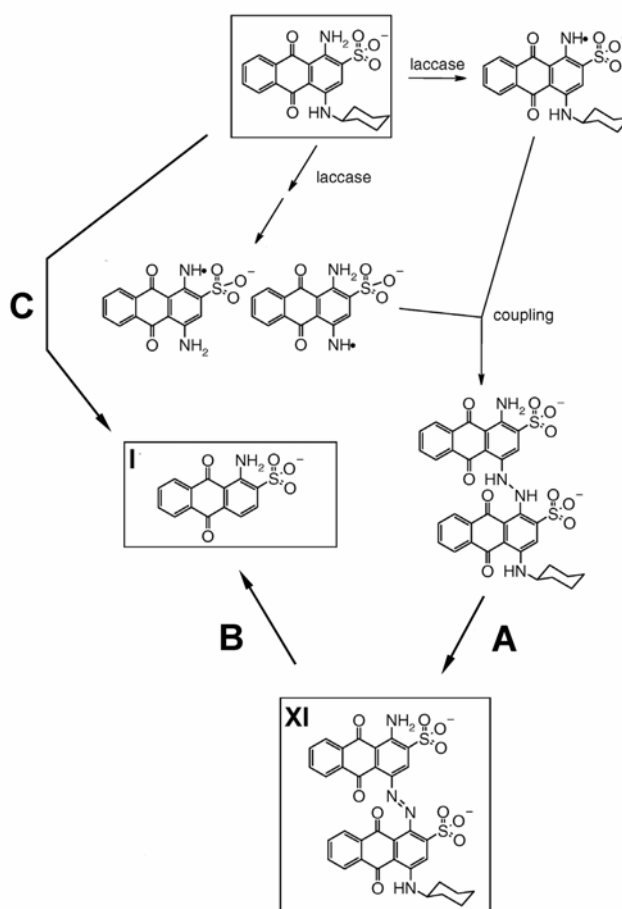


Abbildung 38: Vorgeschlagener Biotransformationsweg von Acid Blue 62 durch Flüssigkulturen von *Pycnoporus sanguineus* MUCL 41582. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Biotransformationsprodukte sind markiert (I, XI). A – oxidativer Schritt zur Bildung der Azo-Bindung, B – von Vanhulle *et al.* angenommener, nicht laccasekatalysierter Transformationsschritt, C – laccasekatalysierter Transformationsschritt (auf Basis von Ergebnissen der vorliegenden Arbeit angenommen). Verändert nach Vanhulle *et al.* (277).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die von Vanhulle *et al.* (277) nachgewiesene laccasekatalysierte Dimerisierung des ABu62-Moleküls. In Ergänzung zu den vorgeschlagenen Biotransformationen kann die Bildung des Metaboliten I im Resultat der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf Laccase zurückgeführt werden, da ein Nachweis dieses

Biotransformationsproduktes auch nach der Behandlung von ABu62 mit gereinigter Laccase möglich war. Es können an dieser Stelle jedoch keine abschließenden Aussagen darüber getroffen werden, ob Metabolit I, wie von Vanhulle *et al.* (277) vorgeschlagen, durch weitere Reaktionen des Dimers oder in einer alternativen Reaktion ohne die Dimerisierung als Zwischenschritt aus ABu62 entsteht. Denkbar ist die Abspaltung von Aminocyclohexan nach vorheriger Destabilisierung des sekundären Amins im ABu62-Molekül durch eine laccasekatalysierte Radikalisierung des die Aminogruppe enthaltenden aromatischen Rings des Farbstoffmoleküls (Reaktion C in Abbildung 38).

Das gereinigte Enzym war in der Lage, neben ABu62 die strukturell unterschiedlichen Farbstoffe RBU19, DBu71 und ABk210 umzusetzen (Abbildung 29). Während RBU19 ein intensiv untersuchter Farbstoff ist, dessen Entfärbung für eine Vielzahl von Laccasen aus Weißfäulepilzen beschrieben ist (16, 235), konnte eine kommerziell erhältliche Laccase des Ascomyceten *Aspergillus niger* RBU19 nicht ohne Redoxmediator entfärben (249). Nyanhongo *et al.* (190) konnten eine Entfärbung von DBu71 (52 %) und RBU19 (94 %) durch die Laccase aus *Trametes modesta* zeigen. Dem Autor der vorliegenden Arbeit sind keine Studien bekannt, die den Umsatz des Azofarbstoffes ABk210 durch Laccasen zeigen.

Die Laccase aus *Trametes modesta* war nicht in der Lage, den Azofarbstoff DBu71 vollständig zu entfärben (190). Dieses Phänomen wurde ebenfalls von anderen Autoren beschrieben (42, 288) und wird durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Es sind zwei Gründe für die unvollständige Entfärbung denkbar:

- 1) Die Substratkonzentration gerät in limitierende Bereiche. Dies setzt einen hohen K_M -Wert des umsetzenden Enzyms gegenüber dem Farbstoff voraus.
- 2) Metabolite wirken inaktivierend auf das umsetzende Enzym.

Natürlich ist auch eine Kombination dieser beiden Effekte vorstellbar.

Eine weitere Steigerung der Umsatzraten der eingesetzten Farbstoffe durch die Laccase aus UHH 5-1-03 oder auch eine Ausdehnung ihres Substratspektrums auf nicht direkt angreifbare Farbstoffe könnte durch Verwendung von Redoxmediatoren erreicht werden, wie beispielsweise für Laccasen aus *Aspergillus niger* (248), *Trametes versicolor*, *Polyporus pinisitus* und *Myceliophthora thermophila* (48) gezeigt wurde.

Wie die Metabolitenuntersuchungen von ABu62 offenbarten, scheinen weitere oxidative Prozesse an der Entfärbung beteiligt zu sein, die nicht auf eine Aktivität der Laccase zurückzuführen sind (Tabelle 18). Allerdings können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob es sich dabei um extrazelluläre oder intrazelluläre Prozesse handelt. Möglich ist auch eine Metabolisierung von extrazellulär gebildeten Biotransformationsprodukten (z. B. Metabolit I) innerhalb der Zelle (125). Für *Phanerochaete chrysosporium* wurde eine Beteiligung des intrazellulären (mikrosomalen und cytosolischen) Cytochrom-P450-Systems am Abbau von Benzo(a)pyren gezeigt (171). Phenanthren wird durch den Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* unter Beteiligung von Phase I und Phase II Enzymen metabolisiert (27). Für den AQH *Heliscus lugdunensis* wurde eine ebenfalls intrazelluläre Metabolisierung von 1-Naphtol unter Bildung von Sulfatkonjugaten gezeigt (11). Da Studien zu Farbstoffen in diesem Zusammenhang ausstehen, sind weitere Untersuchungen extra- und intrazellulärer Prozesse, mit besonderem Augenmerk auf zellassoziierte Enzyme notwendig, um ein umfassendes Bild der Biotransformation von Farbstoffen durch aquatische Pilze zu erhalten.

4.4. Laccase des Stammes UHH 5-1-03

Die Laccase von Stamm UHH 5-1-03 wurde gereinigt und biochemisch sowie auf genetischer Ebene charakterisiert. Die Laccaseproduktion wurde durch die Zugabe von Kupfersulfat und Vanillinsäure zum Kulturmedium angeregt. Kupfer ist ein bekannter Induktor der Laccaseproduktion in Basidiomyceten (49, 80, 197) und Ascomyceten (67, 108). Auch organische Verbindungen mit Ähnlichkeiten zu natürlichen Substraten der Laccase, wie z. B. Vanillinsäure, wurden häufig für die Stimulation der Laccaseproduktion eingesetzt (61, 70, 85).

Strukturelle Eigenschaften des Proteins

Das gereinigte Enzym zeigte reproduzierbar während aller Stufen des Aufreinigungsprozesses drei Banden im Gel einer SDS-PAGE (Abbildung 28B), die eindeutig als Laccase identifiziert werden konnten (Abbildung 28D). Die Bildung von mehreren Laccaseformen ist für viele Asco- (198, 264) und Basidiomyceten (28, 197, 228) beschrieben. Da nur ein Laccasegen und –transkript gefunden wurde, stellen die Banden in der SDS-PAGE höchstwahrscheinlich posttranslationale Modifizierungen der Laccase dar. Ein Beispiel für eine solche Modifikation ist die Glykosylierung. Glykosylierung von Enzymen wird im Zusammenhang mit der Sekretion, der Erhöhung der thermischen Stabilität und dem Schutz vor proteolytischer Spaltung diskutiert (153). Es wurde gezeigt, dass die Laccase des Stammes UHH 5-1-03 glykosyliert vorliegt (Abbildung 28C). Der Massenunterschied vor und nach der Deglykosylierung (entspricht $\approx 23\%$ Zuckeranteil anhand der Daten der SDS-PAGE) war dabei vergleichbar mit der Differenz zwischen der theoretischen Proteingröße, welche anhand der cDNA-Sequenz berechnet wurde sowie den Daten der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen ($\approx 17\%$ Zuckeranteil). Dennoch wurden auch nach der Deglykosylierung mehrere Banden beobachtet. Neben einer möglichen unvollständigen Deglykosylierung könnte eine Abspaltung der 16 Aminosäuren nach dem DSGL-Motiv (Abbildung 34) eine Erklärung dafür liefern (104, 131).

Die MALDI-TOF-MS-Analyse der Laccase ergab einen Molekülionenpeak, dessen Größe (75,6 kDa) innerhalb des für Laccasen beschriebenen Bereiches liegt (14). Da die beiden kleineren Banden in der SDS-PAGE eine geringere Intensität als die Hauptbande zeigten, könnten diese von dem detektierten Hauptpeak im MALDI-TOF-Massenspektrum überlagert gewesen sein. Die Ergebnisse der Gelfiltration bei unterschiedlichen pH-Werten lieferten den Nachweis für eine pH-abhängige Dimerisierung des Enzyms mit steigendem pH (Tabelle 22). Aus den erhaltenen Daten kann nicht geschlussfolgert werden, ob es sich dabei um ein Homodimer im strengen Sinne (Aufbau aus identischen Untereinheiten) handelt. Ebenfalls denkbar ist ein Dimer aus geringfügig unterschiedlich modifizierten Monomeren, welche z. B. infolge unterschiedlicher Glykosylierungen oder der oben schon erwähnten proteolytischen Modifikation des Enzyms, entstanden sein könnten. Homodimere von Laccasen wurden z. B. für *Rhizoctonia solani* (281), *Pleurotus pulmonarius* (14) und *Trametes villosa* (293) beschrieben. Heterodimere wurden aus *Pleurotus ostreatus* (86) und *Armillaria mellea* (57) isoliert. Im Gegensatz zur SDS-PAGE wurde nach der IEF nur eine Laccasebande gefunden (Abbildung 28A). Daher könnte nach der IEF ein intaktes Dimer bei einem pI von $> 8,3$ detektiert worden sein. Ein pI -Wert über 8,3 ist, nach dem Wissen des Autors, der höchste pI , der bislang für eine Laccase beschrieben ist. Da dieser Wert nahe an dem theoretischen pI des

Monomers von 8,1 auf Basis der molekularbiologischen Daten liegt, sollte die Dimerisierung, z. B. durch Abschirmung von sauren Aminosäureresten, nur zu einer unerheblichen Veränderung des *pI*-Wertes des Holoenzym führen. In den meisten Fällen liegt der *pI* von Laccasen im sauren Bereich um pH 4 (14, 104). Wenige Laccasen mit höheren *pI*-Werten wurden charakterisiert, so besitzt die Laccase POXA1b von *Pleurotus ostreatus* einen *pI* von 6,9, der *pI* einer Laccase aus *Rhizoctonia solani* lag bei 8,0 (87, 281).

Funktionelle Eigenschaften des Proteins

Für eine begrenzte Zahl von Laccasen ist eine Aktivität oberhalb von pH 7 beschrieben (111, 132, 180, 258, 294). Für die vorliegende Laccase könnte die Aktivität in diesem pH-Bereich gegenüber den getesteten Substraten ABTS, SGZ, DMP, Guajakol und ABu62 (Abbildung 32A) eine Anpassung des Stammes UHH 5-1-03 an die Bedingungen seines Isolationsstandortes darstellen (pH am Isolationsstandort 7,9; Tabelle 2). Andererseits lag das pH-Optimum für die Oxidation der meisten Substrate zwischen pH 5 und 6. In Abbildung 32A deuten die Oxidationsprofile von ABTS, ABu62 und besonders DMP im Bereich von pH 2,5 - 5 auf die Existenz eines zweiten Optimums hin. Für die Laccase aus dem unidentifizierten Basidiomyceten NIOCC # 2a wurden ebenfalls zwei pH-Optima (bei pH 3 und bei pH 6 gegenüber ABTS) beschrieben (59). Ob dieses Phänomen auf möglicherweise unterschiedliche katalytische Eigenschaften von Monomeren und dem Dimer zurückzuführen ist, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Baldrian (16) beschreibt eine zunehmende Stabilität der Laccase aus *Daedalea quercina* mit steigendem pH-Wert. Die Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* war uneingeschränkt stabil bei pH-Werten von 4 – 10 (63), die Laccase aus *Mauginiella* sp. in einem pH-Bereich von 4 – 8 (198). Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Laccase war am instabilsten bei den pH-Werten 5 und 6 (Abbildung 32B). Dem Autor sind keine Studien bekannt, die vergleichbare Eigenschaften einer Laccase beschrieben haben. Ob die beschriebene pH-abhängige Dimerisierung des Enzyms eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liefert, kann auf Basis der gewonnenen Daten nicht eingeschätzt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Das Temperaturoptimum von 60 °C für die Oxidation von ABTS liegt im Bereich von bislang beschriebenen Laccasen und anderen ligninolytischen extrazellulären Enzymen von 50 – 70 °C (14). Laccasen besitzen bei 50 °C Halbwertszeiten der Aktivitäten von wenigen Minuten bis zu einigen Stunden (14). Das untersuchte Enzym hatte bei 45 °C eine Halbwertszeit der Aktivität von etwa einer Stunde (Abbildung 33B).

Die Oxidation von verschiedenen Laccasesubstraten erfolgte mit für Laccasen typischen kinetischen Konstanten. Die höchste Affinität wurde für das nicht phenolische Substrat ABTS und das Polyphenol SGZ bestimmt (Tabelle 23). Ähnliche K_m -Werte für die Oxidation von SGZ wurden für eine Laccase aus dem Hyphomyceten *Myceliophthora thermophila* (10 µM) und der Laccase des Ascomyceten *Chaetomium thermophilum* (34 µM) berichtet (41, 290). Das vorliegende Enzym besitzt eine höhere Affinität gegenüber ABTS (8 µM), als die „durchschnittliche“ Laccase, die auf einer Basis von 36 Laccasen von Baldrian (14) berechnet wurde und ist vergleichbar mit der Affinität der Laccase des Ascomyceten *Xylaria polymorpha* (20 µM, (156)).

Die Oxidation von ABu62 folgte keiner Michaelis-Menten-Kinetik. Dies wurde ebenfalls von Trovaslet und Mitarbeitern für die Laccase von *Pycnoporus sanguineus* beschrieben (267).

Die experimentellen Daten konnten sehr gut durch die Hill-Gleichung beschrieben werden ($S_{0,5} = 62 \mu\text{M}$, Hill-Koeffizient 2,8). Diese Ergebnisse lassen sich mit einer Dimerisierung des Enzyms erklären. Der Hill-Koeffizient lässt eine positive Kooperativität der beiden Untereinheiten vermuten, ein Beweis hierfür steht jedoch noch aus. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen eines Michaelis-Menten-Verhaltens besteht in abiotischen Folgereaktionen radikalisierten ABu62-Moleküle mit noch nicht oxidiertem ABu62, wodurch dessen Oxidation neben dem direkten enzymatischen Angriff zusätzlich verstärkt werden würde.

Für die Inhibitionsstudien wurden nur Inhibitoren ohne Sulfhydrylgruppe verwendet (Tabelle 24), da diese, wie zuvor beschrieben (115), in der Lage ist, das ABTS-Radikal zu reduzieren und somit die Messung zu beeinflussen. Dies hätte in Verbindung mit dem verwendeten kolorimetrischen Messverfahren zu Artefakten geführt. Im Falle der getesteten Inhibitoren wurden bemerkenswerte Unterschiede zu anderen, bereits beschriebenen Laccasen festgestellt. Im Fall von NaN_3 wurde ein zehnfach höherer IC_{50} -Wert als für die Laccase des Ascomyceten *Magnaporthe grisea* (0,01 mM) bestimmt (111). Bei einer Konzentration von 1 mM waren eine Restaktivität von 7,7 % bei der Laccase aus UHH 5-1-03 vorhanden. Für NaF, welches wie NaN_3 am trinukleären Kupferzentrum wirkt (91, 290), wurde ein vierfach höherer IC_{50} -Wert im Vergleich zur Laccase von *Melanocarpus albomyces* berechnet (132). Das Typ I Kupferatom scheint sehr fest im aktiven Zentrum koordiniert zu sein, wie die hohe Konzentration des Chelators EDTA vermuten lässt, die nötig ist, um die Laccaseaktivität herabzusetzen. Die untersuchte Laccase war aktiv bei Salzkonzentrationen bis zu 1 M NaCl und Na_2SO_4 und besaß für NaCl einen IC_{50} -Wert im Bereich der Laccase des Ascomyceten *Xylaria polymorpha* (156).

Eine hohe Aktivität der Laccase aus UHH 5-1-03 wurde bei erhöhten Konzentrationen organischer Lösungsmittel gemessen. Die Laccase aus *Chalara paradoxa* CH32 (221) war sensitiver gegenüber DMSO und Aceton. In der vorliegenden Arbeit wurden erheblich höhere Restaktivitäten der Laccase aus Stamm UHH 5-1-03 unter dem Einfluss organischer Lösungsmittel gemessen als mit freier und auch immobilisierter Laccase aus *Phlebia radiata* (226). Mit Ausnahme von Ethanol, mit vergleichbarer Inhibierung, ist die Laccase aus UHH 5-1-03 gegenüber organischen Lösungsmitteln stabiler als freie und immobilisierte Laccase aus *Cerrena unicolor* (225). Wie Rodakiewicz-Nowak *et al.* (222) ausführen, sind diese Eigenschaften bei einer Anwendung in der organischen Synthese besonders von Belang.

Molekularbiologische Untersuchung der Laccase

Die gereinigte Laccase konnte eindeutig einem Transkript und einem Gen auf DNA-Ebene zugeordnet werden und erlaubte so weitergehende Analysen auf Basis der molekularbiologischen Daten. Die Glykosylierung des Proteins wurde experimentell gezeigt, gleichzeitig konnte mögliche Glykosylierungsstellen im Gen identifiziert werden. Wie Giardina *et al.* (87) für die Laccase POXA1b aus *Pleurotus ostreatus* nachwiesen, müssen nicht alle potenziellen Glycosylierungsstellen im exprimierten Protein glykosyliert vorliegen. Eine der theoretischen Glycosylierungsstellen liegt nahe an der cbrI, daher erscheint es plausibel, dass diese im exprimierten Protein, sterisch begründet, nicht glykosyliert wird. Das DSGL-Motiv am carboxyterminalen Ende ist in vielen Laccasen von Ascomyceten stark konserviert (104). Es kann als Spaltungsstelle für eine C-terminale Verkürzung dienen, aber ebenso direkt vor dem

Stop-Codon liegen (131). Im vorliegenden Fall folgten diesem Motiv weitere 16 Aminosäuren. Germann *et al.* (84) identifizierten dieses Motiv in einer Laccase aus dem Ascomyceten *Neurospora crassa* und gingen von einem komplexen Reifungsweg der Laccase aus, bei dem die Abspaltung des carboxyterminalen Endes nach dem DSGL-Motiv zu einer Aktivierung der Laccase führt. Eine Regulation der Laccaseaktivität durch Proteolyse wurde auch von Palmieri *et al.* (196) für Laccasen des Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* angenommen. Aufgrund fehlender carboxyterminaler Sequenzdaten des Laccaseproteins aus UHH 5-1-03 kann an dieser Stelle keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Abspaltung der 16 Aminosäuren erfolgt und eventuell für eine Aktivierung des Enzyms notwendig ist.

Es wurde gezeigt, dass die Laccase aus UHH 5-1-03 Eigenschaften besitzt, die sie deutlich von typischen Laccasen unterscheidet und die sie nicht nur für biotechnologische Anwendungen zum Abbau von Schadstoffen interessant macht, sondern auch für Synthesezwecke.

4.5. Optimierung der Laccaseproduktion

Soweit dem Autor bekannt, gibt es bislang keine Studien zur Optimierung der Laccaseproduktion durch aquatische Pilze. Durch die Verwendung eines mehrfaktoriellen experimentellen Designs war es möglich, die optimalen Konzentrationen von TS als Medium und von Kupfersulfat und RBU19 als Elizitoren zu bestimmen. Die Anwendbarkeit dieser Bedingungen unter aufskalierten Bedingungen wurde in einem Rührkesselreaktor gezeigt.

In der Vergangenheit wurden hauptsächlich zwei Strategien zur Produktion von großen Mengen von Laccasen aus Basidiomyceten verfolgt. Während die heterologe Expression und Produktion von ligninolytischen Enzymen nach wie vor eine Herausforderung darstellt (54), wurden erhebliche Fortschritte durch die Optimierung von Kulturbedingungen erzielt. Es wurden vor allem Induktoren und verschiedene Nährstoffbedingungen intensiv untersucht (10, 119). Der Effekt von Kupfer bei unterschiedlichen Konzentrationen auf die Produktion von Laccasen wurde für viele Basidiomyceten, z. B. *Trametes versicolor* (bis zu 400 μM), *T. pubescens* (bis zu 2 mM), *T. trogii* (bis zu 850 μM), *Pleurotus ostreatus* (150 μM) oder *P. sator-caju* (300 μM), beschrieben (49, 79, 81, 197, 250, 268). Eine geringere Anzahl von Studien demonstrierte den Einfluss von Kupfer auf die Laccaseproduktion in Ascomyceten. Beispiele dafür sind *Neurospora crassa* (108) und *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (67). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Kupfer in der Lage ist, die Laccaseproduktion in beiden untersuchten Stämmen bei Konzentrationen von 50 - 250 μM zu erhöhen. Durch die geringen Konzentrationen können mögliche toxische Wirkungen des Schwermetalls Kupfer vermieden werden (15, 250). Auch in früheren Veröffentlichungen wurden meist Konzentrationen im μM -Bereich verwendet (25-850 μM , siehe oben). Während mit steigender Kupferkonzentration höhere Laccaseaktivitäten in Stamm KI-S5 erreicht wurden, war die Aktivität in Stamm UHH 5-1-03 bei Verwendung von 50 μM Kupfersulfat am höchsten. Ob dies eventuelle Anpassungen der Stämme an das aquatische Habitat widerspiegelt, bleibt offen. Dennoch ist diese Eigenschaft von Stamm UHH 5-1-03 interessant für die Enzymproduktion im größeren Maßstab, da Kupfer ein toxisches Schwermetall ist und somit zu erhöhten Entsorgungskosten führt, wenn es in hohen Konzentrationen und großen Volumina eingesetzt wird.

Zusätzlich zu Kupfer werden oft Organika mit strukturellen Ähnlichkeiten oder Beziehungen zu Lignin eingesetzt (bspw. 4-Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, Veratrylalkohol, 2,5-Xylidin oder Vanillin (53, 61, 70, 85, 137). Darüber hinaus wurde auch für komplexe natürliche Verbindungen wie Lignine oder Ligninpräparate ein positiver Einfluss auf die Laccaseproduktion gezeigt (70, 85, 233, 236). Durch ihre strukturellen Ähnlichkeiten zu bestimmten Ligninbestandteilen wurden Anthrachinonfarbstoffe wie RBU19 in der Vergangenheit häufig zur Einschätzung der ligninolytischen Fähigkeiten von Pilzen verwendet (51, 273). Daher überrascht es nicht, dass solche Farbstoffe ebenfalls in der Lage sind, die Laccaseproduktion anzuregen, obwohl dies nur durch wenige Studien belegt ist (59, 278).

Organische Substanzen, die für die Induktion von ligninolytischen Enzymen in Pilzen verwendet werden, haben unterschiedliche Effekte in verschiedenen Stämmen (85). In der vorliegenden Arbeit hatte RBU19 den größten Einfluss auf die Laccaseproduktion unter den getesteten Induktoren. Ein induktiver Effekt von RBU19 auf die Laccase wurde für *Pycnoporus sanguineus* beschrieben (278). Hohe Laccaseaktivitäten nach Induktion mit RBU19 wurden ebenfalls mit *Pycnoporus cinnabarinus* (235) sowie *Dichomitus squalens* (71) erreicht. Im Gegensatz dazu konnte keine erhöhte Laccaseaktivität nach Zugabe von RBU19 zu Kulturen eines unidentifizierten Basidiomyceten (59), *Irpex lacteus* und *Pleurotus ostreatus* (189) gemessen werden. Da keine weiteren Daten über die Effekte von RBU19 auf Vertreter anderer systematischer Gruppen neben den Basidiomyceten vorliegen, können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob das komplexe Bild hinsichtlich der stimulierenden Effekte von RBU19 auf die Laccaseproduktion in Basidiomyceten auch auf Ascomyceten übertragbar ist.

Eine postulierte Funktion der Laccase ist die oxidative Kopplung von schädlichen Verbindungen, um sie zu entgiften (85, 156, 265). Da RBU19 in hohen Konzentrationen verwendet wurde, ist es möglich, dass die untersuchten Stämme Laccase ausschieden, um diese Verbindung zu oxidieren und somit zu möglicherweise zu detoxifizieren.

Um die Produktionskosten von Enzymen zu senken, ist es erforderlich, kostengünstige Fermentationsmedien zu identifizieren. Für natürliche lignozellulosehaltige Substrate wie Baumwollstängel (119), Weizenstroh oder Zuckerrübenbagasse (10) zeigte sich ein positiver Effekt auf die Laccaseproduktion. Während die erwähnten Substrate meist als Zusätze zu konventionellen Medien verwendet werden, könnte sich TS als kostengünstiges, pflanzenbasiertes Vollmedium aus folgenden Gründen besonders gut für die Laccaseproduktion eignen:

1. Es ist ein etabliertes Medium zur Kultivierung von Pilzen, darunter auch für Stämme, die nur schwer unter Laborbedingungen zu halten sind (74, 92, 245).
2. Sein Einfluss auf die Produktion von LME konnte für mehrere Pilze gezeigt werden (157, 177, 217, 218, 272).

In den Ascomyceten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, war TS als Komplexmedium in der Lage, die Laccaseproduktion in geringem Maße anzuregen (Abbildung 35). Es wurde gezeigt, daß TS eine exzellentes Medium hinsichtlich des Wachstums und der Laccaseproduktion für die Basidiomyceten *Agaricus blazei* (272) und *Cerrena unicolor* (177) darstellt. Im Gegensatz dazu benötigte der Ascomycet *Xylaria polymorpha* (156) eine zusätzliche Stimulation durch Zugabe von 2,5-Xylidin, um hohe Laccaseaktivitäten zu erreichen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus wirkte er in Verbindung mit einer Kombination von Induktoren als Synergist und hatte einen starken Einfluss auf die Laccaseproduktion (Abschnitt 3.5.2.1). Das Komplexmedium TS enthält eine hohe Vielfalt an organischen Verbindungen, darunter Pektin in nicht unerheblichen Maße. Marbach *et al.* (164) beschrieben, dass Pektin allein nicht in der Lage war, die Laccaseproduktion in *Botrytis cinerea* (der Anamorphe des Ascomyceten *Botryotinia fuckeliana*) zu induzieren, allerdings war eine Laccaseinduktion nach zusätzlicher Zugabe einer phenolischen Verbindung zu beobachten. Obwohl nicht bekannt ist, ob Pektin für den synergistischen Effekt von TS in der vorliegenden Studie verantwortlich war, scheint doch ein komplexes System, welches mehrere potenzielle Enzyminduktoren beinhaltet, notwendig zu sein, um maximale Laccaseaktivitäten in den untersuchten Stämmen zu erreichen.

Bei der Maßstabsvergrößerung der Enzymproduktion in einem 2-L-Rührkesselreaktor wurde ein bemerkenswerter Anstieg der Laccaseproduktion im Vergleich zu den Versuchen im Erlenmeyerkolben gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Basidiomyceten *Pycnoporus cinnabarinus* (70) in einem 100-L-Reaktor und für den Ascomyceten *Xylaria polymorpha* (156) in einem 10-L-Rührkesselreaktor erhalten. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde dabei ein Anstieg des pH-Wertes während der Kultivierung in TS beobachtet. Wie von Liers *et al.* (156) angenommen, könnten diese Bedingungen zuträglich für die Enzymstabilität und dessen katalytische Aktivität sein, was wiederum auf ungewöhnliche Eigenschaften im Vergleich zu anderen pilzlichen Laccasen deutet, da diese meist mit zunehmenden pH ihre Aktivität verlieren.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen außerdem ein Potenzial für eine weitere Maßstabsvergrößerung, da es wahrscheinlich ist, dass die Optimierung weiterer Faktoren, wie Kultivierungstemperatur, Zeitpunkt der Zugabe der Induktoren, Belüftung und verschiedene Durchmischungsstrategien dazu beitragen können, die Laccasetiter noch weiter zu erhöhen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch untersucht, unterschieden sich diese Faktoren teilweise zwischen den Erlenmeyerkolben- und den Rührkesselversuchen.

Die durch die optimierten Induktionsbedingungen erhaltenen Laccasetiter zählen zu den höchsten für Wildtypstämme von Ascomyceten beschriebenen (Tabelle 28). Darauf basierend wird es möglich sein, die Laccasen in Mengen zu produzieren, die Untersuchungen im industriellen Maßstab und die Einschätzung ihrer Eignung für biotechnologische Prozesse ermöglichen. Weiterhin könnte der gezeigte Einfluss der getesteten Faktoren auch für die Optimierung der Laccaseproduktion in anderen Ascomyceten von Bedeutung sein.

Tabelle 28: Vergleich maximal erreichter Laccaseaktivitäten verschiedener Ascomyceten unter unterschiedlichen Kulturbedingungen.

Organismus	Laccaseaktivität [U·L ⁻¹]	Kulturbedingungen	Referenz
<i>Botryosphaeria</i> sp.	7080	Vogel Minimalsalzmedium + Glukose + Veratrylalkohol	(7)
<i>Mauginiella</i> sp.	≈ 1600 ¹	YM Broth ohne Induktor ²	(198)
<i>Xylaria polymorpha</i>	14380	TS + Xylidin	(156)
<i>Coniothyrium</i> sp.	11534	TS + CuSO ₄ + RBU19	Vorliegende Arbeit
<i>Phoma</i> sp.	11026		

¹ - Aktivität wurde in Nanokatal angegeben. Umrechnung: 16,67 nkat = 1 U.

² - Komplexmedium mit ME, Hefeextrakt, Pepton, Dextrose und Mineralsalzen.

4.6. Einsatz des Stammes UHH 5-1-03 in Bioreaktoren

Bislang wurde eine Vielzahl von Aufwuchsmaterialien zur Immobilisation von Pilzkulturen getestet und Bioreaktoren mit unterschiedlichen Prozessdesigns zur Entfärbung von Farbstoffen eingesetzt. *Trametes hirsuta* wurde in Flüssigkulturen erfolgreich auf Polyurethanschaum, Nylonschwämmen, Stahlwolle sowie in Alginatperlen immobilisiert und zur Entfärbung von Lanaset Blau eingesetzt (223). Polyurethanschaum und Kiefernholzschnitzel wurden zur Immobilisierung von *Irpex lacteus* verwendet. Dieses Material fand in einem Festbettreaktor zur Entfärbung von RBu19 Anwendung (125). Ein Stamm von *Phanerochaete sordida* wuchs im Vergleich von Plastikscheiben, mit einem Metallnetz bedeckten Plastikscheiben und einem Metallnetz als Aufwuchskörper am besten auf dem Plastikmaterial (83). Soweit dem Autor bekannt, wurde das in der vorliegenden Arbeit verwendete Filtermaterial bislang noch nicht als Aufwuchsmaterial zur Immobilisierung von Pilzkulturen eingesetzt. Es eignete sich hervorragend als Aufwuchskörper, zeichnet sich durch seinen geringen Preis aus, kann problemlos bearbeitet werden und stellt somit eine vielversprechende Alternative im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Immobilisierungsmaterialien dar.

Im Gegensatz zu den erwähnten Studien, die im Anschluss an die Immobilisierung die Entfärbungsleistungen des immobilisierten Myzels in Anwesenheit zusätzlicher Nährstoffe im Medium untersuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Zellen in den Bioreaktoren gearbeitet, denen kein ME als Kohlenstoff- und Energiequelle im Medium zu Verfügung stand. Unter diesen Bedingungen war Stamm UHH 5-1-03 in der Lage, in wiederholten Zyklen Farbstofflösungen zu entfärben. Die dabei nicht nötige Nährstoffzugabe stellt einen Vorteil im Vergleich zu bislang beschriebenen Arbeiten dar, die in Hinsicht auf eine praktische Anwendung relevant sein könnte. Da die Entfärbungsleistung mit jedem Zyklus abnahm, kann angenommen werden, dass der Pilz seinen Stoffwechsel mit Hilfe von Speicherstoffen bestritt, die während der vorherigen Anzucht in Komplexmedium gebildet wurden. In keinem der Bioreaktorversuche konnte eine Laccaseaktivität im Kulturüberstand gemessen werden. Dies steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die eine Beteiligung von MnP (125, 178, 179) und/oder Laccase (75, 125) im Kulturüberstand an der Entfärbung verschiedener Farbstoffe in Bioreaktoren zeigen konnten. Inwieweit zellassozierte bzw. zelloberflächengebundene Laccase im Rahmen der vorliegenden Arbeit an der Entfärbung beteiligt gewesen sein könnte, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Eine denkbare enge Assoziation von Laccase und Pilzmyzel hätte zweifellos den Vorteil, das eine Auswaschung des Enzyms im Rahmen eines kontinuierlichen Prozesses vermieden werden könnte (296). Neben Laccasen sind weitere, ebenfalls an der Biotransformation von Farbstoffen beteiligte Enzyme, die intrazellulär oder auch zellassoziert vorliegen können, zu berücksichtigen.

Die problemlose Maßstabsvergrößerung des entwickelten Verfahrens zur Immobilisierung und des Reaktordesigns auf den 10-L-Maßstab sind vielversprechend. Als Nachteile sind die nötige Belüftung des Reaktors und die Abnahme der Entfärbungsleistungen in wiederholten Entfärbungszyklen zu nennen. Im Rahmen weiterer Untersuchungen beim SOPHIED-Projektpartner Wetlands SPRL wird momentan die Verwendung von Kartuschensystemen zum problemlosen Austausch von „verbrauchter“ durch „frische“, aktive Biomasse untersucht und gleichzeitig ein Regime entwickelt, bei welchem auf die Belüftung verzichtet werden kann.

Auch die Regeneration der Biomasse durch Zufütterung von kostengünstigen Kohlenstoff- und Energiequellen ist derzeit Gegenstand weiterer Studien.

Obwohl die mit der entwickelten Methode erreichten Entfärbungsraten und die gleichzeitige Reduktion des CSB im Pilotmaßstab konkurrenzfähig mit bislang beschriebenen biologischen Behandlungssystemen sind, muss festgehalten werden, dass diese nicht als alleinige Methode zur Behandlung von farbstoffhaltigen Abwässern der Textilindustrie geeignet sind (94). Kim *et al.* (134) erreichten mit einem Biofilm speziell isolierter Mikroorganismen einen Rückgang von 68,8 % des CSB und eine 54,5%-ige Verringerung der Färbung eines synthetischen Textilfärbeabwassers. In Kombination mit Koagulationsprozessen und elektrochemischer Oxidation konnte der Rückgang auf 95,4 % des CSB und 98,5 % Entfärbung gesteigert werden. Durch Verwendung von *Phanerochaete chrysosporium* immobilisiert auf Nylonschwamm konnte ein Textilabwasser zu 30 – 40 % entfärbt werden, ein nachgeschalteter Ozonierungsprozess erhöhte die Entfärbung um weitere 40 % (147). Basierend auf diesen und weiteren Studien schlagen Hai *et al.* (94) ein Behandlungssystem für Textilabwässer vor, welches aus einem durch eine Membran kompartmentierten biologischen Teil und einem AOP sowie einem Membranfiltrationsschritt besteht. Der biologische Teil soll dabei aus einer Mischkultur mit vorwiegend Weißfäulepilzen bestehen. An dieser Stelle wäre auch die Einbringung von aquatischen Pilzen durch die geschilderten Vorteile gegenüber Weißfäulepilzen denkbar. Allerdings müssen für ein solches Verfahren intensive Untersuchungen angestellt werden, um eine optimale Abfolge der unterschiedlichen Behandlungsschritte und die Artenzusammensetzung des biologischen Reaktors zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung von aquatischen Pilzen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für biotechnologische Verfahren zur Behandlung von farbstoffhaltigen Abwässern der Textilindustrie zu untersuchen. Dabei sollten für die Biotransformation von Textilfarbstoffen relevante Enzyme identifiziert und charakterisiert werden sowie Rückschlüsse auf die an der Biotransformation von Textilfarbstoffen beteiligten Mechanismen und Reaktionen gezogen werden. Als Arbeitshypothese wurde in Betracht gezogen, dass aquatische Pilze durch Anpassungen an ihren Lebensraum besser für die Behandlung farbstoffhaltiger Abwässer geeignet sein könnten als die bisher in dieser Hinsicht am intensivsten untersuchten terrestrischen Weißfäulepilze.

Im ersten Schritt wurden insgesamt 77 Pilzstämmen aus drei Oberflächengewässern in Sachsen-Anhalt mit alkalischem pH-Wert und/oder erhöhtem Salzgehalt isoliert. Aus diesen Stämmen sowie aus 37 Stämmen aquatischer Hyphomyceten und 18 Stämmen aquatischer Pilze aus der Stammsammlung des Departments Umweltmikrobiologie des UFZ wurden in einem zweistufigen Screeningverfahren (Agarplattenkulturen und ein miniaturisiertes Flüssigkultursystem) drei Stämme für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Ergebnisse des Screenings in miniaturisierten Flüssigkulturen, bei denen zwölf Farbstoffe mit Azo- oder Anthrachinon-Chromophoren getestet und fünf Weißfäulepilze als Referenz mitgeführt wurden, zeigten die gegenüber Weißfäulepilzen vergleichbare Eignung von aquatischen Pilzen zur Entfärbung von Farbstoffen. In einigen Fällen war die Entfärbungsleistung von aquatischen Pilzen höher als die des jeweils effektivsten verwendeten Weißfäulepilzes.

Die mitosporen aquatischen Pilze *Phoma* sp. UHH 5-1-03, *Coniothyrium* sp. Kl-S5 und *Alternaria* sp. Tt-S1, welche Ascomyceten-Teleomorphen zugeordnet werden konnten, wurden in Entfärbungsversuchen in Schüttelkolben eingesetzt. Die Kulturbedingungen wurden schrittweise den Eigenschaften realer Abwässer der Textilindustrie angenähert (teilweise hohe Salzgehalte und extreme pH-Werte) und umfassten Entfärbungsversuche von Einzelfarbstoffen und Farbstoffgemischen in Anwesenheit eines Kosubstrates, Entfärbungsversuche von Einzelfarbstoffen und Farbstoffgemischen unter Modellabwasserbedingungen in Anwesenheit eines Kosubstrates sowie Versuche mit Einzelfarbstoffen und mit Farbstoffgemischen unter Modellabwasserbedingungen ohne Zugabe eines Kosubstrates. Durch eine entsprechende Methodik wurde sichergestellt, dass die Entfärbung der Farbstoffe nicht auf Sorptionsprozesse zurückzuführen war, sondern von Biotransformationsreaktionen herrührte. Zusätzlich zu Absorptionsmessungen der behandelten Farbstofflösungen wurden Farbstoffe quantifiziert und der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) bestimmt. Die durch ESI-MS/MS ermittelte Konzentrationsabnahme von Farbstoffen und die Abnahme des CSB waren nicht an die Entfärbung der Lösung gekoppelt und verdeutlichten somit die Notwendigkeit der Erfassung aller dieser Parameter zur Einschätzung der Eignung eines Organismus für den Abbau von Farbstoffen.

Stamm UHH 5-1-03 wurde als besonders geeignet identifiziert und für anschließende Studien ausgewählt, da er:

1. neben strukturell unterschiedlichen Einzelfarbstoffen auch Farbstoffgemische entfärbte,
2. eine Entfärbung auch unter den Bedingungen von vier Modellabwässern erfolgte,

3. die Entfärbung nicht an die Anwesenheit eines Kosubstrates gekoppelt war,
4. die Entfärbung nicht auf Sorptionsprozesse an die Biomasse zurückzuführen war,
5. es zu einem signifikanten Rückgang der Farbstoffkonzentrationen in behandelten Lösungen kam sowie
6. der CSB in allen behandelten Modellabwässern signifikant reduziert war.

Massenspektrometrische Analysen (LC-ESI-MS/MS) der gebildeten Biotransformationsprodukte legen vergleichbare Mechanismen des Farbstoffumsatzes für den Farbstoff *Acid Blue 62* durch alle untersuchten Pilzstämme nahe (Tabelle 18). Im Fall des näher untersuchten Stammes UHH 5-1-03 konnte die Beteiligung von Laccase an der Biotransformation des Farbstoffs durch Pilzkulturen nachgewiesen werden. Es fanden vor allem Funktionalisierungen des Farbstoffmoleküls statt. Die Laccase katalysierte die Dimerisierung des Farbstoffmoleküls. Dies bestätigt in der Literatur für Basidiomyceten beschriebene Ergebnisse (277). Während in der zuvor zitierten Studie nicht alle identifizierten Metaboliten eindeutig auf laccasekatalysierte Reaktionen zurückgeführt werden konnten, gelang dies in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung der gereinigten Laccase. Gleichzeitig wurde damit ein bislang nur unzureichend genutztes Potenzial von Ascomycetenlaccasen für biotechnologische Anwendungen untersetzt.

Die Laccase des Ascomyceten UHH 5-1-03 wurde in Rührkesselreaktoren produziert, gereinigt und biochemisch sowie auf genetischer Ebene charakterisiert. Die glykosylierte Laccase ist im nativen Zustand ein Dimer (≈ 150 kDa). Als Untereinheiten kommen mehrere nachgewiesene Monomere mit nur geringfügig unterschiedlicher Molmasse in Betracht, welche höchstwahrscheinlich durch posttranslationale Modifikationen gebildet werden. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass nur ein für das untersuchte Protein codierendes Laccasegen und -transkript gefunden wurde. Die untersuchte Laccase besitzt den höchsten bislang für Laccasen beschriebenen isoelektrischen Punkt ($> 8,3$). Das extrazelluläre Enzym oxidierte neben typischen Laccasesubstraten vier strukturell unterschiedliche Farbstoffe. Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Substraten folgte die Oxidation von *Acid Blue 62* nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik, sondern zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Hill-Modell. Das Enzym war in hohen Konzentrationen organischer Lösungsmittel aktiv.

Gegeben durch die ungewöhnlichen Eigenschaften der charakterisierten Laccase und den Umstand, dass bislang vorwiegend Basidiomyceten zur Optimierung der Laccaseproduktion verwendet wurden, kam ein statistischer Versuchsansatz in Verbindung mit einem pflanzenbasierten Komplexmedium (Tomatensaft) und zwei weiteren, die Laccaseproduktion stimulierenden Substanzen (CuSO_4 und *Reactive Blue 19*) zum Einsatz, um die Laccaseproduktion durch zwei Ascomycetenstämme (UHH 5-1-03 und KI-S5) in Erlenmeyerkolben zu optimieren. Im Vergleich zu in der Arbeitsgruppe etablierten Methoden zur Stimulation der Laccaseproduktion konnten erhebliche Steigerungen der maximal erreichten Laccaseaktivitäten durch beide Stämme erreicht werden. Gleichzeitig wurde ein synergistischer Effekt von Tomatensaft und *Reactive Blue 19* auf die Laccaseproduktion festgestellt. Ein Aufskalierungspotenzial der optimierten Produktionsbedingungen konnte in 2-L-Rührkesselreaktoren gezeigt werden, wobei die zeitbezogene Laccaseproduktion gegenüber Versuchen in Erlenmeyerkolben nochmals erhöht werden konnte. Die in dieser Arbeit

beschriebenen maximal erreichten Laccaseaktivitäten zählen zu den höchsten bislang für Ascomyceten beschrieben.

Neben den Untersuchungen zu Laccasen aus aquatischen Pilzen wurden verschiedene Strategien zum Einsatz von immobilisierten Pilzkulturen zur Entfärbung von Farbstoffen evaluiert. Die Immobilisierung des Stammes UHH 5-1-03 auf Dunstabzugshaubenfiltermaterial stellte sich als kostengünstige und mit geringem Aufwand zu realisierende Methode der Immobilisierung von Pilzmyzel heraus. Im Vergleich mehrerer Prozessdesigns wurde der Einsatz von kleinen Filterstücken mit immobilisierter Pilzbiomasse in einer Blasensäule als optimales Regime identifiziert. In Zusammenarbeit mit einem Industriepartner wurde die im Labormaßstab entwickelte Methode erfolgreich auf den 10-L-Maßstab aufskaliert. In diesem Reaktor war Stamm UHH 5-1-03 auch unter nicht sterilen Bedingungen in der Lage, ein realitätsnahes Modellabwasser zu entfärben und dessen CSB zu senken, ohne dass dafür die Zugabe eines Kosubstrates nötig gewesen wäre.

Neben der prinzipiellen Eignung von aquatischen Pilzen zur Entfärbung von Textilfarbstoffen konnte in der vorliegenden Arbeit ein besonders potenter Stamm identifiziert werden. Für diesen Stamm wurde ein Reaktorsystem zur Behandlung von Modellabwässern optimiert. Die Beteiligung der von diesem Stamm gebildeten Laccase an Entfärbungsprozessen wurde nachgewiesen. Sie wurde charakterisiert und ihre Produktion optimiert (Abbildung 39).

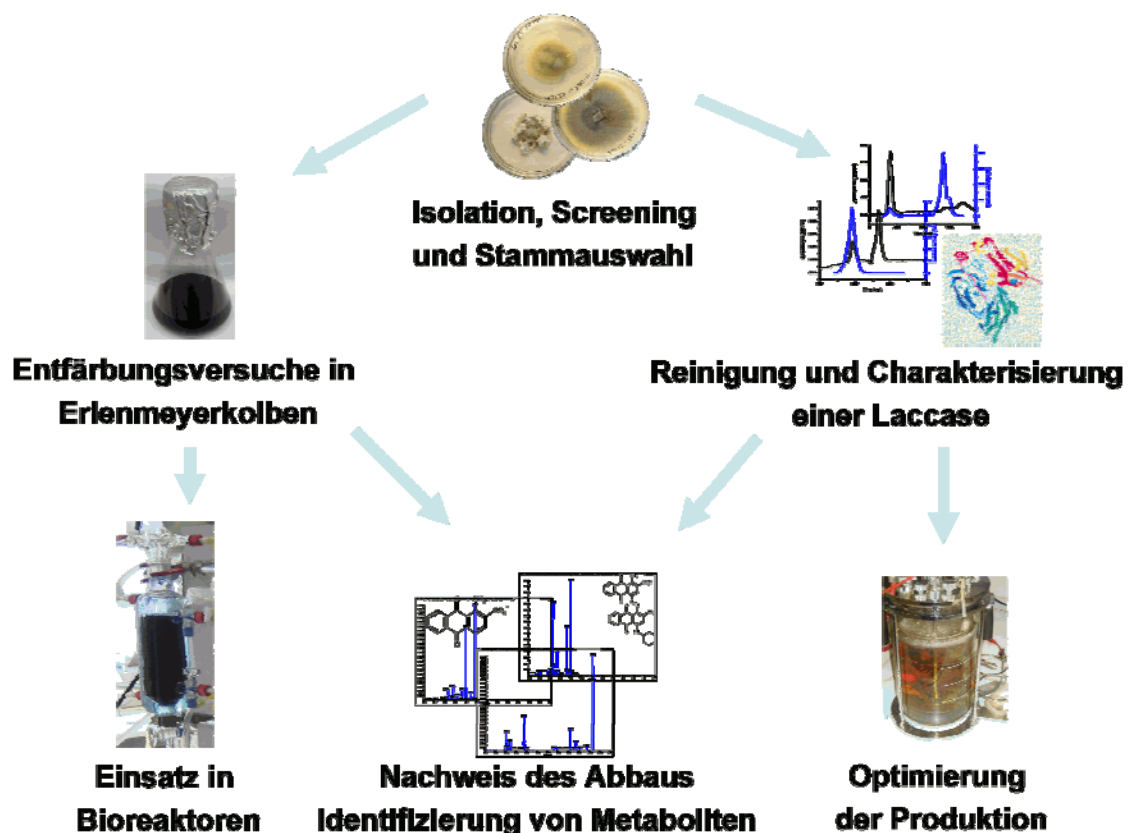


Abbildung 39: Überblick über die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeiten

6. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein hohes und bislang nicht ausgenutztes Potenzial aquatischer Pilze zur Behandlung von farbstoffhaltigen Abwässern der Textilindustrie.

Im Labormaßstab und unter Modellabwasserbedingungen wurde ein Stamm identifiziert, dessen Anwendbarkeit durch den im EU-Projekt SOPHIED (*Novel sustainable Bioprocesses for European Colour Industries*) beteiligten Industriepartner Wetlands SPRL (Louvain-la-Neuve, Belgien) im Pilotmaßstab untersucht wird. Dabei fließen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Immobilisierung von Myzel und einem geeigneten Reaktordesign ein. Mit dem in Entwicklung befindlichen, mobilen System soll zukünftig die Übertragbarkeit der vorgestellten Ergebnisse auf Praxisbedingungen getestet werden. Eine Kombination mit weiteren bspw. chemischen Verfahren der Abwasserbehandlung ist vorgesehen.

Gleichzeitig wurde interessierten Projektpartnern eine kostengünstige Methode zur Produktion der Laccase aus dem Stamm UHH 5-1-03 zur Verfügung gestellt, die bereits erfolgreich Anwendung im 50-L-Maßstab fand. Die gewonnene Laccase wird gegenwärtig hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für Synthesezwecke (Synthese neuer Farbstoffmoleküle) durch einen universitären Projektpartner (L'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgien) untersucht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte umfassende biochemische und molekularbiologische Charakterisierung des Enzyms lässt weiterhin erwarten, dass weiterführende Studien, beispielsweise zu Struktur-Funktions-Beziehungen von Laccasen oder mit dem Ziel der Enzym-Überproduktion in heterologen Wirtsorganismen, erheblich vereinfacht werden.

In Kooperation mit dem Department Tierzelltoxikologie des UFZ werden derzeit Toxizitätsuntersuchungen von behandelten Farbstofflösungen durchgeführt, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch auf dieser Ebene zu vervollständigen.

Nicht zuletzt legen die gewonnenen Ergebnisse eine Beteiligung der aquatischen Pilze an einem Abbau von Xenobiotika auch unter natürlichen Bedingungen nahe und bestätigen damit vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe, bei denen auf andere Umweltschadstoffe fokussiert wurde. Weiterführende Studien zur Untersuchung der Beteiligung von aquatischen Pilzen an natürlichen Attenuierungsprozessen erscheinen vor diesem Hintergrund als sehr vielversprechend.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abadulla, E., T. Tzanov, S. Costa, K.-H. Robra, A. Cavaco-Paulo, and G. M. Gübitz.** 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:3357-3362.
2. **Abdel-Raheem, A. M., and E. H. Ali.** 2004. Lignocellulolytic enzyme production by aquatic hyphomycetes species isolated from the Nile's delta region. *Mycopathologia* **157**:277-286.
3. **Abel, T. H., and F. Bärlocher.** 1984. Effects of cadmium on aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **48**:245-251.
4. **Alexandre, G., and I. B. Zhulin.** 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in Biotechnology* **18**:41-42.
5. **Allen, S. J., M. Murray, P. Brown, and O. Flynn.** 1994. Peat as an adsorbent for dyestuffs and metals in wastewater. *Resources, Conservation and Recycling* **11**:25-39.
6. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.
7. **Alves da Cunha, M. A., A. M. Barbosa, E. C. Giese, and R. F. H. Dekker.** 2003. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *Journal of Basic Microbiology* **43**:385-392.
8. **Ambrosio, S. T., and G. M. Campos-Takaki.** 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresource Technology* **91**:69-75.
9. **Anjaneyulu, Y., N. S. Chary, and D. S. S. Raj.** 2005. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **4**:245-273.
10. **Arora, D. S., and P. K. Gill.** 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology* **77**:89-91.
11. **Augustin, T., D. Schlosser, R. Baumbach, J. Schmidt, K. Grancharov, G. Krauss, and G.-J. Krauss.** 2006. Biotransformation of 1-naphthol by a strictly aquatic fungus. *Current Microbiology* **52**:216-220.
12. **Babuna, F. G., D. Orhon, E. U. Cokgor, G. Insel, and B. Yaprakli.** 1998. Modelling of activated sludge for textile wastewaters. *Water Science and Technology* **38**:9-17.
13. **Bajpai, P., and P. K. Bajpai.** 1994. Biological colour removal of pulp and paper mill wastewaters. *Journal of Biotechnology* **33**:211-220.
14. **Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **30**:215-242.
15. **Baldrian, P.** 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **32**:78-91.
16. **Baldrian, P.** 2004. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**:560-563.
17. **Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh, and R. Marchant.** 1996. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresource Technology* **58**:217-227.
18. **Bannai, H., Y. Tamada, O. Maruyama, K. Nakai, and S. Miyano.** 2002. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**:298-305.
19. **Bärlocher, F.** 1992. *The Ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
20. **Beloqui, A., M. Pita, J. Polaina, A. Martinez-Arias, O. V. Golyshina, M. Zumarraga, M. M. Yakimov, H. Garcia-Arellano, M. Alcalde, V. M. Fernandez, K. Elborough, J. M. Andreu, A. Ballesteros, F. J. Plou, K. N. Timmis, M. Ferrer, and P. N. Golyshin.** 2006. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of Biological Chemistry* **281**:22933-22942.

21. **Bending, G. D., M. Friloux, and A. Walker.** 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters* **212**:59-63.
22. **Benndorf, D., G. U. Balcke, H. Harms, and M. von Bergen.** 2007. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME Journal* **1**:224-234.
23. **Berg, J., J. Tymoczky, L. Stryer, and N. Clarke.** 2002. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York.
24. **Bermingham, S.** 1996. Effects of pollutants on aquatic hyphomycetes colonizing leaf material in freshwater, p. 201-216. *In* J. Frankland, N. Magan, and G. Gadd (eds.), *Fungi and Environmental Change*. University Press, Cambridge.
25. **Bertrand, G.** 1894. Sur le latex de l'arbre à laque. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **118**:1215-1218.
26. **Beverwijk, A. v.** 1951. Zalewski's *Clathrosphaera spirifera*. *Transactions of the British Mycological Society* **34**:280-290.
27. **Bezalel, L., Y. Hadar, and C. E. Cerniglia.** 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:2495-2501.
28. **Bollag, J.-M., and A. Leonowicz.** 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* **48**:849-854.
29. **Borja, J., D. M. Taleon, J. Auresenia, and S. Gallardo.** 2005. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry* **40**:1999-2013.
30. **Braha, B.** 2004. Physiologisch-biochemische Charakterisierung schwermetallinduzierter Reaktionen des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* (Teleomorph: *Nectria lugdunensis*). Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
31. **Brock, B. J., S. Rieble, and M. H. Gold.** 1995. Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:3076-3081.
32. **Bucher, V. V. C., S. B. Pointing, K. D. Hyde, and C. A. Reddy.** 2004. Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi. *Microbial Ecology* **48**:331-337.
33. **Büsing, N., and M. O. Gessner.** 2006. Benthic bacterial and fungal productivity and carbon turnover in a freshwater marsh. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:596-605.
34. **Call, H. P., and I. Mücke.** 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* **53**:163-202.
35. **Camarero, S., D. Ibarra, M. J. Martinez, and A. T. Martinez.** 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1775-1784.
36. **Cameron, M. D., S. Timofeevski, and S. D. Aust.** 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**:751-758.
37. **Caramelo, L., M. J. Martinez, and A. T. Martinez.** 1999. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:916-922.
38. **Carliell, C. M., S. J. Barclay, N. Naidoo, C. A. Buckley, D. A. Mulholland, and E. Senior.** 1995. Microbial decolorization of a reactive azo-dye under anaerobic conditions. *Water SA* **21**:61-69.
39. **Champagne, P. P., and J. A. Ramsay.** 2005. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**:276-285.
40. **Chang, H.** 2001. *Helicoon doliiformis* sp. nov. and two similar helicosporous hyphomycetes from Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **42**:149-152.

41. **Chefetz, B., Y. Chen, and Y. Hadar.** 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3175-3179.
42. **Chivukula, M., and V. Renganathan.** 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:4374-4377.
43. **Chivukula, M. F., J. T. Spadaro, and V. Renganathan.** 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* **34**:7765-7772.
44. **Choy, K. K. H., G. McKay, and J. F. Porter.** 1999. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. *Resources, Conservation and Recycling* **27**:57-71.
45. **Chu, W., and C. W. Ma.** 1998. Reaction kinetics of UV-decolourization for dye materials. *Chemosphere* **37**:961-974.
46. **Chung, K. T., S. E. Stevens, and C. E. Cerniglia.** 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews in Microbiology* **18**:175-190.
47. **Claus, H.** 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* **179**:145-150.
48. **Claus, H., G. Faber, and H. König.** 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**:672-678.
49. **Collins, P., and A. Dobson.** 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3444-3450.
50. **Conneely, A., W. F. Smyth, and G. McMullan.** 2002. Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **451**:259-270.
51. **Cookson, L. J.** 1995. Reliability of Poly B-411, a polymeric anthraquinone-based dye, in determining the rot type caused by wood-inhabiting fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:801-803.
52. **Correia, V. M., T. Stephenson, and S. J. Judd.** 1994. Characterization of textile wastewaters - a review. *Environmental Technology* **15**:917-929.
53. **Couto, S. R., M. Gundin, M. Lorenzo, and M. A. Sanroman.** 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry* **38**:249-255.
54. **Couto, S. R., and J. L. Toca-Herrera.** 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* **25**:558-569.
55. **Crestini, C., and D. S. Argyropoulos.** 1998. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **6**:2161-2169.
56. **Cripps, C., J. A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:1114-1118.
57. **Curir, P., C. Thurston, F. Daquila, C. Pasini, and A. Marchesini.** 1997. Characterization of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for *Genista*. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**:147-153.
58. **D'Acunzo, F., and C. Galli.** 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry* **270**:3634-3640.
59. **D'Souza, D. T., R. Tiwari, A. K. Sah, and C. Raghukumar.** 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **38**:504-511.
60. **De Jong, E., and J. A. Field.** 1997. Sulfur tuft and turkey tail: biosynthesis and biodegradation of organohalogenes by basidiomycetes. *Annual Review of Microbiology* **51**:375-414.
61. **De la Rubia, T., E. Ruiz, J. Perez, and J. Martinez.** 2002. Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavidio-alba* induced by vanillin. *Archives of Microbiology* **179**:70-73.

62. **De Souza, C. G., G. K. Tychanowicz, D. F. de Souza, and R. M. Peralta.** 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* **44**:129-136.
63. **De Souza, C. G. M., and R. M. Peralta.** 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology* **43**:278-286.
64. **Deveci, T., A. Unyayar, and M. A. Mazmanci.** 2004. Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **30**:25-32.
65. **Doerffel, K.** 1990. Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig.
66. **Dyrlov Bendtsen, J., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**:783-795.
67. **Edens, W. A., T. Q. Goins, D. Dooley, and J. M. Henson.** 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3071-3074.
68. **Eggert, C., U. Temp, J. F. D. Dean, and K.-E. L. Eriksson.** 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* **391**:144-148.
69. **Eggert, C., U. Temp, and K.-E. L. Eriksson.** 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Letters* **407**:89-92.
70. **Eggert, C., U. Temp, and K.-E. L. Eriksson.** 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:1151-1158.
71. **Eichlerova, I., L. Homolka, L. Lisa, and F. Nerud.** 2005. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* **60**:398-404.
72. **Fabbrini, M., C. Galli, and P. Gentili.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **16**:231-240.
73. **Faraco, V., A. Piscitelli, G. Sannia, and P. Giardina.** 2007. Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**:889-893.
74. **Fields, M. L.** 1962. Survey of selected filamentous fungi for Voges-Proskauer reactions. *Applied and Environmental Microbiology* **10**:513-514.
75. **Font, X., G. Caminal, X. Gabarrell, and T. Vicent.** 2006. Treatment of toxic industrial wastewater in fluidized and fixed-bed batch reactors with *Trametes versicolor*: influence of immobilisation. *Environmental Technology* **27**:845-854.
76. **Forgacs, E., T. Cserhati, and G. Oros.** 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International* **30**:953-971.
77. **Froehner, S. C., and K.-E. Eriksson.** 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *Journal of Bacteriology* **120**:458-465.
78. **Frohman, M. A., M. K. Dush, and G. R. Martin.** 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**:8998-9002.
79. **Galhaup, C., S. Goller, C. K. Peterbauer, J. Strauss, and D. Haltrich.** 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* **148**:2159-2169.
80. **Galhaup, C., and D. Haltrich.** 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:225-232.
81. **Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser, and D. Haltrich.** 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:529-536.

82. **Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch.** 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, p. 571-607. *In* J. M. Walker (ed.), The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
83. **Ge, Y., L. Yan, and K. Qinge.** 2004. Effect of environment factors on dye decolorization by *P. sordida* ATCC90872 in a aerated reactor. *Process Biochemistry* **39**:1401-1405.
84. **Germann, U. A., G. Muller, P. E. Hunziker, and K. Lerch.** 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *Journal of Biological Chemistry* **263**:885-896.
85. **Gianfreda, L., F. Xu, and J.-M. Bollag.** 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* **3**:1-26.
86. **Giardina, P., F. Autore, V. Faraco, G. Festa, G. Palmieri, A. Piscitelli, and G. Sannia.** 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**:1293-1300.
87. **Giardina, P., G. Palmieri, A. Scaloni, B. Fontanella, V. Faraco, G. Cennamo, and G. Sannia.** 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* **341**:655-663.
88. **Goh, T. K., and K. D. Hyde.** 1996. Biodiversity of freshwater fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **17**:328-345.
89. **Goncalves, M. S. T., A. M. F. Oliveira-Campos, E. M. M. S. Pinto, P. M. S. Plasencia, and M. J. R. P. Queiroz.** 1999. Photochemical treatment of solutions of azo dyes containing TiO₂. *Chemosphere* **39**:781-786.
90. **Grey, R., C. Höfer, and D. Schlosser.** 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *Journal of Basic Microbiology* **38**:371-382.
91. **Gromov, I., A. Marchesini, O. Farver, I. Pecht, and D. Goldfarb.** 1999. Azide binding to the trinuclear copper center in laccase and ascorbate oxidase. *European Journal of Biochemistry* **266**:820-830.
92. **Guo, L. Y., and W. H. Ko.** 1993. Two widely accessible media for growth and reproduction of *Phytophthora* and *Pythium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:2323-2325.
93. **Gupta, R., E. Jung, and S. Brunak.** 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*.
94. **Hai, F. I., K. Yamamoto, and K. Fukushi.** 2007. Hybrid treatment systems for dye wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **37**:315-377.
95. **Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98.
96. **Hammel, K. E.** 1989. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **11**:776-777.
97. **Hao, O. J., H. Kim, and P.-C. Chiang.** 2000. Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **30**:449-505.
98. **Harrington, T.** 1997. Aquatic hyphomycetes of 21 rivers in Southern Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* **97**:139-148.
99. **Harrison, S. J., S. T. Moss, and E. B. G. Jones.** 1988. Fungal adhesion in aquatic hyphomycetes. *International Biodeterioration* **24**:271-276.
100. **Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**:125-135.
101. **Heinfling, A., M. J. Martinez, A. T. Martinez, M. Bergbauer, and U. Szewzyk.** 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:2788-2793.

102. **Heinfling, A., F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, and A. T. Martinez.** 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters* **428**:141-146.
103. **Hermann, T. E., M. B. Kurtz, and S. P. Champe.** 1983. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* **154**:955-964.
104. **Hoegger, P. J., S. Kilaru, T. Y. James, J. R. Thacker, and U. Kües.** 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* **273**:2308-2326.
105. **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 Mangan-abhängigen Peroxidase. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
106. **Höfer, C., and D. Schlosser.** 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters* **451**:186-190.
107. **Hofrichter, M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**:454-466.
108. **Huber, M., and K. Lerch.** 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters* **219**:335-338.
109. **Hublik, G., and F. Schinner.** 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* **27**:330-336.
110. **Ingold, C.** 1942. Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Transactions of the British Mycological Society* **25**:339-417.
111. **Iyer, G., and B. B. Chattoo.** 2003. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters* **227**:121-126.
112. **Jaeckel, P., G.-J. Krauss, and G. Krauss.** 2005. Cadmium and zinc response of the fungi *Heliscus lugdunensis* and *Verticillium cf. alboatrum* isolated from highly polluted water. *Science of The Total Environment* **346**:274-279.
113. **Jaouani, A., S. Sayadi, M. Vanthournhout, and M. J. Penninckx.** 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology* **33**:802-809.
114. **Jarosz-Wilkolazka, A., J. Kochmanska-Rdest, E. Malarczyk, W. Wardas, and A. Leonowicz.** 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:566-572.
115. **Johannes, C., and A. Majcherczyk.** 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* **78**:193-199.
116. **Johannes, C., and A. Majcherczyk.** 2000. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:524-528.
117. **Junghanns, C.** 2003. Abbau von organischen Wasserkontaminanten durch aquatische Pilze und die Funktion der extrazellulären Oxidoreduktase Laccase für den Abbau. Diplomarbeit. Universität Leipzig, Leipzig.
118. **Junghanns, C., M. Moeder, G. Krauss, C. Martin, and D. Schlosser.** 2005. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* **151**:45-57.
119. **Kahraman, S. S., and I. H. Gurdal.** 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology* **82**:215-217.
120. **Kanally, R. A., and S. Harayama.** 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* **182**:2059-2067.
121. **Kang, S.-F., C.-H. Liao, and M.-C. Chen.** 2002. Pre-oxidation and coagulation of textile wastewater by the Fenton process. *Chemosphere* **46**:923-928.
122. **Kang, S. F., and H. M. Chang.** 1997. Coagulation of textile secondary effluents with Fenton's reagent. *Water Science and Technology* **36**:215-221.

123. **Kapdan, I. K., F. Kargi, G. McMullan, and R. Marchant.** 2000. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* **26**:381-387.
124. **Kapdan, I. K., and F. Kargi.** 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:195-199.
125. **Kasinath, A., C. Novotny, K. Svobodova, K. C. Patel, and V. Sasek.** 2003. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* **32**:167-173.
126. **Keck, A., J. Klein, M. Kudlich, A. Stolz, H. J. Knackmuss, and R. Mattes.** 1997. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3684-3690.
127. **Kellner, H., N. Jehmlich, D. Benndorf, R. Hoffmann, M. Ruhl, P. J. Hoegger, A. Majcherczyk, U. Kües, M. von Bergen, and F. Buscot.** 2007. Detection, quantification and identification of fungal extracellular laccases using polyclonal antibody and mass spectrometry. *Enzyme and Microbial Technology* **41**:694-701.
128. **Kellner, H., P. Luis, and F. Buscot.** 2007. Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in *Morchellaceae*: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiology Ecology* **61**:153-163.
129. **Kellner, H., P. Luis, B. Zimdars, B. Kiesel, and F. Buscot.** 2008. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* **40**:638-648.
130. **Kendrick, B.** 2000. *The Fifth Kingdom*, 3rd ed., Focus Publishing R. Pullins Company, Newburyport, MA, USA.
131. **Kiiskinen, L.-L., and M. Saloheimo.** 2004. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:137-144.
132. **Kiiskinen, L. L., L. Viikari, and K. Kruus.** 2002. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**:198-204.
133. **Kim, S. J., and M. Shoda.** 1999. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Biotechnology and Bioengineering* **62**:114-119.
134. **Kim, T.-H., C. Park, J. Lee, E.-B. Shin, and S. Kim.** 2002. Pilot scale treatment of textile wastewater by combined process (fluidized biofilm process-chemical coagulation-electrochemical oxidation). *Water Research* **36**:3979-3988.
135. **Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. D. David, and J. A. Stalpers.** 2001. *Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi*. 9th ed. CAB International, Wallingford.
136. **Kirk, T. K., and R. L. Farrell.** 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**:465-501.
137. **Klonowska, A., J. Le Petit, and T. Tron.** 2001. Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiology Letters* **200**:25-30.
138. **Kotterman, M. J. J., E. Heessels, E. Jong, and J. A. Field.** 1994. The physiology of anthracene biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**:179-186.
139. **Krauss, G., F. Bärlocher, and G.-J. Krauss.** 2003. Effects of pollution on aquatic hyphomycetes, p. 211-230. *In* C. Tsui and K. Hyde (eds.), *Freshwater mycology: a practical approach*. Fungal Diversity Press, HongKong.
140. **Krauss, G., F. Bärlocher, P. Schreck, W. Kranich, J. Miersch, J. Dermietzel, R. Wennrich, and G.-J. Krauss.** 1998. Aquatic hyphomycetes at extremely polluted sites in the Mansfelder Land area. *In* P. M. Becker (ed.), *Microbiology of polluted aquatic ecosystems*. UFZ-Series: 10/98, UFZ Centre for Environmental Research, Leipzig Halle, Leipzig.

141. **Krauss, G., F. Bärlocher, R. Wennrich, W. Glässer, and G.-J. Krauss.** 2001. Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Nova Hedwigia* **72**:419-428.
142. **Krauss, G., K. Jung, J. Ehrman, K. R. Sridhar, and F. Bärlocher.** 2003. Aquatische Hyphomyceten in kontaminierten Grundwasser-Habitaten, p. 65-68. In H. Foth (ed.), Risk assessment and management of large contaminated sites, Halle (Saale).
143. **Krauss, G., D. Schlosser, and G.-J. Krauss.** 2005. Aquatic fungi in heavy metal and organically polluted habitats, p. 221-46. In S. Deshmukh and M. Rai (eds.), Biodiversity of fungi: their role in human life. Science Publishers Inc., Enfield, NH., USA, Plymouth, UK..
144. **Krauss, G., K. R. Sridhar, and F. Bärlocher.** 2005. Aquatic hyphomycetes and leaf decomposition in contaminated groundwater wells in Central Germany. *Archiv für Hydrobiologie* **162**:416-428.
145. **Krauss, G., K. R. Sridhar, K. Jung, R. Wennrich, J. Ehrman, and F. Bärlocher.** 2003. Aquatic hyphomycetes in polluted groundwater habitats of Central Germany. *Microbial Ecology* **45**:329-339.
146. **Kudlich, M., A. Keck, J. Klein, and A. Stolz.** 1997. Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3691-3694.
147. **Kunz, A., V. Reginatto, and N. Duran.** 2001. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. *Chemosphere* **44**:281-287.
148. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
149. **Lambert, S. D., N. J. D. Graham, C. J. Sollars, and G. D. Fowler.** 1997. Evaluation of inorganic adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides. *Water Science and Technology* **36**:173-180.
150. **Leatham, G. F.** 1986. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**:51-58.
151. **Leonowicz, A., N. S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, and J. Rogalski.** 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* **41**:185-227.
152. **Leontievsky, A. A., N. M. Myasoedova, B. P. Baskunov, C. S. Evans, and L. A. Golovleva.** 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* **11**:331-340.
153. **Li, K., F. Xu, and K.-E. L. Eriksson.** 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2654-2660.
154. **Liakou, S., S. Pavlou, and G. Lyberatos.** 1997. Ozonation of azo dyes. *Water Science and Technology* **35**:279-286.
155. **Liers, C.** 2007. Das Lignozellulose abbauende Enzymsystem des holzbesiedelnden Schlauchpilzes *Xylaria polymorpha*. Dissertation. Internationales Hochschulinstitut Zittau, Zittau.
156. **Liers, C., R. Ullrich, M. Pecyna, D. Schlosser, and M. Hofrichter.** 2007. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme and Microbial Technology* **41**:785-793.
157. **Liers, C., R. Ullrich, K. Steffen, A. Hatakka, and M. Hofrichter.** 2006. Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**:573-579.
158. **Litvintseva, A. P., and J. M. Henson.** 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the Take-All Fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:1305-1311.

159. **Lucas, M. S., C. Amaral, A. Sampaio, J. A. Peres, and A. A. Dias.** 2006. Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology* **39**:51-55.
160. **Mai, C., W. Schormann, O. Milstein, and A. Hüttermann.** 2000. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**:510-514.
161. **Majcherczyk, A., and C. Johannes.** 2000. Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1474**:157-162.
162. **Mall, I. D., V. C. Srivastava, N. K. Agarwal, and I. M. Mishra.** 2005. Removal of Congo Red from aqueous solution by bagasse fly ash and activated carbon: Kinetic study and equilibrium isotherm analyses. *Chemosphere* **61**:492-501.
163. **Mall, I. D., S. N. Upadhyay, and Y. C. Sharma.** 1996. A review on economical treatment of wastewaters and effluents by adsorption. *International Journal of Environmental Studies* **51**:77 - 124.
164. **Marbach, I., E. Harel, and A. M. Mayer.** 1985. Pectin, a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **24**:2559-2561.
165. **Martin, C., M. Moeder, X. Daniel, G. Krauss, and D. Schlosser.** 2007. Biotransformation of the polycyclic musks HHCB and AHTN and metabolite formation by fungi occurring in freshwater environments. *Environmental Science and Technology* **41**:5395-5402.
166. **Martin, C., M. Pecyna, H. Kellner, N. Jehmlich, C. Junghanns, D. Benndorf, M. von Bergen, and D. Schlosser.** 2007. Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myriocoonium* sp. UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**:613-624.
167. **Martinez, A. T.** 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:425-444.
168. **Martinez, A. T., M. Speranza, F. J. Ruiz-Duenas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillen, M. J. Martinez, A. Gutierrez, and J. C. del Rio.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **8**:195-204.
169. **Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, and A. O. Henriques.** 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry* **277**:18849-18859.
170. **Martins, M. A. M., I. C. Ferreira, I. M. Santos, M. J. Queiroz, and N. Lima.** 2001. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* **89**:91-98.
171. **Masaphy, S., D. Levanon, Y. Henis, K. Venkateswarlu, and S. L. Kelly.** 1996. Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a) pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* **135**:51-55.
172. **Mayer, A. M., and R. C. Staples.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**:551-565.
173. **McIlvaine, T. C.** 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* **49**:183-186.
174. **Meckenstock, R. U., M. Safinowski, and C. Griebler.** 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* **49**:27-36.
175. **Mester, T., and M. Tien.** 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* **46**:51-59.
176. **Michniewicz, A., S. Ledakowicz, and A. Jarosz-Wilkolazka.** 2004. Three systems for the decolourization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. Posterpräsentation. Oxizymes, Neapel, Italien.

177. **Michniewicz, A., R. Ullrich, S. Ledakowicz, and M. Hofrichter.** 2006. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**:682-688.
178. **Mielgo, I., M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema.** 2002. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research* **36**:1896-1901.
179. **Mielgo, I., M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema.** 2001. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology* **89**:99-106.
180. **Min, K.-L., Y.-H. Kim, Y. W. Kim, H. S. Jung, and Y. C. Hah.** 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus riris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **392**:279-286.
181. **Moeder, M., C. Martin, J. Harynuk, T. Gorecki, R. Vinken, and P. F. X. Corvini.** 2006. Identification of isomeric 4-nonylphenol structures by gas chromatography-tandem mass spectrometry combined with cluster analysis. *Journal of Chromatography A* **1102**:245-255.
182. **Moeder, M., C. Martin, D. Schlosser, J. Harynuk, and T. Gorecki.** 2006. Separation of technical 4-nonylphenols and their biodegradation products by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1107**:233-239.
183. **Moreira, M. T., I. Mielgo, G. Feijoo, and J. M. Lema.** 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnology Letters* **22**:1499-1503.
184. **Neuhoff, V., R. Stamm, and R. Eibl.** 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**:427-448.
185. **Nicole, M., H. Chamberland, J. P. Geiger, N. Lecours, J. Valero, B. Rio, and G. B. Ouellette.** 1992. Immunocytochemical localization of laccase L1 in wood decayed by *Rigidoporus lignosus*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:1727-1739.
186. **Nicole, M., H. Chamberland, D. Rioux, N. Lecours, B. Rio, J. P. Geiger, and G. B. Ouellette.** 1993. A cytochemical study of extracellular sheaths associated with *Rigidoporus lignosus* during wood decay. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:2578-2588.
187. **Nigam, P., G. Armour, I. M. Banat, D. Singh, and R. Marchant.** 2000. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology* **72**:219-226.
188. **Nikolcheva, L. G., and F. Bärlocher.** 2002. Phylogeny of *Tetracladium* based on 18S rDNA. *Czech Mycology* **53**:285-295.
189. **Novotny, C., B. Rawal, M. Bhatt, M. Patel, V. Sasek, and H. P. Molitoris.** 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* **89**:113-122.
190. **Nyanhongo, G. S., J. Gomes, G. M. Gübitz, R. Zvauya, J. Read, and W. Steiner.** 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* **36**:1449-1456.
191. **O'Malley, D. M., R. Whetten, W. Bao, C.-L. Chen, and R. R. Sederoff.** 1993. The role of laccase in lignification. *The Plant Journal* **4**:751-757.
192. **O'Neill, C., F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, N. D. Lourenço, H. M. Pinheiro, and W. Delée.** 1999. Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **74**:1009-1018.
193. **Ollikka, P., K. Alhonmaki, V.-M. Leppanen, T. Glumoff, T. Raijola, and I. Suominen.** 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:4010-4016.
194. **Páca, J.** 1987. Bioreaktoren, p. 125-156. In H. Weide, J. Páca, and W. Knorre (eds.), *Biotechnologie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

195. **Pagga, U., and D. Brown.** 1986. The degradation of dyestuffs: part II behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* **15**:479-491.
196. **Palmieri, G., C. Bianco, G. Cennamo, P. Giardina, G. Marino, M. Monti, and G. Sannia.** 2001. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2754-2759.
197. **Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella, and G. Sannia.** 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:920-924.
198. **Palonen, H., M. Saloheimo, L. Viikari, and K. Kruus.** 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology* **33**:854-862.
199. **Pappin, D. J. C., P. Hojrup, and A. J. Bleasby.** 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* **3**:327-332.
200. **Pascoal, C., and F. Cassio.** 2004. Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:5266-5273.
201. **Pascoal, C., M. Pinho, F. Cassio, and P. Gomes.** 2003. Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: studies on a polluted river. *Freshwater Biology* **48**:2033-2044.
202. **Paszczynski, A., M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, and D. L. Crawford.** 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:3598-3604.
203. **Pearce, C. I., J. R. Lloyd, and J. T. Guthrie.** 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments* **58**:179-196.
204. **Pinheiro, H. M., E. Touraud, and O. Thomas.** 2004. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments* **61**:121-139.
205. **Pointing, S. B., and L. L. P. Vrijmoed.** 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**:317-318.
206. **Pophali, G. R., S. N. Kaul, and S. Mathur.** 2003. Influence of hydraulic shock loads and TDS on the performance of large-scale CETPs treating textile effluents in India. *Water Research* **37**:353-361.
207. **Prester, T., H. J. Prochaska, and P. Talalay.** 1992. Inhibition of NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase by Cibacron Blue and related anthraquinone dyes: a structure-activity study. *Biochemistry* **31**:824-833.
208. **Qi, W., and J. Jellison.** 2004. Induction and catalytic properties of an intracellular NADH-dependent 1,4-benzoquinone reductase from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**:53-60.
209. **Rafii, F., W. Franklin, and C. E. Cerniglia.** 1990. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:2146-2151.
210. **Raghukumar, C., T. M. D'Souza, R. G. Thorn, and C. A. Reddy.** 1999. Lignin-Modifying Enzymes of *Flavodon flavus*, a Basidiomycete Isolated from a Coastal Marine Environment. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2103-2111.
211. **Rai, H., M. Bhattacharyya, J. Singh, T. K. Bansal, P. Vats, and U. C. Banerjee.** 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **35**:219-238.
212. **Ramalho, P. A., M. H. Cardoso, A. Cavaco-Paulo, and M. T. Ramalho.** 2004. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:2279-2288.

213. **Raviraja, N., K. Sridhar, and F. Bärlocher.** 1998. Breakdown of *Ficus* and *Eucalyptus* leaves in an organically polluted river in India: fungal diversity and ecological functions. *Freshwater Biology* **39**:537-545.
214. **Reddy, C. A.** 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**:320-328.
215. **Reid, I. D., and M. G. Paice.** 1994. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* **13**:369-375.
216. **Riva, S.** 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* **24**:219-226.
217. **Robene-Soustrade, I., and B. Lung-Escarmant.** 1997. Laccase isoenzyme patterns of European *Armillaria* species from culture filtrates and infected woody plant tissues. *European Journal of Forest Pathology* **27**:105-114.
218. **Robene-Soustrade, I., B. Lung-Escarmant, J. J. Bono, and B. Taris.** 1992. Identification and partial characterization of an extracellular manganese-dependent peroxidase in *Armillaria ostoyae* and *Armillaria mellea*. *European Journal of Forest Pathology* **22**:227-236.
219. **Robinson, T., B. Chandran, and P. Nigam.** 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **29**:575-579.
220. **Robinson, T., G. McMullan, R. Marchant, and P. Nigam.** 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* **77**:247-255.
221. **Robles, A., R. Lucas, M. Martinez-Canamero, N. Ben Omar, R. Perez, and A. Galvez.** 2002. Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology* **31**:516-522.
222. **Rodakiewicz-Nowak, J., S. M. Kasture, B. Dudek, and J. Haber.** 2000. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**:1-11.
223. **Rodríguez Couto, S., M. A. Sanromán, D. Hofer, and G. M. Gübitz.** 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology* **95**:67-72.
224. **Rodríguez, E., M. A. Pickard, and R. Vazquez-Duhalt.** 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* **38**:27-32.
225. **Rogalski, J., A. Dawidowicz, E. Jozwik, and A. Leonowicz.** 1999. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**:29-39.
226. **Rogalski, J., E. Jozwik, A. Hatakka, and A. Leonowicz.** 1995. Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **95**:99-108.
227. **Russ, R., J. Rau, and A. Stolz.** 2000. The Function of Cytoplasmic Flavin Reductases in the Reduction of Azo Dyes by Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1429-1434.
228. **Ryan, S., W. Schnitzhofer, T. Tzanov, A. Cavaco-Paulo, and G. M. Gübitz.** 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. *Enzyme and Microbial Technology* **33**:766-774.
229. **Sachs, L.** 1992. *Angewandte Statistik*, 7th ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
230. **Salvo, V. S., I. Gallizia, M. Moreno, and M. Fabiano.** 2005. Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Marine Pollution Bulletin* **50**:553.
231. **Sambrook, J. F., E. F.; Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
232. **Saparrat, M. C. N., F. Guillen, A. M. Arambarri, A. T. Martinez, and M. J. Martinez.** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the

- white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology **68**:1534-1540.
233. **Savoie, J.-M., G. Mata, and C. Billette.** 1998. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and Shiitake, *Lentinula edodes*. Applied Microbiology and Biotechnology **49**:589-593.
 234. **Schatten, A.** 1999. Statistik für Chemiker - Ein Kochbuch, Wien.
 235. **Schliephake, K., and G. T. Lonergan.** 1996. Laccase variation during dye decolourisation in a 200 l packed-bed bioreactor. Biotechnology Letters **18**:881-886.
 236. **Schlosser, D., R. Grey, and W. Fritsche.** 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. Applied Microbiology and Biotechnology **47**:412-418.
 237. **Seifert, K., and W. Gams.** 2001. The taxonomy of anamorphic fungi, p. 307-347. In D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin and P. A. Lemke (eds.), The Mycota VII Part A. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
 238. **Selvam, K., K. Swaminathan, and K.-S. Chae.** 2003. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. Bioresource Technology **88**:115-119.
 239. **Shaul, G. M., T. J. Holdsworth, C. R. Dempsey, and K. A. Dostal.** 1991. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. Chemosphere **22**:107-119.
 240. **Shaw, C. B., C. M. Carliell, and A. D. Wheatley.** 2002. Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. Water Research **36**:1993-2001.
 241. **Shearer, C. A.** 1992. The role of woody debris, p. 77-78. In F. Bärlocher (ed.), The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
 242. **Shearer, C. A., E. Descals, B. Kohlmeyer, J. Kohlmeyer, L. Marvanová, D. Padgett, D. Porter, H. A. Raja, J. P. Schmit, H. A. Thorton, and H. Voglmayr.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodiversity And Conservation **16**:49-67.
 243. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. Anal. Chem. **68**:850-858.
 244. **Shin, K., I. Oh, and C. Kim.** 1997. Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology **63**:1744-1748.
 245. **Slawson, M. S., and M. L. Snyder.** 1952. Mechanism of action of sodium azide on the genus *Candida*. Journal of Dental Research **31**:47-52.
 246. **Slokar, Y. M., and A. Majcen Le Marechal.** 1998. Methods of decoloration of textile wastewaters. Dyes and Pigments **37**:335-356.
 247. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry **150**:76-85.
 248. **Soares, G. M. B., M. T. P. de Amorim, and M. Costa-Ferreira.** 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. Journal of Biotechnology **89**:123-129.
 249. **Soares, G. M. B., M. T. Pessoa Amorim, A. Maria Oliveira-Campos, R. Hrdina, and M. Costa-Ferreira.** 2002. Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase. Enzyme and Microbial Technology **30**:607-612.
 250. **Soden, D. M., and A. D. Dobson.** 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sator-caju*. Microbiology **147**:1755-63.
 251. **Solé, M., I. Fetzer, R. Wennrich, K. R. Sridhar, H. Harms, and G. Krauss.** 2008. Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for assessing anthropogenic stress. Science of The Total Environment **389**:557-565.
 252. **Spadaro, J. T., and V. Renganathan.** 1994. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. Archives of Biochemistry and Biophysics **312**:301-307.

253. **Sridhar, K., G. Krauss, F. Bärlocher, R. Wennrich, and G.-J. Krauss.** 2000. Fungal diversity in heavy metal polluted waters in Central Germany. *Fungal Diversity* **5**:119-129.
254. **Sridhar, K. R., and F. Bärlocher.** 2000. Initial Colonization, Nutrient Supply, and Fungal Activity on Leaves Decaying in Streams. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1114-1119.
255. **Steven, A.** 2007. Lokalisierung und Charakterisierung von Laccasen aus dem aquatischen Hyphomyceten *Clavariopsis aquatica*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
256. **Stolz, A.** 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:69-80.
257. **Suberkropp, K.** 2001. Fungal growth, production, and sporulation during leaf decomposition in two streams. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5063-5068.
258. **Sulistyaningdyah, W. T., J. Ogawa, H. Tanaka, C. Maeda, and S. Shimizu.** 2004. Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiology Letters* **230**:209-214.
259. **Swamy, J., and J. A. Ramsay.** 1999. Effects of glucose and NH_4^+ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* **25**:278-284.
260. **Swamy, J., and J. A. Ramsay.** 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **24**:130-137.
261. **Tang, C., and V. Chen.** 2002. Nanofiltration of textile wastewater for water reuse. *Desalination* **143**:11-20.
262. **Tauber, M. M., G. M. Gübitz, and A. Rehorek.** 2005. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:2600-2607.
263. **Tetsch, L., J. Bend, and U. Hölker.** 2006. Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**:183-194.
264. **Thakker, G. D., C. S. Evans, and K. K. Rao.** 1992. Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**:321-323.
265. **Thurston, C. F.** 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**:19-26.
266. **Tokumasu, S.** 1994. Trophodynamic structure of a swampy bog at the climax stage of limnological succession III. Filamentous fungi associated with the standing leaves of *Typha latifolia*. *Water, Air, & Soil Pollution* **76**:491-499.
267. **Trovaslet, M., E. Enaud, Y. Guivarc'h, A.-M. Corbisier, and S. Vanhulle.** 2007. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme and Microbial Technology* **41**:368-376.
268. **Trupkin, S., L. Levin, F. Forchiassin, and A. Viale.** 2003. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**:682-90.
269. **Tsioulpas, A., D. Dimou, D. Iconomou, and G. Aggelis.** 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* **84**:251-257.
270. **Tsutsumi, Y., T. Haneda, and T. Nishida.** 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* **42**:271-276.
271. **Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka, and M. Itavaara.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* **72**:169-183.

272. **Ullrich, R., L. M. Huong, N. L. Dung, and M. Hofrichter.** 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**:357-363.
273. **Ulmer, D. C., M. S. A. Leisola, and A. Fiechter.** 1984. Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* **1**:13-24.
274. **Ulmer, D. C., M. S. A. Leisola, B. H. Schmidt, and A. Fiechter.** 1983. Rapid Degradation of Isolated Lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**:1795-1801.
275. **Uyama, H., and S. Kobayashi.** 2002. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **19-20**:117-127.
276. **Vandevivere, P. C., R. Bianchi, and W. Verstraete.** 1998. Review: treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **72**:289-302.
277. **Vanhulle, S., E. Enaud, M. Trovaslet, L. Billottet, L. Kneipe, J.-L. H. Jiwana, A.-M. Corbisier, and J. Marchand-Brynaert.** 2008. Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi. *Chemosphere* **70**:1097-1107.
278. **Vanhulle, S., E. Enaud, M. Trovaslet, N. Nouaimeh, C.-M. Bols, T. Keshavarz, T. Tron, G. Sannia, and A.-M. Corbisier.** 2007. Overlap of laccases/cellobiose dehydrogenase activities during the decolourisation of anthraquinonic dyes with close chemical structures by *Pycnoporus* strains. *Enzyme and Microbial Technology* **40**:1723-1731.
279. **Verma, P., and D. Madamwar.** 2005. Decolorization of azo dyes using Basidiomycete strain PV 002. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**:481-485.
280. **Vijaykrishna, D., R. Jeewon, and K. D. Hyde.** 2006. Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity* **23**:351-390.
281. **Wahleithner, J., F. Xu, K. Brown, S. Brown, E. Golightly, T. Halkier, S. Kauppinen, A. Pederson, and P. Schneider.** 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* **29**:395.
282. **Webster, J.** 1992. Anamorph-teleomorph relationships. p. 99-117. *In* F. Bärlocher (ed.), *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
283. **Webster, J.** 1959. Experiments with Spores of Aquatic Hyphomycetes: I. Sedimentation, and Impaction on Smooth Surfaces. *Annals of Botany* **23**:595-611.
284. **Webster, J.** 1983. *Pilze*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
285. **Wesenberg, D., F. Buchon, and S. N. Agathos.** 2002. Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula duseinii*. *Biotechnology Letters* **24**:989-993.
286. **Wesenberg, D., I. Kyriakides, and S. N. Agathos.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* **22**:161-187.
287. **Wong, M. K. M., T.-K. Goh, I. J. Hodgkiss, K. D. Hyde, V. M. Ranghoo, C. K. M. Tsui, W.-H. Ho, W. S. W. Wong, and T.-K. Yuen.** 1998. Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation* **7**:1187-1206.
288. **Wong, Y., and J. Yu.** 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* **33**:3512-3520.
289. **Wu, J., M. A. Eiteman, and S. E. Law.** 1998. Evaluation of membrane filtration and ozonation processes for treatment of reactive-dye wastewater. *Journal of Environmental Engineering* **124**:272-277.
290. **Xu, F.** 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* **35**:7608-7614.

291. **Xu, Y., R. E. Lebrun, P.-J. Gallo, and P. Blond.** 1999. Treatment of textile dye plant effluent by nanofiltration membrane. *Separation Science and Technology* **34**:2501 - 2519.
292. **Yadav, J., R. Wallace, and C. Reddy.** 1995. Mineralization of mono- and dichlorobenzenes and simultaneous degradation of chloro- and methyl-substituted benzenes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:677-680.
293. **Yaver, D., F. Xu, E. Golightly, K. Brown, S. Brown, M. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorf, and H. Dalboge.** 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:834-841.
294. **Yaver, D. S., M. D. C. Overjero, F. Xu, B. A. Nelson, K. M. Brown, T. Halkier, S. Bernauer, S. H. Brown, and S. Kauppinen.** 1999. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4943-4948.
295. **Yoshida, H.** 1883. Chemistry of laquer (Urushi) part 1. Communication from the Chemical Society of Tokio **43**:472-486.
296. **Zhang, F., and J. Yu.** 2000. Decolourisation of Acid Violet 7 with complex pellets of white rot fungus and activated carbon. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **23**:295-301.
297. **Zheng, Z., R. E. Levin, J. L. Pinkham, and K. Shetty.** 1999. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochemistry* **34**:31-37.
298. **Zhu, X., J. Gibbons, J. Garcia-Rivera, A. Casadevall, and P. R. Williamson.** 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity* **69**:5589-5596.
299. **Zimmermann, T., H. G. Kulla, and T. Leisinger.** 1982. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry* **129**:197-203.
300. **Zissi, U., G. Lyberatos, and S. Pavlou.** 1997. Biodegradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis* under aerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**:49-55.
301. **Zollinger, H.** 2003. Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments, 3rd, rev. ed., Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.
302. **Zubieta, C. R., J. S. S. Krishna, D. McMullan, M. Kapoor, H. L. Axelrod, M. D. Miller, P. Abdubek, C. Acosta, T. Astakhova, D. Carlton, H.-J. Chiu, T. Clayton, M. C. Deller, L. Duan, Y. Elias, M.-A. Elsliger, J. Feuerhelm, S. K. Grzechnik, J. Hale, G. W. Han, L. Jaroszewski, K. K. Jin, H. E. Klock, M. W. Knuth, P. Kozbial, A. Kumar, D. Marciano, A. T. Morse, K. D. Murphy, E. Nigoghossian, L. Okach, S. Oommachen, R. Reyes, C. L. Rife, P. Schimmel, C. V. Trout, H. v. d. Bedem, D. Weekes, A. White, Q. Xu, K. O. Hodgson, J. Wooley, A. M. Deacon, A. Godzik, S. A. Lesley, and I. A. Wilson.** 2007. Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing peroxidase, TyrA. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **69**:234-243.

8. Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des EU-Projektes SOPHIED (Novel Sustainable Bioprocesses for European Colour Industries; NMP2-CT-2004-505899) dessen finanzielle Unterstützung an dieser Stelle besonderen Dank verdient. Sehr fruchtbar waren die persönlichen Kontakte zu Projektpartnern, die auf persönlicher und wissenschaftlicher Ebene erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Dietmar Schlosser für die fundierte wissenschaftliche Betreuung, die Einblicke in den Wissenschaftsalltag abseits von Laborarbeiten, die Motivation und die zu jeder Zeit freundschaftliche Atmosphäre bei dienstlichen und zu privaten Anlässen.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in der Abteilung Ökologische und Pflanzen-Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, die Möglichkeit am DFG-Graduiertenkolleg 416 als assoziierter Kollegiat partizipieren zu dürfen, für die hilfreiche Unterstützung und dem Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Martin Hofrichter danke ich für die exzellente wissenschaftliche Betreuung während meines Doktorandenstudiums am Internationalen Hochschulinstitutes Zittau, die fruchtbaren Diskussionen und den sehr persönlichen Umgang.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Gudrun Krauß für die Unterstützung meiner Arbeit sowie der gesamten Arbeitsgruppe für das fruchtbare Arbeiten in Halle und später in Leipzig. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Claudia Martin, die mich mit ihrer Kompetenz nicht nur im analytischen Bereich hat dazulernen lassen, sondern die auch den Humor und die Leichtigkeit im nicht immer amüsanten Labor-/Büroalltag am Leben erhielt. Danken möchte ich auch Marek Pecyna, Daniela Böhm, Jan-Felix Neumann und Izabela Szostkiewicz für das beiderseitig fruchtbare Zusammenarbeiten und die angenehme gemeinsame Zeit.

Mein Dank gilt des Weiteren allen Mitarbeitern des Departments Umweltmikrobiologie, des Departments Proteomics (insbesondere Nico Jehmlich), des Departments Tierzelltoxikologie, den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Krauss und Prof. Dr. Hofrichter, der Arbeitsgruppe von Dr. Vanhulle an der Katholischen Universität Louvain-la-Neuve, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sannia in Neapel, dem Team von Wetlands, Dr. Roberto Parra und Prof. Dr. „Taj“ Keshavarz von der University of Westminster und allen Doktoranden des UFZ, die den Weg teilten.

Unglaublich wichtig (nicht nur) für die Anfertigung dieser Arbeit ist und war meine Familie, obwohl die letzten Meter sicherlich auch für euch schwer waren. Danke!

Und obwohl zuletzt genannt, möchte ich meinen Freunden nicht minder danken, ob der Unterstützung und einfach nur dem „da-sein“.

9. Anhang

Anhang I:

Chemikalienliste

Chemikalie	Lieferant
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)	Sigma-Aldrich, München
2,6-Dimethoxyphenol	Fluka, Neu-Ulm
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad, München
30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung	Bio-Rad, München
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
<i>Acid Black 194</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Acid Black 210</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Acid Blue 62</i>	Maria-Curie-Skłodowska Universität, Lublin, Poland
<i>Acid Blue 62</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Acid Blue 62</i>	Yorkshire Europe, Tertre, Belgien
<i>Acid Red 266</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Acid Red 299</i>	Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium
<i>Acid Yellow 149</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Acid Yellow 194</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Acid Yellow 49</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
<i>BCA protein kit</i>	Novagen, Darmstadt
<i>BigDye Sequencing Chemistry</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
COD HR Reagenz	Hanna Instruments, Szeged, Ungarn
Coomassie Brilliant Blau G-250	Bio-Rad, München
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
<i>Direct Black 38</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>Direct Blue 1</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>Direct Blue 71</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Direct Red 28</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>Direct Red 80</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Direct Yellow 106</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Disperse Blue 1</i>	Fluka, Neu-Ulm
<i>Disperse Red 1</i>	Fluka, Neu-Ulm
<i>Disperse Yellow 3</i>	Fluka, Neu-Ulm

Chemikalie	Lieferant
<i>EcoRI</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
<i>Gel Filtration LMW und HMW calibration kits</i>	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Glycerol	Bio-Rad, München
<i>Glycoprofile II N-deglycosylation kit</i>	Sigma-Aldrich, München
Guajakol	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
<i>HindIII</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Keyhole-Limpet-Hämocyanin	Pineda, Berlin, Germany
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
LAB Silikonentschäumer	Merck, Darmstadt
<i>Liquid Mix 3-10 IEF marker</i>	Serva, Heidelberg
Malonsäure	Merck, Darmstadt
Malzextrakt	Merck, Darmstadt
Mangansulfat	Fluka, Neu-Ulm
Merretichperoxidase	Fluka, Neu-Ulm
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Bio-Rad, München
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
<i>PageRuler unstained protein ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PCR master mix</i>	Promega, Madison, WI, USA
<i>pCR2.1 TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Phenol	Riedel-de-Häen, Seelze
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
<i>Protein Calibration Standard II</i>	Bruker, Bremen
<i>PvuI</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>Reactive Black 5</i>	Fluka, Neu-Ulm
<i>Reactive Black 5</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Reactive Blue 19</i>	Acros Organics, Geel, Belgien
<i>Reactive Blue 222</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
<i>Reactive Red 195</i>	TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK

Chemikalie

Reactive Red 4
Reactive Yellow 145
Reactive Yellow 81
RevertAid™ H Minus M-MuLV
reverse transcriptase
 Rinderserumalbumin
 Schwefelsäure
 SDS-Probenpuffer
Silver Stain SDS high molecular
weight standard mixture
 Sinapinsäure
 Syringaldazin
 T4-Ligase
 Tomatensaft
 Trichloressigsäure
 Trifluoressigsäure
 TRIS-Glycin-SDS-Puffer
 TRIS-HCl-Puffer (pH 6,8)
 TRIS-HCl-Puffer (pH 8,8)
 Trizol Reagenz
 Trypsin
 Tyrosin
 Vanillinsäure
 Wasserstoffperoxid
Wizard SV kit
XhoI
 Zitronensäure-Monohydrat

Lieferant

Fluka, Neu-Ulm
 TownEnd PLC Ltd., Leeds, UK
 Fluka, Neu-Ulm
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Fluka, Neu-Ulm
 Merck, Darmstadt
 Bio-Rad, München
 Sigma-Aldrich, München
 Bruker, Bremen
 Sigma-Aldrich, München
 NEB, Ipswich, MA, USA
 Delicade, Riha-Hartinger, Wesergold Gruppe, Rinteln
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Bio-Rad, München
 Bio-Rad, München
 Bio-Rad, München
 Invitrogen, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, München
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, München
 Merck, Darmstadt
 Promega, Madison, WI, USA
 NEB, Ipswich, MA, USA
 Merck, Darmstadt

Anhang II:

FPLC-Elutionsprofile

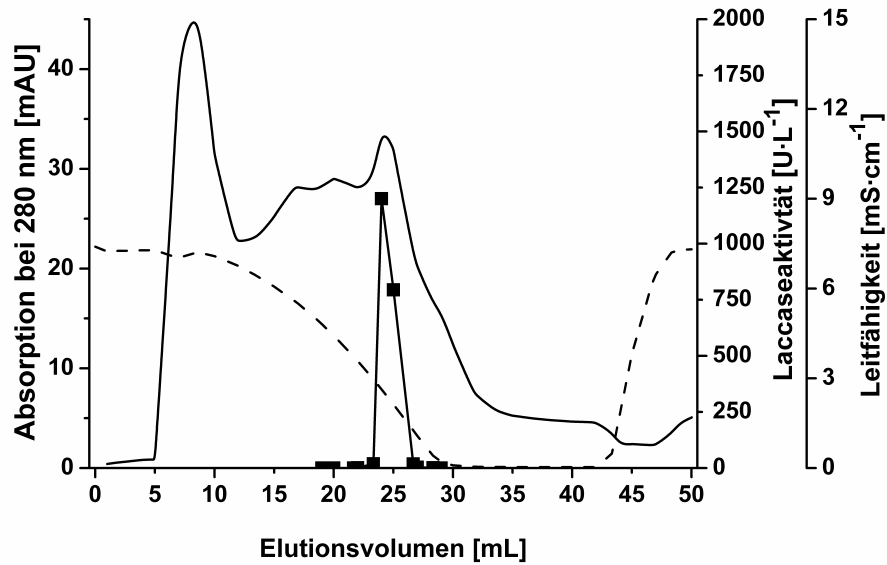


Abbildung II.1: FPLC-Elutionsprofil der Laccase von Stamm UHH 5-1-03 bei hydrophober Interaktionschromatografie. Proteinabsorption bei 280 nm (durchgehende Linie), (NH₄)₂SO₄-Gradient (gestrichelte Linie), Laccaseaktivität (■).

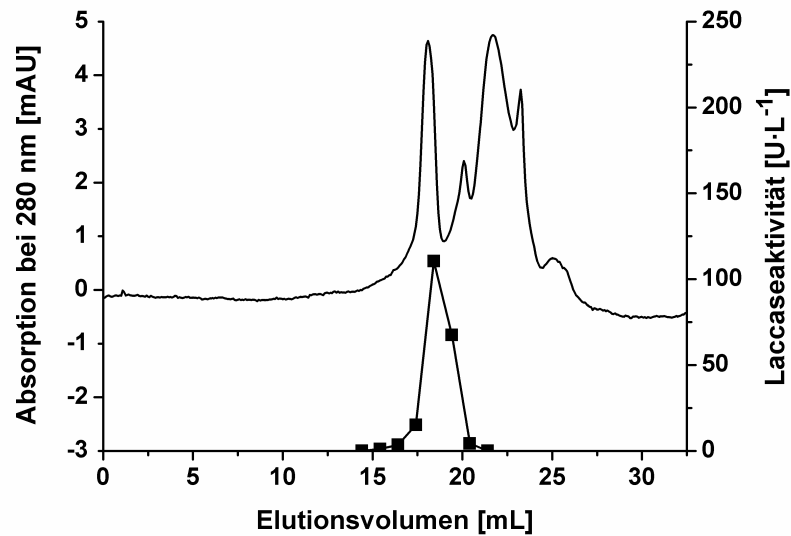


Abbildung II.2: FPLC-Elutionsprofil der Laccase von Stamm UHH 5-1-03 bei Größenausschlusschromatografie. Proteinabsorption bei 280 nm (durchgehende Linie), Laccaseaktivität (■).

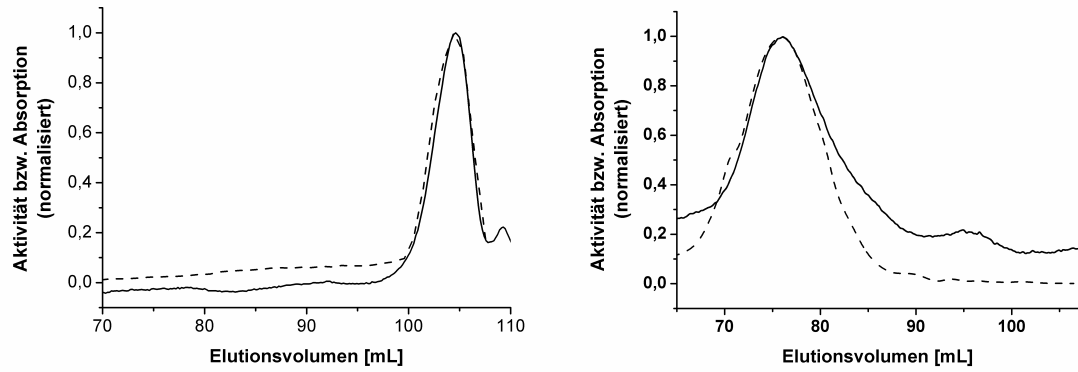


Abbildung II.3: FPLC-Elutionsprofil der Laccase von Stamm UHH 5-1-03 bei Größenausschlusschromatografie zum Nachweis der Dimerisierung des Enzyms. Links: Elution bei pH 6, rechts: Elution bei pH 3. Normalisierte Proteinabsorption bei 280 nm (durchgehende Linie), normalisierte Laccaseaktivität (gestrichelte Linie).

Anhang III:

Massenspektren von Metaboliten des Abbaus von Acid Blue 62

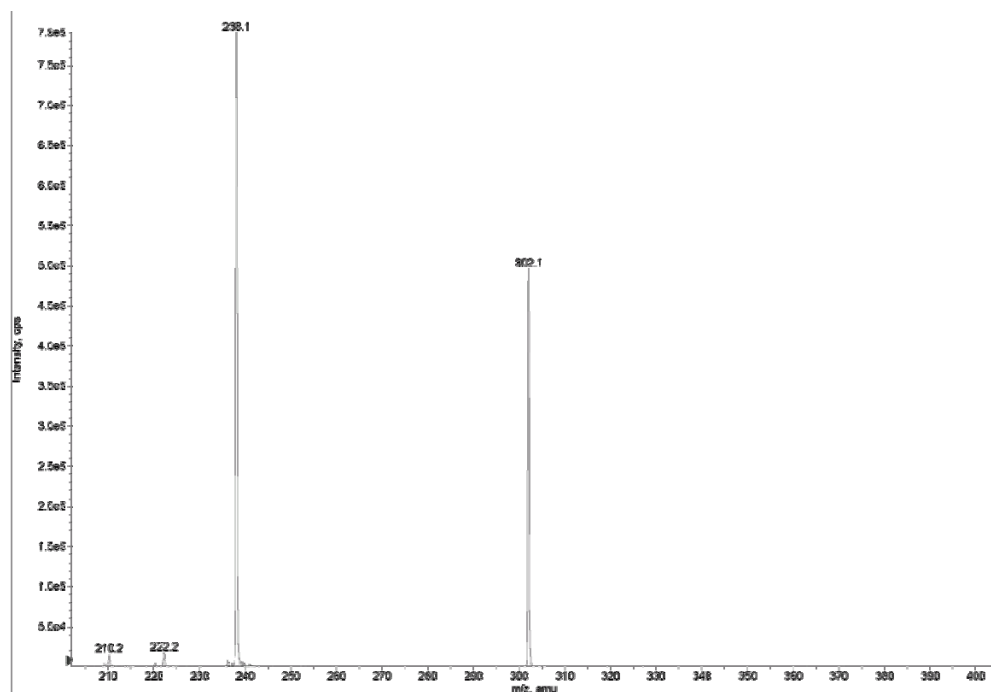


Abbildung III.1: Produktionsmassenspektrum des Metaboliten I (vgl. Tabelle 18) mit m/z 302 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

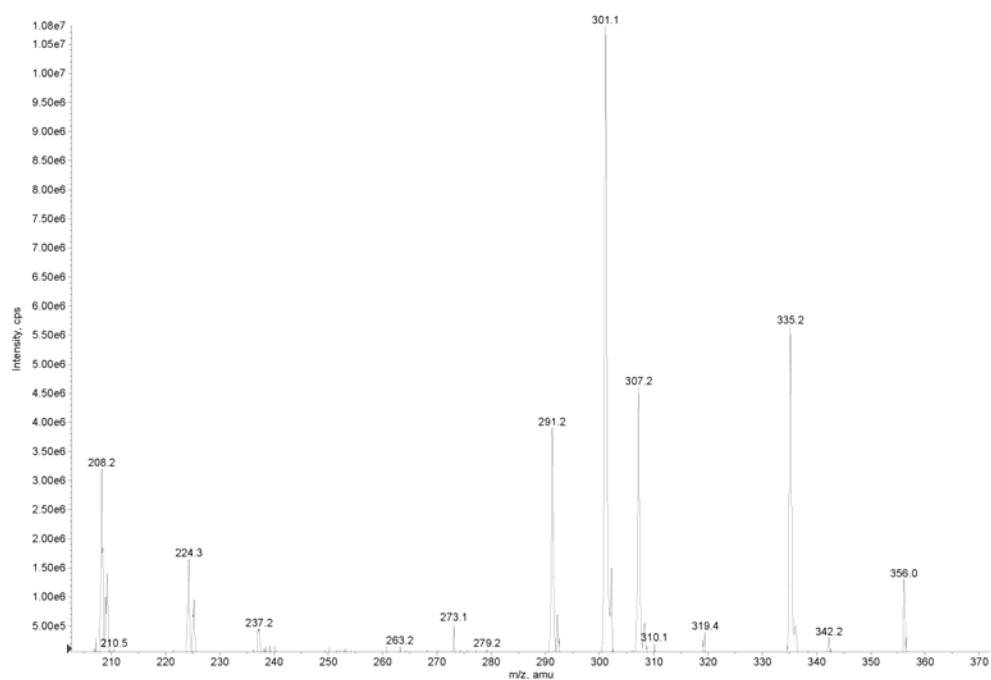


Abbildung III.2: Produktionsmassenspektrum des zweifach geladenen Metaboliten XI (vgl. Tabelle 18) mit m/z 356 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

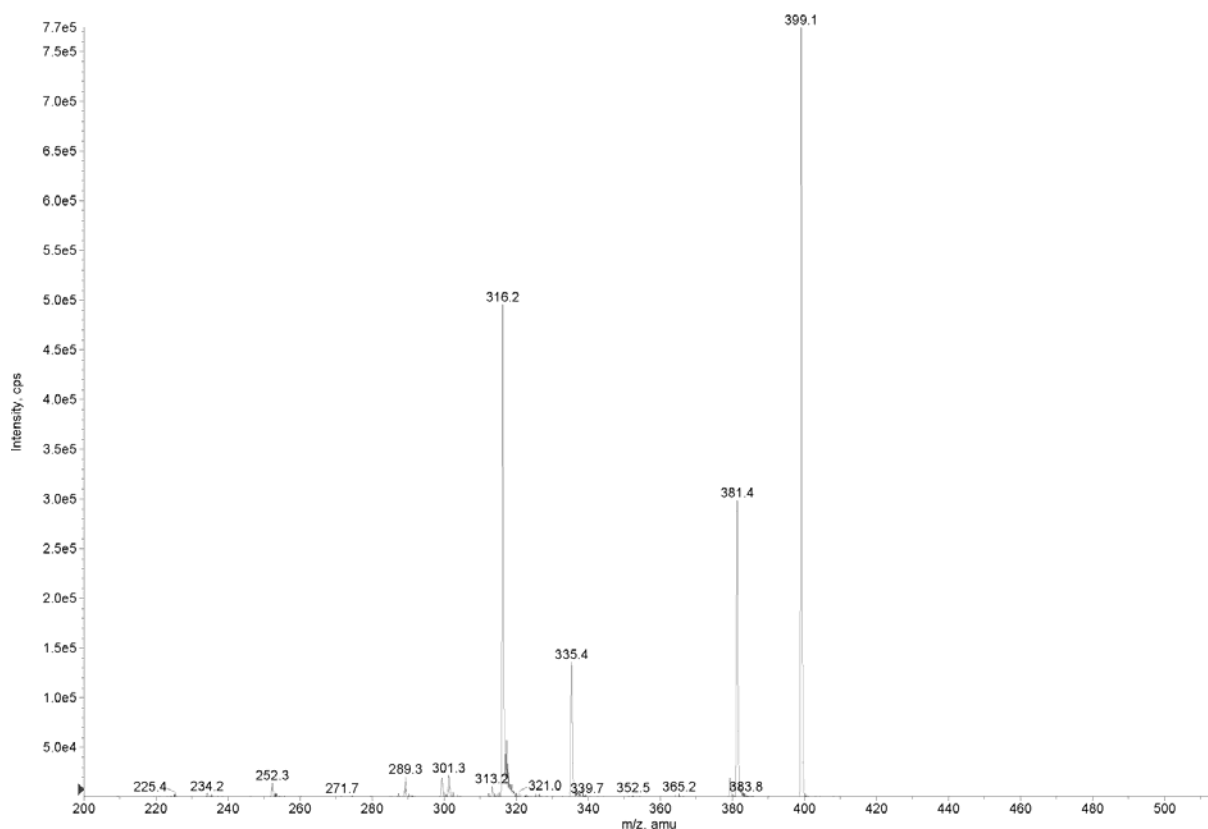


Abbildung III.3: Produktionsmassenspektrum von *Acid Blue 62* (vgl. Tabelle 18) mit m/z 399 nach LC-ESI-MS/MS.

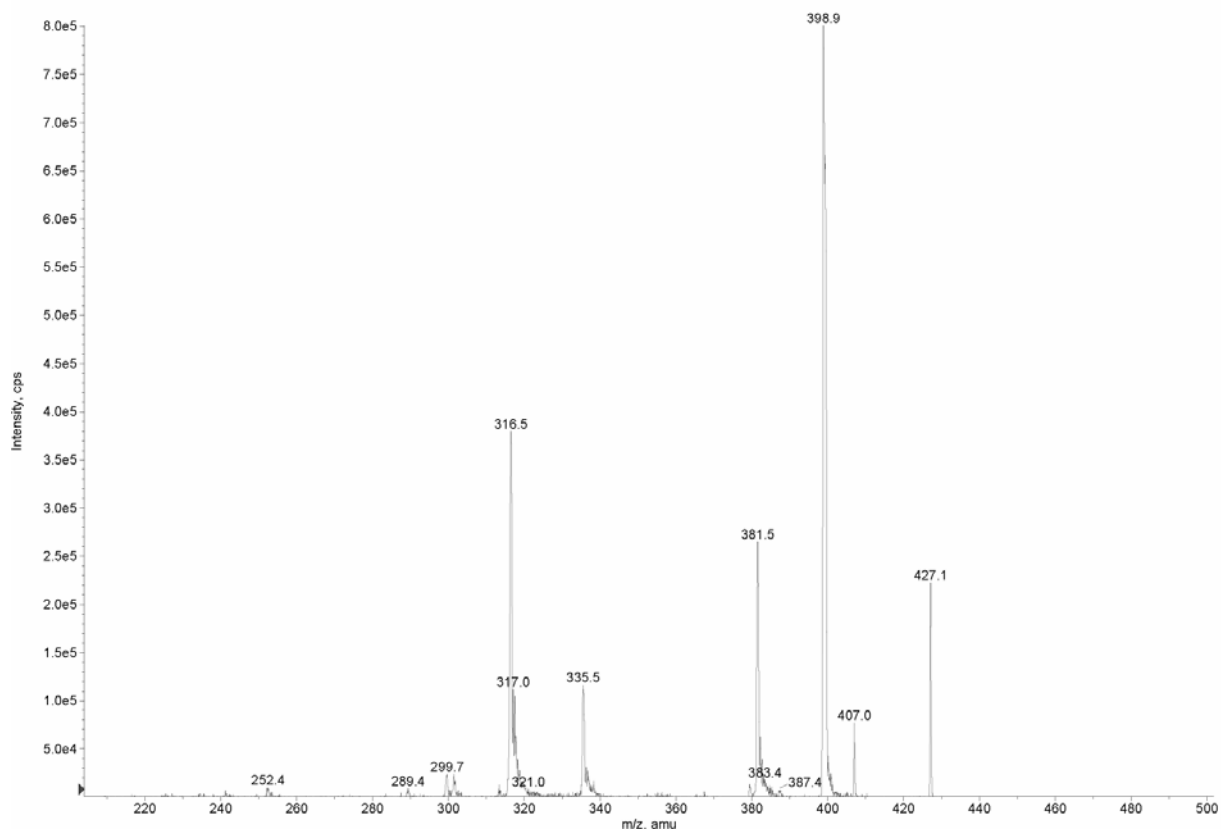


Abbildung III.4: Produktionsmassenspektrum des Metaboliten II (vgl. Tabelle 18) mit m/z 427 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

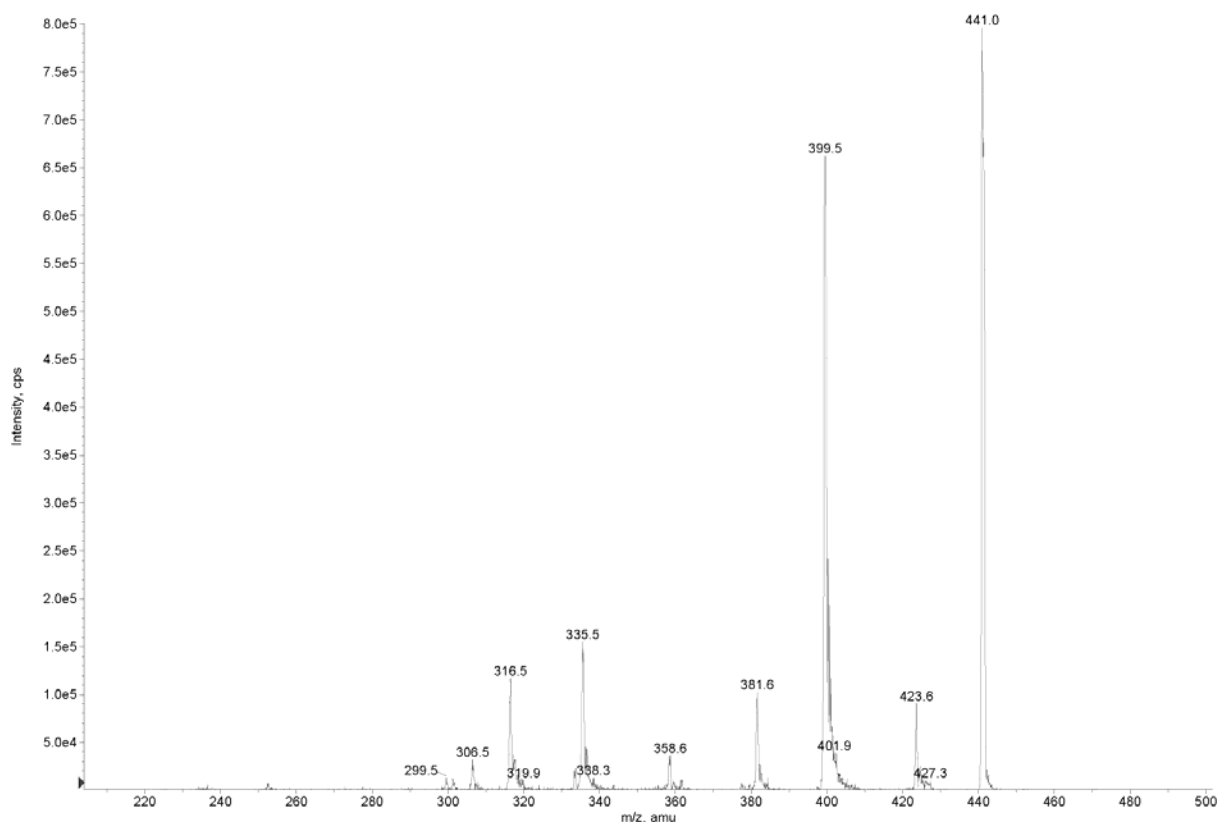


Abbildung III.5: Produktionsmassenspektrum des Metaboliten III (vgl. Tabelle 18) mit m/z 441 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABo62-Lösung.

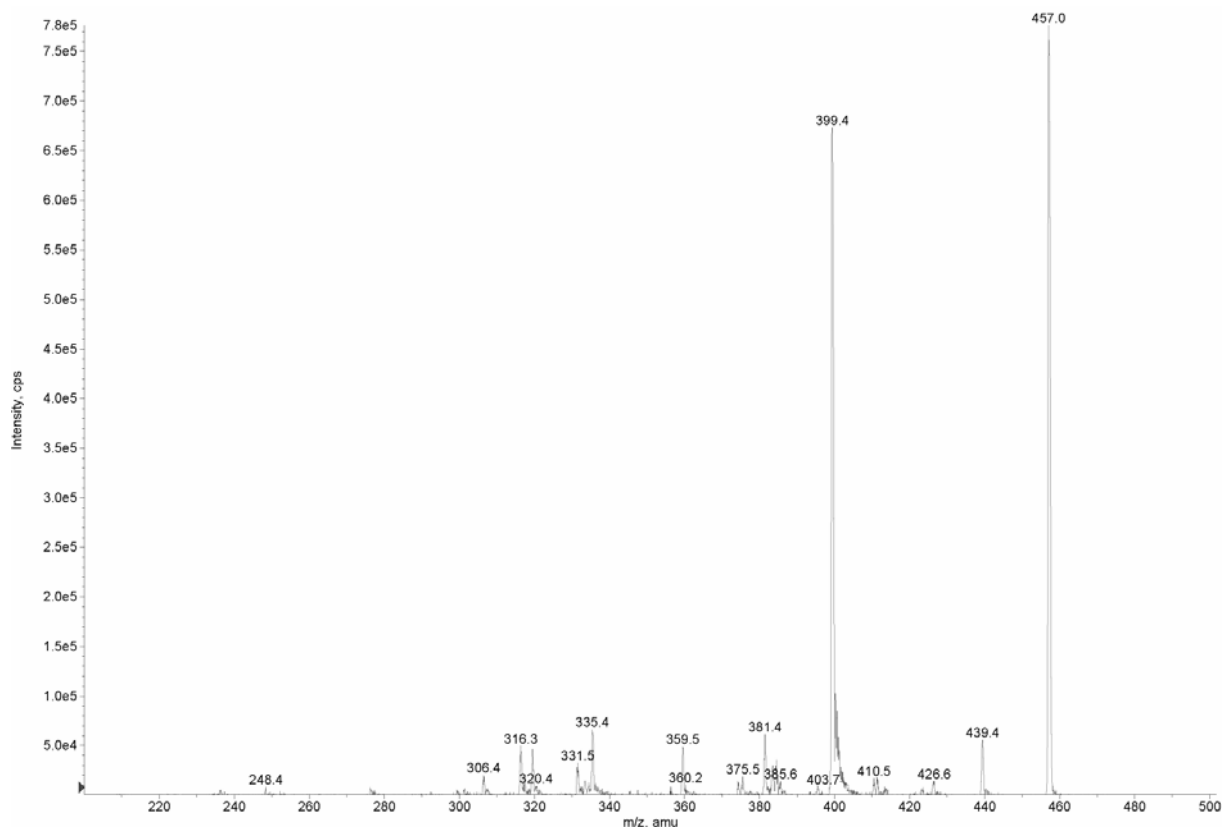


Abbildung III.6: Produktionsmassenspektrum des Metaboliten IV (vgl. Tabelle 18) mit m/z 457 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABo62-Lösung.

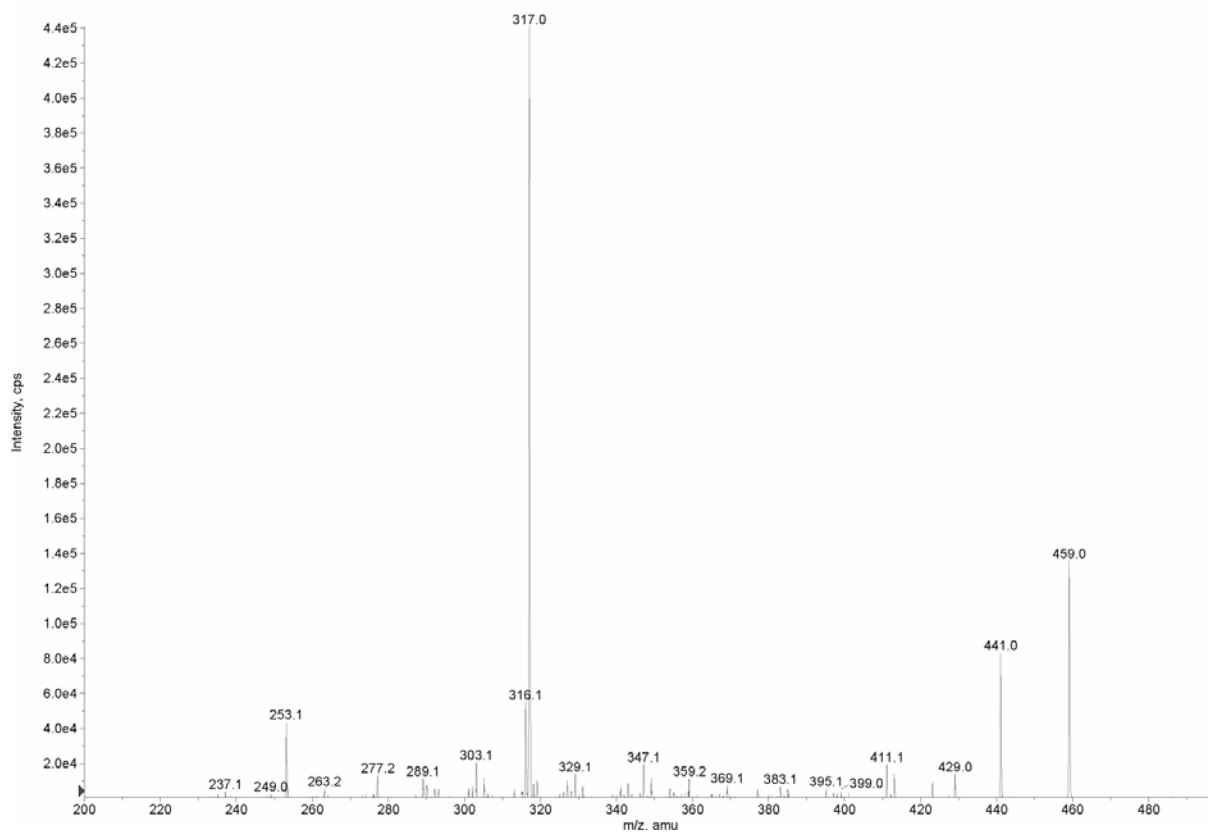


Abbildung III.7: Produktionenmassenspektrum des Metaboliten V (vgl. Tabelle 18) mit m/z 459 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

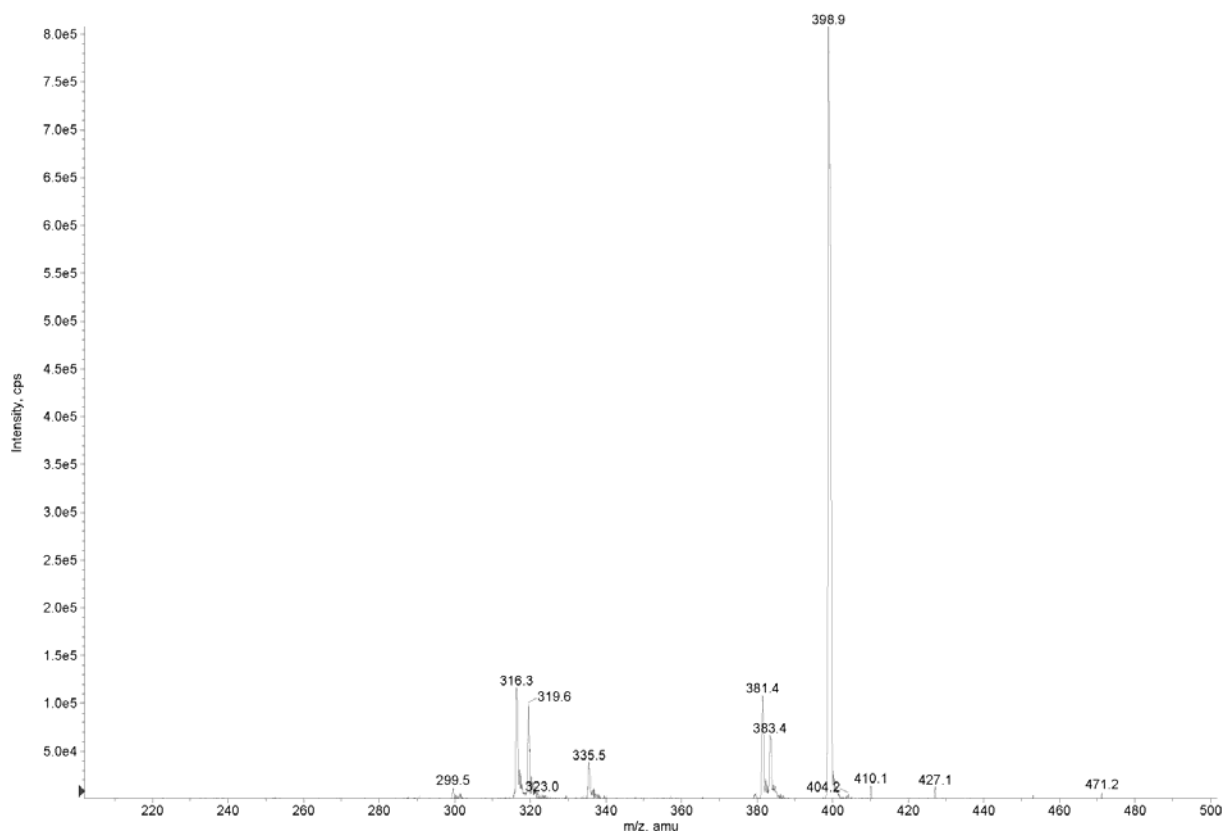


Abbildung III.8: Produktionenmassenspektrum des Metaboliten VI (vgl. Tabelle 18) mit m/z 471 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

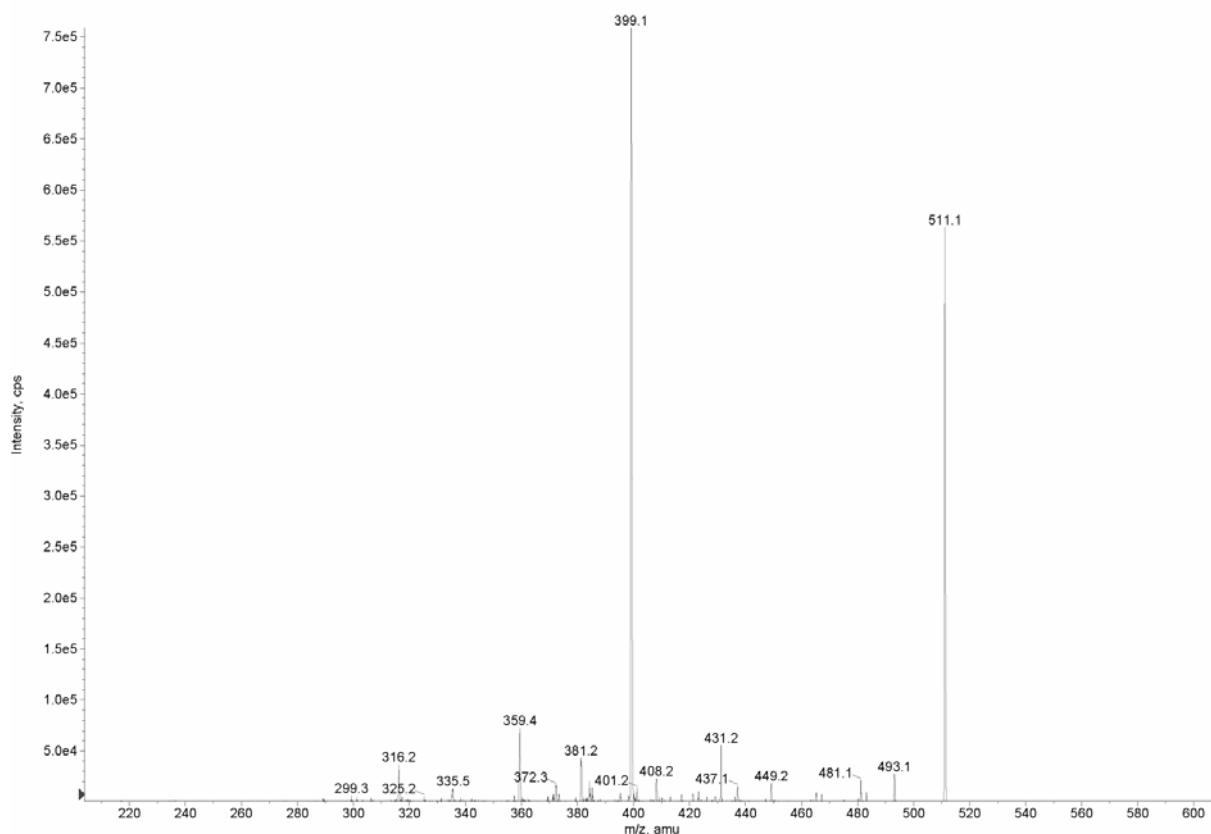


Abbildung III.9: Produktionenmassenspektrum des Metaboliten VII (vgl. Tabelle 18) mit m/z 511 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

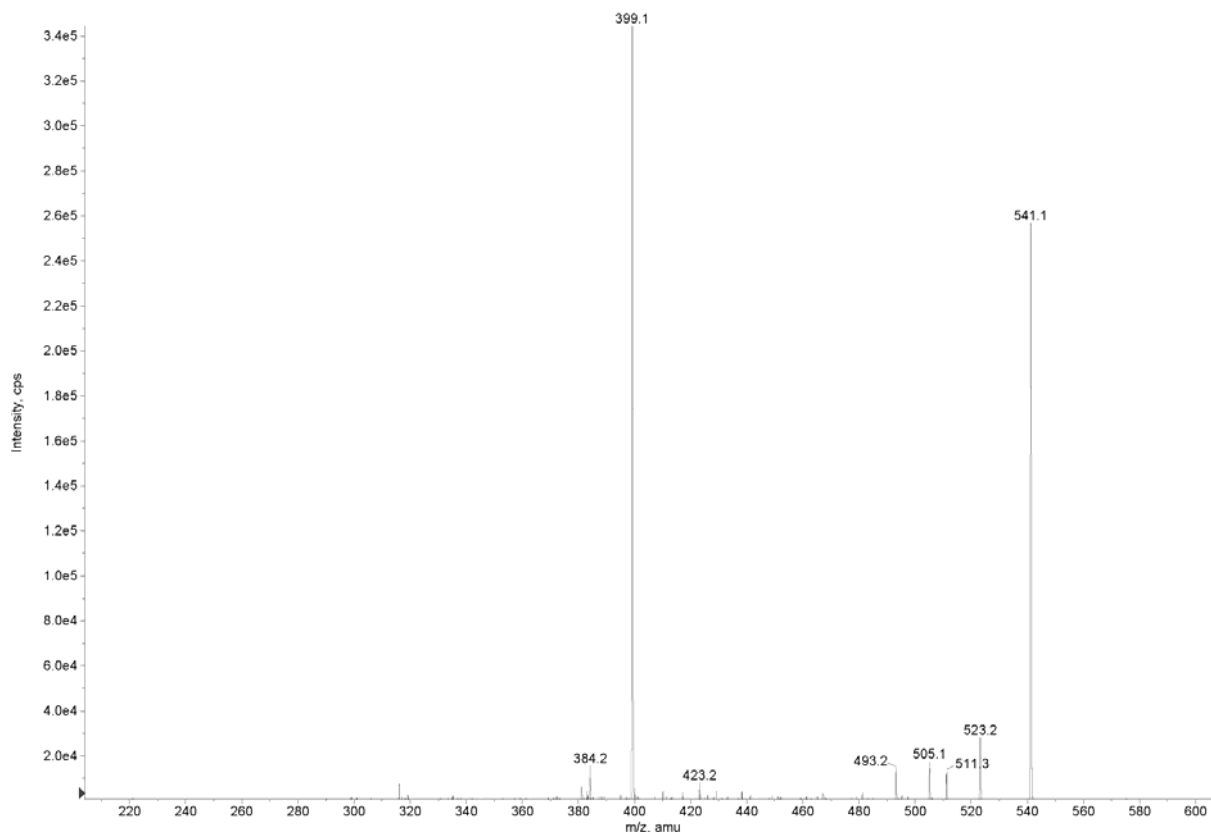


Abbildung III.10: Produktionenmassenspektrum des Metaboliten VIII (vgl. Tabelle 18) mit m/z 541 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

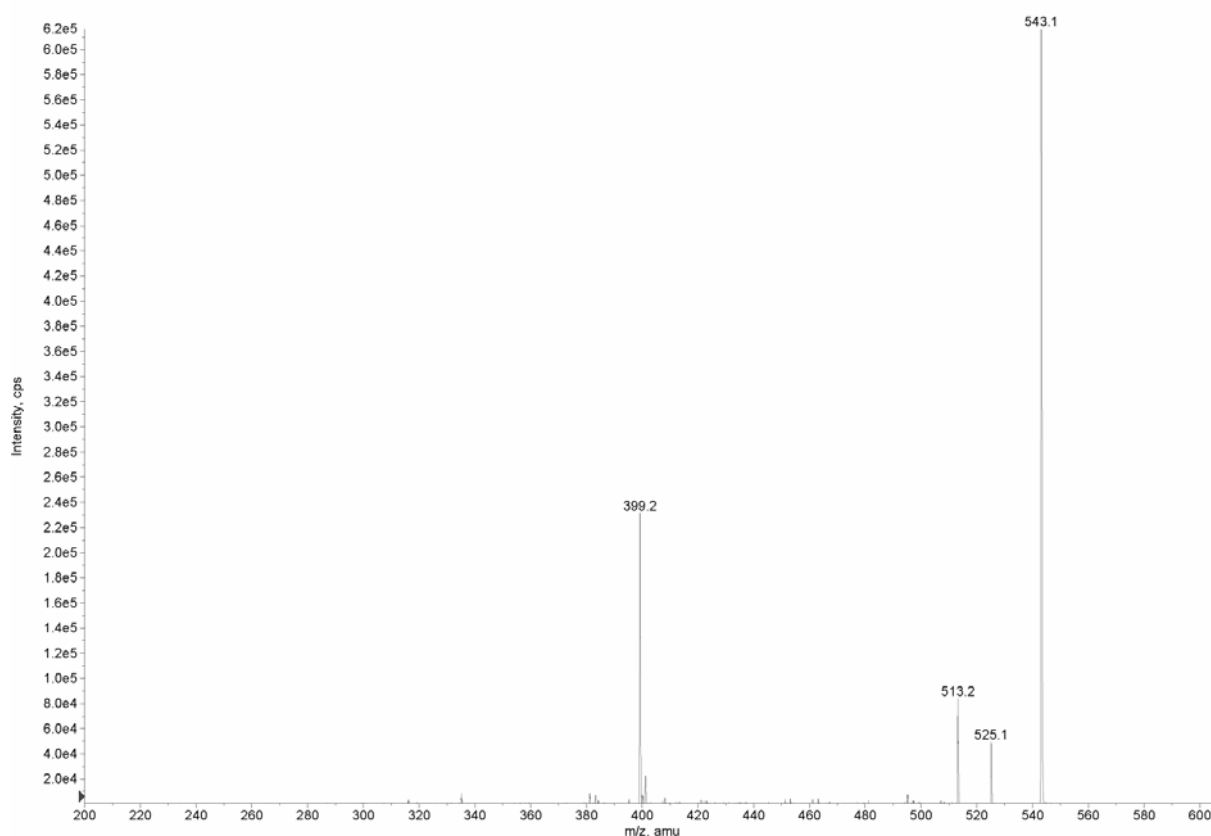


Abbildung III.11: Produktionenmassenspektrum des Metaboliten IX (vgl. Tabelle 18) mit m/z 543 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

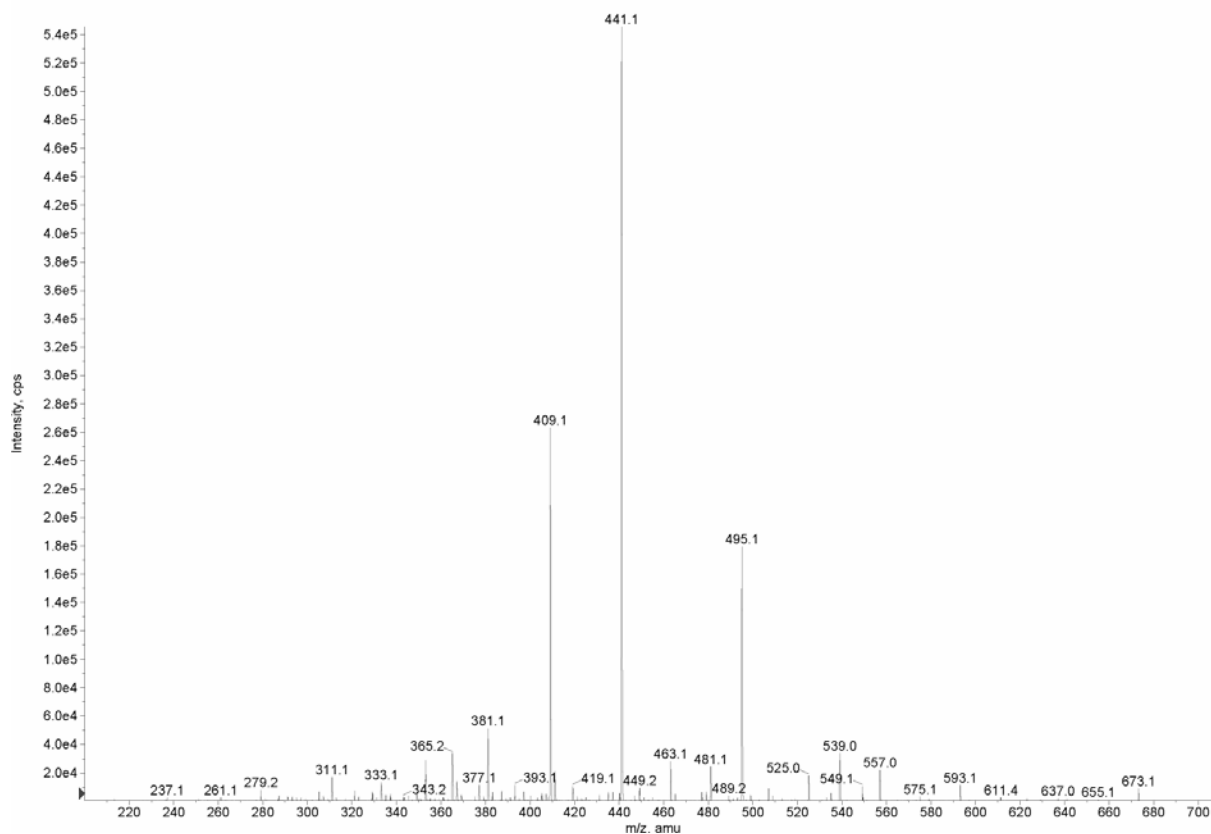


Abbildung III.12: Produktionenmassenspektrum des Metaboliten X (vgl. Tabelle 18) mit m/z 673 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

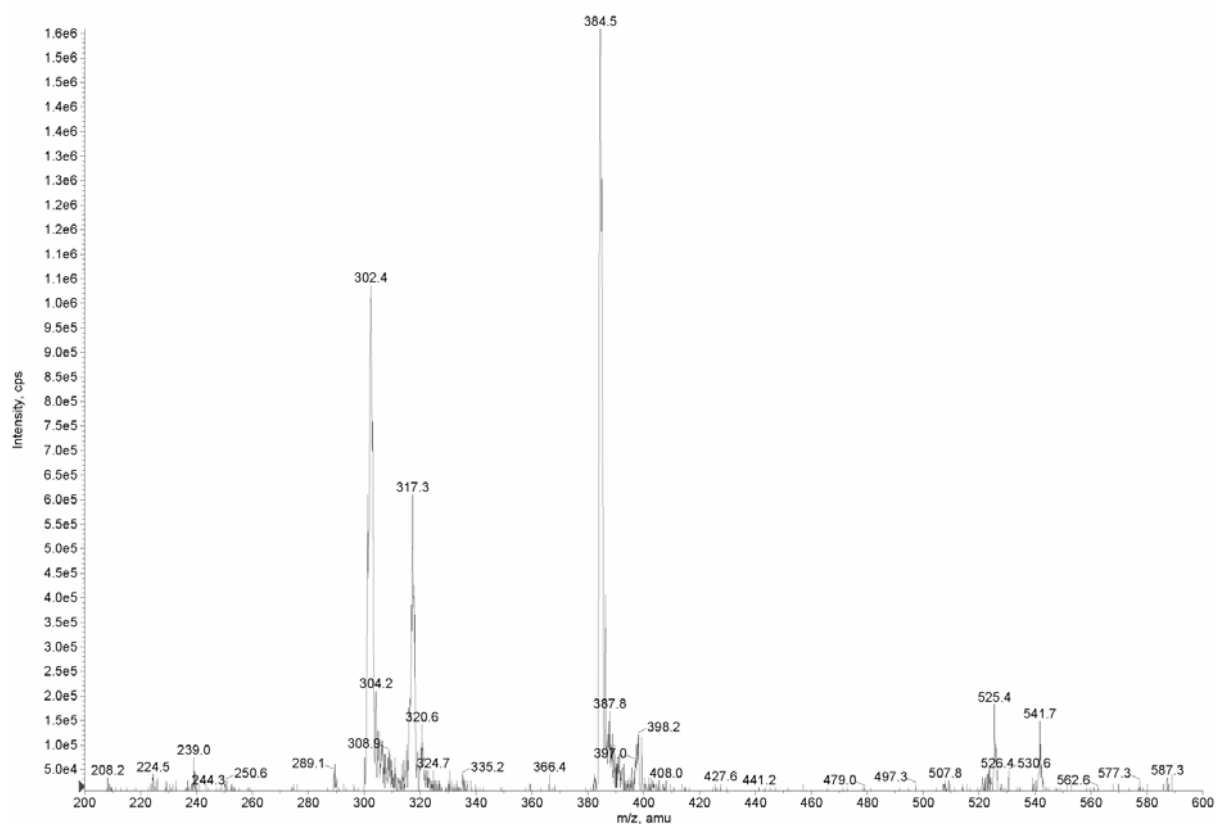


Abbildung III.13: Produktionsmassenspektrum des Metaboliten XI (vgl. Tabelle 18) mit m/z 713 nach LC-ESI-MS/MS einer behandelten ABu62-Lösung.

Anhang IV

Veröffentlichte Originalarbeit:

Junghanns C., Krauss G., Schlosser D. (2008) Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology* 99: 1225-1235.



Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes

Charles Junghanns, Gudrun Krauss, Dietmar Schlosser *

UFZ, Helmholtz Centre for Environmental Research, Department of Environmental Microbiology, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

Received 11 October 2006; received in revised form 12 February 2007; accepted 13 February 2007

Available online 27 March 2007

Abstract

A total of 37 strains of aquatic hyphomycetes and 95 fungal isolates derived from diverse freshwater environments were screened on agar plates for the decolourisation of the disazo dye Reactive Black 5 and the anthraquinone dye Reactive Blue 19. The decolourisation of 9 azo and 3 anthraquinone dyes by 9 selected aquatic fungi was subsequently assessed in a liquid test system. The fungi were representatives of mitosporic anamorphs, and 6 strains had proven ascomycete affiliations. For comparison, 5 white rot basidiomycetes were included. The majority of dyes were decolourised by several mitosporic aquatic isolates at rates essentially comparable to those observed with the most efficient white rot fungus. Under certain conditions, particular aquatic strains decolourised dyes even more efficiently than the best performing white rot basidiomycete. Upon fungal treatment of several dyes, new absorbance peaks appeared, indicating bio-transformation metabolites. All together, these results point to the potential of fungi occurring in freshwater environments for the treatment of dye-containing effluents.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anthraquinone dyes; Aquatic hyphomycetes; Ascomycetes; Azo dyes; Mitosporic fungi; Textile dyes

1. Introduction

The persistence of most synthetic dyes in textile industry effluents, their potentially hazardous effects on human health and the environment, and consequently public demands have led to strict environmental regulations. This has encouraged the development of efficient and cost-effective technologies to cope with the problems of effluent treatment (Pearce et al., 2003; Pinheiro et al., 2004). Considerable efforts have concentrated on the biological treatment of dye-containing waste waters. Azo (phenylazo-benzene) and anthraquinone structures are the major units used in the chromophores of dyes, where azo dyes account for the majority of direct dyes and also in general represent the most widely used dyes (Hao et al., 2000). Although numerous microorganisms can decolourise such dyes, only

a few of them are able to mineralise these compounds to CO₂ and H₂O. Different bacteria are able to efficiently anaerobically transform azo dyes, with the drawback of potentially generating toxic aromatic amines (Hao et al., 2000; Robinson et al., 2001).

White rot basidiomycetes represent the group of organisms most frequently considered for oxidative dye treatment, due to their outstanding capabilities in breaking down a great variety of different pollutants including synthetic dyes (Wesenberg et al., 2003). Dye decolourisation by white rot fungi may even involve mineralisation (Paszczynski et al., 1992). The ability of white rot fungi to attack a broad variety of different xenobiotics depends on a complex and relatively unspecific system which is active during lignin degradation. The major extracellular components of the ligninolytic system include the radical-generating enzymes laccase, manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase, and versatile peroxidase. All of them have been shown to act on certain dyes (Abadulla et al., 2000; Camarero et al., 2005; Champagne and Ramsay, 2005; Claus

* Corresponding author. Tel.: +49 341 235 32 54; fax: +49 341 235 22 47.

E-mail address: dietmar.schlosser@ufz.de (D. Schlosser).

et al., 2002; Heinfling et al., 1998; Martinez, 2002; Ollikka et al., 1993; Spadaro and Renganathan, 1994).

Fungi other than white rot basidiomycetes have gained considerably less attention, although the bleaching of synthetic dyes was demonstrated for filamentous ascomycetes, ascomycetous yeasts, mitosporic fungi (Forgacs et al., 2004; Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Lucas et al., 2006; Ramalho et al., 2004; Zheng et al., 1999), and for laccases from filamentous ascomycetes (Chivukula and Renganathan, 1995; Claus et al., 2002).

Aquatic ecosystems represent an as yet only scarcely explored source of new fungi that are possibly more suitable than other organisms for the treatment of certain waste waters since the living conditions and hence possible organismic adaptations found there may better fit any unfavourable characteristics of process effluents, especially with respect to high contents of inorganic ions found in both aquatic environments and industrial dye-containing effluents (D'Souza et al., 2006; Krauss et al., 2003; Pophali et al., 2003). The fungal species diversity in freshwater ecosystems is high. The polyphyletic aquatic hyphomycetes (Ingoldian fungi) cover more than 300 species and represent a group of mitosporic fungi specifically adapted to aquatic environments where they colonise organic matter arising from riparian vegetation. About 10% of them have been connected to sexual stages, with the majority of known teleomorphs belonging to the ascomycetes and about 10% to the basidiomycetes (Krauss et al., 2003; Nikolcheva et al., 2003; Webster, 1992). Besides exclusively aquatic hyphomycetes, other taxonomically diverse mitosporic fungi, ascomycetes, basidiomycetes, chytridiomycetes, and zygomycetes are also found in freshwater ecosystems (Bucher et al., 2004; Junghanns et al., 2005; Nikolcheva and Bärlocher, 2004). The ability of fungi derived from aquatic ecosystems to act on recalcitrant compounds has only rarely been explored.

This study intended to assess the potential of fungal strains newly isolated from diverse freshwater environments, as well as aquatic hyphomycetes and other non-

basidiomycete aquatic isolates available from our strain collection, for the decolourisation of nine azo and three anthraquinone type textile dyes representing different dye application modes (acid, direct, disperse, and reactive dyes). Different white rot basidiomycetes were included for comparison.

2. Methods

2.1. Chemicals

Dyes were provided by different suppliers as listed in Table 1. A penicillin–streptomycin formulation was purchased from Sigma–Aldrich (Munich, Germany). All other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Dyes were of industrial grade, and all other chemicals were of analytical grade.

2.2. Source, identification and maintenance of fungal strains

The major number of fungi were newly isolated from different surface waters (Table 2). A total of 16 strains were obtained from water samples taken from different sites of the river Saale at the city of Halle, Saxony-Anhalt (UHH sites), following a procedure previously described (Junghanns et al., 2005). The coordinates of the Saale sites UHH 1 and UHH 5, according to the cartographic Transverse Mercator (Bessel) system, were 4496251 (x) and 5707444 (y) for UHH 1 and 4494397 (x) and 5709948 (y) for UHH 5. Water samples from sites UHH 1 and UHH 5 had a pH of 7.0 and 7.9, respectively. Chloride and sulfate concentrations of 0.18 and 0.34 g l⁻¹ (UHH 1) and 0.14 and 0.28 g l⁻¹ (UHH 5), respectively, were determined. Three other sites, all located in Saxony-Anhalt (Central Germany), were chosen for the isolation of fungi because of their high salinity arising from the rock salt deposits in the region. A saline spring in Kloschwitz (site K1; x and y coordinate 4483154 and 5717108, respectively), district Saalkreis, is used as a spa. In water samples of the

Table 1
Synthetic dyes applied within the present study and their suppliers

Dye	Abbreviation	Structure	CI ^a or CAS ^b number	Supplier
Acid Blue 62	NY3	Anthraquinone	62045	Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland
Acid Red 299	NY1	Disazo	12220-29-0 ^c	Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium
Direct Black 38	CB	Trisazo	30235	Sigma, Munich, Germany
Direct Blue 1	CSB	Disazo	24410	Sigma, Munich, Germany
Direct Red 28	CR	Disazo	22120	Aldrich, St. Louis, MO, USA
Disperse Blue 1	DB1	Anthraquinone	64500	Fluka, Buchs, Switzerland
Disperse Red 1	DR1	Monoazo	11110	Fluka, Buchs, Switzerland
Disperse Yellow 3	DY3	Monoazo	11855	Fluka, Buchs, Switzerland
Reactive Black 5	RB5	Disazo	20505	Sigma–Aldrich, Munich, Germany
Reactive Blue 19	RBBR	Anthraquinone	61200	Acros Organics, Geel, Belgium
Reactive Red 4	RR4	Monoazo	180105	Sigma–Aldrich, Munich, Germany
Reactive Yellow 81	RY81	Monoazo	59112-78-6 ^c	Aldrich, St. Louis, MO, USA

^a CI: colour index.

^b CAS: chemical abstracts service.

^c CAS number.

Table 2
Fungal strains used within the present study

Fungal strains ^a	Numbers of strains used	Supplier or site of isolation
Aquatic hyphomycetes		
<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	2	UFZ culture collection ^b
<i>Anguillospora longissima</i> (Sacc. et Syd.) Ingold	2	UFZ culture collection ^b
<i>Clavariopsis aquatica</i> De Wild. WD(A)-00-01	1	UFZ culture collection ^b
<i>Clavariopsis aquatica</i> De Wild.	1	UFZ culture collection ^b
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	5	UFZ culture collection ^b
<i>Dimorphospora foliicola</i> Tubaki	1	UFZ culture collection ^b
<i>Flagellospora curvula</i> Ingold	1	UFZ culture collection ^b
<i>Heliscus lugdunensis</i> Sacc. et Théry	12	UFZ culture collection ^b
<i>Lemonniera alabamensis</i> Sinclair et Morgan-Jones	1	UFZ culture collection ^b
<i>Lemonniera aquatica</i> De Wild.	2	UFZ culture collection ^b
<i>Tetracladium marchalianum</i> De Wild.	2	UFZ culture collection ^b
<i>Tetracladium setigerum</i> (Grove) Ingold	2	UFZ culture collection ^b
<i>Tricladium angulatum</i> Ingold	2	UFZ culture collection ^b
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	2	UFZ culture collection ^b
<i>Varicosporium</i> sp. SpW08-1	1	UFZ culture collection ^b
Other aquatic mitosporic isolates		
<i>Alternaria</i> sp. Tt-S1	1	Site Tt (Teutschenthal)
<i>Coniothyrium</i> sp. Kl-S5	1	Site Kl (Kloschwitz)
<i>Cylindrocarpon didymum</i> (Hartig) Wollenweber P10-10-3	1	UFZ culture collection ^b
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	1	UFZ culture collection ^b
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-6-18-4	1	Site UHH 1 (Saale river)
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4	1	Site UHH 1 (Saale river)
<i>Phoma</i> sp. SaSe-B6	1	Site SaSe (lake Salziger See)
<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	1	Site UHH 5 (Saale river)
Unidentified aquatic isolates	86	Sites Kl, SaSe, Tt, UHH 1, UHH 5
White rot basidiomycetes		
<i>Coriopsis polyzona</i> (Persoon) Ryvarden MUCL 38443	1	BCCM/MUCL ^c
<i>Hypoloma fasciculare</i> (Hudson:Fries) Kummer UHH 1-4-03	1	Site UHH 1 (Saale river)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (Linnaeus:Fries) Murrill MUCL 38531	1	BCCM/MUCL ^c
<i>Stropharia rugosoannulata</i> Farlow ex Murrill DSM 11372	1	DSMZ ^d
<i>Trametes versicolor</i> (Linnaeus:Fries) Pilát DSM 11269	1	DSMZ ^d

^a Strain designations are only given for strains investigated in more detail (Table 5).

^b Culture collection of the Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany.

^c BCCM/MUCL, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Mycothèque de L'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.

^d DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Brunswick, Germany.

site Kl, a pH of 9.1, and chloride and sulfate concentrations of 0.66 and 0.26 g l⁻¹, respectively, were determined. A pond near Teutschenthal, district Saalkreis (site Tt; *x* and *y* coordinate 4483469 and 5704181, respectively), arises from a former clay pit, where a pH of 7.7, and chloride and sulfate concentrations of 20.80 and 5.33 g l⁻¹, respectively, were found in the water samples. The lake Salziger See (site SaSe; *x* and *y* coordinate 4477590 and 5704109, respectively) is located in the district Mansfelder Land. Water samples of site SaSe showed a pH of 8.0 and contained chloride and sulfate ions at 2.58 and 1.08 g l⁻¹, respectively. Water samples from these saline surface waters were used for the isolation of fungi as described previously (Junghanns et al., 2005). Sediment samples (10 g) taken from the upper 2 to 3 cm of sediment layers were shaken together with 7.5 g glass beads in 100 ml of sterile 0.2% (w/v) sodium pyrophosphate solution for 30 min at room temperature and 130 rpm. After sedimentation of the solid particles, aliquots (150 µl) from serial dilutions of the supernatants were poured onto penicillin- and streptomycin-containing malt agar plates (Junghanns et al., 2005).

Pieces of decaying plant debris, that were sometimes contained in sediment samples, were directly placed onto penicillin- and streptomycin-containing malt agar plates. Agar plates were incubated at 14 °C for several days, and pure cultures were obtained by transferring single colonies and segments of developing mycelia onto fresh agar plates. A total of 77 strains were isolated from water, decaying plant debris, and sediment samples. Promising newly isolated strains were sent to the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Mycothèque de L'Université catholique de Louvain (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgium) and, where indicated in the text, also to the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (Utrecht, The Netherlands), for identification.

The aquatic hyphomycetes listed in Table 2 were derived from the culture collection of the Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ (further on referred to as UFZ

culture collection). In addition, a strain of the ubiquitous mould *Epicoccum nigrum* Link and the facultative aquatic fungus *Cylindrocarpon didymum* (Hartig) Wollenweber strain P10-10-3 also isolated from aquatic environments and available from the UFZ culture collection were included. According to the results described in the text, we only focus here on the aquatic hyphomycete strains *Clavariopsis aquatica* WD(A)-00-1, *Varicosporium* sp. SpW08-1, and the mitosporic fungus *C. didymum* P10-10-3 in more detail. The isolation of *C. aquatica* strain WD(A)-00-1 from the tar oil-contaminated brook Steinbach near Waldau (site WD(A); x and y coordinate 4494638 and 5657991, respectively) and its identification has been previously described (Junghanns et al., 2005). A pH of 7.2 and chloride and sulfate concentrations of 0.07 and 0.25 g l⁻¹, respectively, were determined in water samples from the site WD(A). *Varicosporium* sp. SpW08-1 was derived from the brook Spittelwasser near Jessnitz (site SpW; x and y coordinate 4520134 and 4731439, respectively), which is contaminated with chlorinated hydrocarbons arising from former industrial activities in the region of Bitterfeld and Wolfen (Saxony-Anhalt, Central Germany). Water samples from the site SpW showed a pH of 6.9 and chloride and sulfate concentrations of 0.22 and 0.52 g l⁻¹, respectively. *C. didymum* P10-10-3 originates from a groundwater well (site P10; x and y coordinate 4465782 and 5712267, respectively) in the former copper shale mining district Mansfelder Land, Central Germany, where high concentrations of heavy metals contaminate the groundwater (Krauss et al., 2003). A pH of 7.0 and chloride and sulfate concentrations of 0.07 and 1.5 g l⁻¹, respectively, were determined in water samples from the site P10. *Varicosporium* sp. SpW08-01 and *C. didymum* P10-10-3 were isolated from alder leaves exposed at the respective site of isolation for 4 weeks as previously described (Junghanns et al., 2005). Fungi were identified based on their characteristic spore shape by G. Krauss (UFZ) and L. Marvanová (Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic).

The wood-inhabiting and litter-decaying white rot basidiomycetes used for comparison and their suppliers are listed in Table 2.

Fungi were maintained at 14 °C (prior to agar plate screening) and 28 °C (for testing of dye decolourisation in liquid systems) on agar plates containing 1% (w/v) malt extract and 1.5% agar. For isolates derived from sites Tt, Kl, and SaSe (high salinity sites), solid agar media were prepared with water from the respective site (instead of distilled water) that had been sterilised by filtration prior to use.

2.3. Determination of physico-chemical parameters of waters at the isolation sites

The pH of the surface water at the different isolation sites was directly measured in the field, using a WTW

MultiLine P4 pocket multimeter (WTW, Weilheim, Germany). Samples were transferred to the laboratory at a temperature of 4 °C, using sterile brown glass bottles. Chloride and sulfate concentrations in the water samples were measured using a Dionex (Sunnyvale, CA, USA) ICS2000 ion chromatograph. Ion determinations measurements were conducted in triplicate, and standard deviations were all below 3.5%.

2.4. Dye decolourisation on agar plates

Agar plates containing 1% malt extract and 1.5% agar were supplemented with RBBR and RB5 at 0.1 mM, respectively. The decolourisation of dyes was followed by monitoring the formation of decolourised zones under and around developing mycelia. Strains with visible binding of dyes to the mycelia were not taken into account. For isolates derived from sites Tt, Kl, and SaSe (high salinity sites), solid agar media were prepared using water from the sites as described above. Plates were inoculated by placing one agar plug derived from the edge of well-grown fungal cultures on agar plates into the center of a plate and were incubated at 14 °C, in the dark. This temperature was found to be more favourable than higher temperatures for the growth of the majority of the aquatic isolates. The decolourisation of RBBR and RB5 was followed over a period of 30 days. All agar plate assays were done in duplicate.

2.5. Dye decolourisation in liquid systems

Fungi were incubated in the presence of dyes in round bottom 96-well polystyrene plates (Nunc, Neerijse, Belgium). Tyndallised dyes (1 h at 60 °C, 24 h interval, 3 cycles) were dissolved in previously autoclaved liquid 2% (w/v) malt extract medium (pH 5.6–5.8) at concentrations of 0.15, 0.3, 0.6, and 1.0 g l⁻¹, respectively. The wells of the plates were filled with 200 µl of malt extract medium containing the respective dye. For each fungus, dye, and concentration, 4 wells were inoculated with an agar plug (3 mm diameter) derived from the edge of well-grown fungal cultures on agar plates, whereas two wells remained uninoculated and served as controls. Preceding control experiments employing sterile agar plugs (instead of mycelium containing ones) revealed that decolourisation upon uptake of dyes by the agar was less than 5% within 1 week for all dyes. Inoculated 96-well plates were incubated at 120 rpm and 28 °C in the dark. A temperature of 28 °C, frequently employed in dye decolourisation studies using white rot fungi (Kasinath et al., 2003; Karapinar and Kargi, 2002), was chosen to provide comparable conditions for all strains. After 7 days, fungal mycelia were removed, plates were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and aliquots of the supernatants were transferred into new 96-well plates and diluted as necessary for absorbance reading. Absorbance determinations were carried out on a GENios+ microplate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) at

405 nm (DY3, RY81), 492 nm (DR1, CR), 520 nm (NY1, RR4), 590 nm (NY3, RBBR, RB5, CB), 600 nm (DB1), and 620 nm (CSB). The colour removal is expressed as % decolourisation according to $(A_C - A_A)/A_C \times 100$, where A_C and A_A are the absorbances measured in control and active (inoculated) wells, respectively. The 95% confidence intervals of colour removal as obtained from 4 parallel decolourisation assays per dye, concentration, and fungus were below 10% for 71% of all of the decolourisation tests performed and below 15% for 86% of all tests, whereas a higher variability was observed for the remaining 14% of the different dye treatments. Student's *t* test was applied to prove the significance of decolourisation results where indicated in the text.

For examination of dye spectra after fungal treatment for 7 days, samples from 4 corresponding inoculated wells containing the respective dye at 1.0 g l^{-1} were combined. Spectra were recorded over a wavelength range from 325 to 750 nm using a Hitachi (Schaumburg, IL, USA) U-2001 two-beam spectrophotometer, and compared with those of samples derived from uninoculated wells (controls).

3. Results

3.1. Identification of newly isolated strains

Due to their ability to decolourise the textile dyes described in the text (Table 5), strains UHH 1-6-18-4, UHH 1-13-18-4, UHH 1-4-03, UHH 5-1-03, Kl-S5, Tt-S1, and SaSe-B6 (Table 2) were submitted to BCCM/MUCL for identification. According to sequencing of the ITS region and the 5'-end of the 28S rDNA, the isolates UHH 1-6-18-4 and UHH 1-13-18-4 are different strains of the same species and belong to the family *Helotiaceae*, *Ascomycota*. The absence of teleomorph states prevented a more precise identification. In culture, strains UHH 1-6-18-4 and UHH 1-13-18-4 produce phialidic anamorphs with rather small ($4 \times 3 \mu\text{m}$), globose conidia, and could be related to the genera *Myrioconium* Syd. or *Phialophora* (Junghanns et al., 2005). We tentatively refer to these fungi as *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 and *Myrioconium* sp. UHH 1-6-18-4. Strain UHH 5-1-03 represents a coelomyc-

etous anamorph that can be assigned to the genus *Phoma* Sacc., as additionally confirmed at CBS. Sequencing of the ITS region, the 5'-end of the 28S, and the 18S rDNA done at BCCM/MUCL revealed an ascomycete of the order *Pleosporales*, showing homology with sequences of *Leptosphaeria* Ces. et De Not. species. A teleomorph state was not obtained in culture. We tentatively refer to this strain as *Phoma* sp. UHH 5-1-03. Sequencing of 18S and 28S regions of the rDNA pointed to *Arthopyrenia salicis* A. Massalongo (*Ascomycota*, *Pleosporales*, *Arthopyreniaceae*) for the isolate Kl-S5, which produces an coelomycetous anamorph with pycnidia-born, pale brown, ellipsoid conidia in culture. The anamorph of *A. salicis* is apparently unnamed and could be classified into the genera *Coniothyrium* Corda or *Microsphaeropsis* Höhn. We tentatively refer to the isolate Kl-S5 as *Coniothyrium* sp. Kl-S5. Strain Tt-S1 was identified as a species of *Alternaria* Nees and could not be identified further. The isolate SaSe-B6 produces an anamorph state belonging to the genus *Phoma*, with an ITS region showing 100% identity to an ascomycete of the *Dothideales* Lindau group. The isolate UHH 1-4-03 was identified as *Hypholoma fasciculare* (Hudson:Fries) Kummer, thus representing a basidiomycete belonging to the *Strophariaceae*, *Agaricales*, and most likely originated from the riparian zone.

3.2. Dye decolourisation on agar plates

A total of 37 aquatic hyphomycete strains representing 14 different species and two ubiquitous mitosporic fungi derived from the UFZ culture collection, 16 strains newly isolated from the river Saale, and a total 77 strains of aquatic fungi isolated from three high salinity sites in Central Germany (25, 28, and 24 strains from the sites Kl, SaSe, and Tt, respectively) were screened for their ability to decolourise the anthraquinone type dye RBBR and the diazo type dye RB5. The numbers of strains causing either partial or full decolourisation of dye-containing agar plates within 30 days are summarised in Table 3. In some additional strains, not shown in Table 3, pigment production hampered the unambiguous detection of dye decolourisation. The aquatic hyphomycetes *A. longissima* (2 strains),

Table 3
Numbers of aquatic hyphomycetes and other aquatic isolates showing dye decolourisation on agar plates within 30 days

Strains and origin	Numbers of strains decolourising						
	Only RBBR		Only RB5		Both RBBR and RB5		
	Partly	Fully	Partly	Fully	Partly	Fully	RBBR fully, RB5 partly
<i>Aquatic hyphomycetes</i>							
UFZ culture collection	8	None	2	None	2	None	None
<i>Other aquatic isolates</i>							
Site Kl (Kloschwitz)	3	None	None	None	2	None	1
Site SaSe (lake Salziger See)	1	2	None	None	5	5	5
Site Tt (Teutschenthal)	2	None	3	None	5	None	5
UFZ culture collection	1	None	None	None	1	None	None
UHH sites (river Saale)	3	None	1	None	2	None	None

Table 4
Numbers of aquatic isolates corresponding to different ranges of dye decolourisation after fungal dye treatment for 7 days^a

Decolourisation range (%)	Dye concentration (mg l ⁻¹)	Numbers of strains decolourising											
		Acid dyes		Disperse dyes			Reactive dyes				Direct dyes		
		NY3	NY1	DB1	DR1	DY3	RBBR	RB5	RR4	RY81	CR	CSB	CB
≥80	300	4	None	None	None	None	2	1	None	None	None	2	None
60–79		3	None	1	1	3	1	2	2	1	7	6	7
40–59		5	5	6	6	6	None	4	2	2	6	5	3
20–39		6	8	7	7	4	1	7	2	8	5	6	7
<20		3	6	3	6	4	10	7	13	7	2	1	1
No decolourisation		None	2	4	1	4	7	None	2	3	1	1	3
≥80	1000	3	None	None	None	None	2	None	None	None	None	1	None
60–79		6	None	None	None	4	None	None	None	None	1	None	None
40–59		4	6	5	1	4	None	3	None	1	3	1	3
20–39		4	5	7	8	5	2	7	8	6	8	9	10
<20		4	5	3	6	3	16	11	11	11	6	10	7
No decolourisation		None	5	6	6	5	1	None	2	3	3	None	1

^a Based on means from quadruplicate decolourisation assays.

Cylindrocarpum sp. (1 strain), *D. foliicola* (1 strain), *H. lugdunensis* (2 strains), *Lemonniera aquatica* (1 strain), *Varicosporium* sp. (1 strain), and *V. elodeae* (1 strain) partly decolourised RBBR, with *Varicosporium* sp. SpW08-1 and *L. aquatica* also being able to partly decolourise RB5. Partial RB5 decolourisation was also recorded for

the two *T. marchalianum* strains not decolourising RBBR. Dye decolourisation was also observed in aquatic isolates not belonging to the aquatic hyphomycetes (Table 3). Apart from the aquatic isolates submitted for identification (see Section 3.1.) and the culture collection-derived strains *C. didymum* P10-10-3 (partial decolourisation of RBBR)

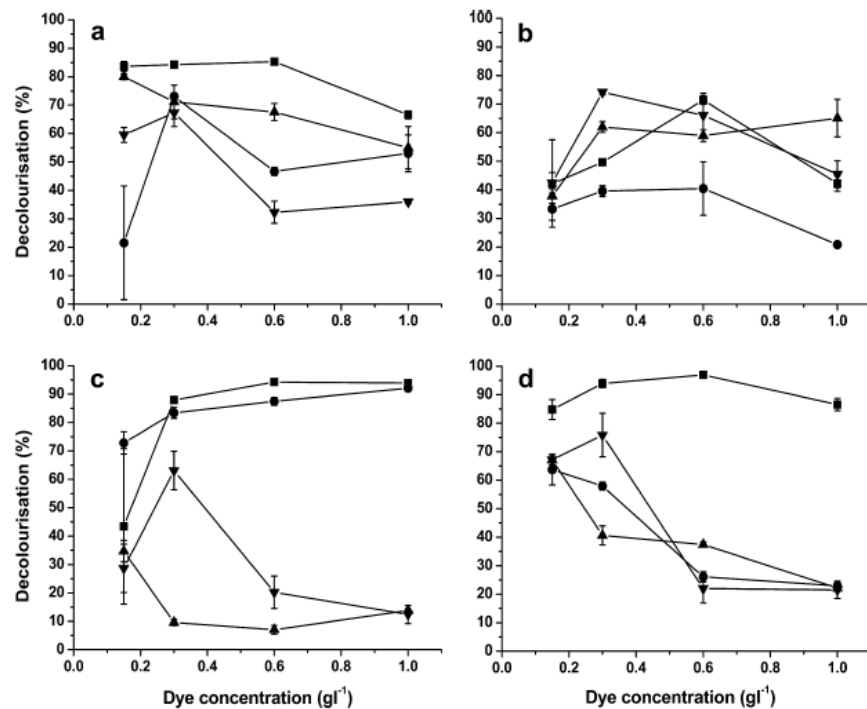


Fig. 1. Decolourisation within 7 days of CB (a), DY3 (b), RBBR (c), and RR4 (d) by the non-basidiomycetous aquatic fungi *Phoma* sp. UHH 5-1-03 (●), *Coniothyrium* sp. Kl-S5 (▼), and *Alternaria* sp. Tt-S1 (▲), and the white rot basidiomycete *T. versicolor* DSM 11269 (■) at different initial dye concentrations. Symbols represent means from quadruplicate assays ±95% confidence limits.

and *E. nigrum* (partial decolourisation of both RBBR and RB5), these fungi remain unidentified. *Trametes versicolor* DSM 11269 was included as a reference and fully decolourised RBBR- and RB5-containing agar plates within 14 and 13 days, respectively.

3.3. Dye decolourisation in liquid systems

The aquatic hyphomycete *Varicosporium* sp. SpW08-1, the mitosporic fungus *C. didymum* P10-10-3, 4 isolates from the site Kl, 5 strains derived from the site SaSe, 5 isolates from the site Tt, and 2 strains from the UHH sites (including the white rot fungus *H. fasciculare* UHH 1-4-03) that were all active in dye decolourisation on agar plates were selected for dye decolourisation assays in liquid systems. The aquatic hyphomycete *C. aquatica* WD(A)-00-1 and the mitosporic strains *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 and *Myrioconium* sp. UHH 1-6-18-4 did not allow

for detection of dye decolourisation on agar plates, possibly due to an increasing brown colourisation of growing mycelia, but were also included since the ability to convert xenobiotics other than dyes have been shown for *C. aquatica* WD(A)-00-1 and *Myrioconium* sp. UHH 1-6-18-4 (Junghanns et al., 2005). Table 4 shows the numbers of aquatic strains corresponding to different ranges of decolourisation upon application of dyes at 0.3 and 1.0 g l⁻¹, respectively.

The decolourising abilities of the 10 most efficient decolourisers among aquatic isolates were compared with those of different white rot fungi, employing dyes at initial concentrations of 0.15, 0.3, 0.6, and 1.0 g l⁻¹. Aquatic isolates with unknown identities were subjected to more detailed identification. With the exception of *H. fasciculare* UHH 1-4-03, all of the further selected strains are non-basidiomycetous fungi (see Section 3.1). The aquatic hyphomycete species *C. aquatica* has a known teleomorph belonging to

Table 5
Decolourisation of textile dyes by aquatic isolates and white rot basidiomycetes within 7 days^a

Fungal strain	Dye concentration (mg l ⁻¹)	Decolourisation (%)												
		Acid dyes			Disperse dyes			Reactive dyes				Direct dyes		
		NY3	NY1	DB1	DR1	DY3	RBBR	RB5	RR4	RY81	CR	CSB	CB	
Aquatic hyphomycetes														
<i>C. aquatica</i> WD(A)-00-1	300	83	17	46	14	49 ^c	31	25	21	49 ^c	66 ^c	53	37	
	1000	84 ^b	39	34	0	63 ^c	31	21	29 ^b	38 ^c	36	47 ^b	31	
<i>Varicosporium</i> sp. SpW08-1	300	17	56 ^c	32	5	1	13	50	14	12	24	28	38	
	1000	18	51 ^c	26	18	2	5	37	11	14	35	15	23	
Other aquatic mitosporic isolates														
<i>Alternaria</i> sp. Tt-S1	300	40	37	54 ^c	29 ^c	62 ^d	10	38	41	21	28	68	71 ^c	
	1000	67	18	40	3	65 ^c	14	37	22	28	41	26	55 ^{b,c}	
<i>C. didymum</i> P10-10-3	300	19	39	27	40 ^c	46 ^c	4	8	15	24	29 ^c	32	73	
	1000	56	41 ^c	47	56 ^{b,c}	69 ^{b,d}	5	13	17	6	28	15	16	
<i>Coniothyrium</i> sp. Kl-S5	300	89	55 ^c	63 ^{b,c}	64 ^{b,c}	74 ^{b,d}	63	81 ^b	76 ^{b,c}	26	71	76	67	
	1000	80	20	38	38 ^c	45 ^c	12	48	22	9	44	22	36	
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-6-18-4	300	68	39	43	9	39 ^c	8	20	16	37	49	25	32	
	1000	54	54 ^{b,c}	43	0	44 ^c	17	17	20	27	27	32	30	
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4	300	74	46	30	29	45 ^c	16	11	8	18	50	34	23	
	1000	78	39	34	7	44 ^c	30	14	23	18	31	20	25	
<i>Phoma</i> sp. SaSe-B6	300	79	53 ^c	56 ^c	35	55 ^c	11	78	62	55 ^c	76 ^{b,c}	68	73	
	1000	69	51 ^c	19	30	44 ^c	11	47	20	41 ^{b,c}	61 ^{b,c}	20	31	
<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	300	89 ^b	56 ^{b,c}	59 ^c	9	40	83 ^{b,c}	73	58	61 ^{b,c}	16	86 ^b	73 ^b	
	1000	29	43 ^c	52 ^{b,c}	11	21	92 ^b	49 ^b	23	34	52 ^c	39	53 ^c	
White rot basidiomycetes														
<i>C. polyzona</i> MUCL 38443	300	90	47	37	0	28	81	91	72	54	53	87	25	
	1000	90 ^{b,e}	31	51	0	39	89	97 ^{b,e}	76 ^c	53 ^c	41	96 ^{b,e}	51	
<i>H. fasciculare</i> UHH 1-4-03	300	87	17	41	48	37	82	41	21	24	30	95 ^c	47	
	1000	83	11	44	20	38	91	34	22	23	37	92 ^c	33	
<i>P. sanguineus</i> MUCL 38531	300	83	29	12	40	31	9	9	6	17	21	37	12	
	1000	74	0	13	18	39	23	23	6	20	39	57	12	
<i>S. rugosoannulata</i> DSM 11372	300	82	14	3	31	45	73	72	30	38	9	97 ^c	54	
	1000	82	0	41	40	52 ^b	90	71 ^c	31	31	30	96 ^c	25	
<i>T. versicolor</i> DSM 11269	300	92 ^{b,e}	60 ^b	58 ^b	50 ^b	50 ^b	88 ^b	93 ^{b,e}	94 ^b	64 ^b	74 ^b	97 ^{b,e}	84 ^{b,e}	
	1000	87	57 ^b	63 ^b	49 ^b	42	94 ^{b,e}	95 ^c	87 ^{b,e}	55 ^b	61 ^b	95 ^c	67 ^b	

^a Data represent means from quadruplicate assays.

^b Most efficiently decolourising strain among aquatic and white rot fungi, respectively.

^c Not significantly different from the most efficiently decolourising white rot fungus according to Student's *t* test ($P > 0.05$).

^d Significantly more efficiently decolourising than the best white rot fungus according to Student's *t* test ($P < 0.05$).

^e Significantly more efficiently decolourising than the best aquatic fungus according to Student's *t* test ($P < 0.05$).

the ascomycete genus *Massarina*, *Pleosporales* (Kirk et al., 2001; Webster, 1992). Thus, six out of the nine most efficient decolourising non-basidiomycete strains represent mitosporic anamorphs with proven ascomycete affiliations (see Section 3.1.). In addition to the white rot fungi *T. versicolor* DSM 11269 and *H. fasciculare* UHH 1-4-03, the ligninolytic basidiomycete *S. rugosoannulata* DSM 11372 (Schlosser and Höfer, 2002) representing a member of the *Strophariaceae*, *Agaricales*, and *C. polyzona* MUCL 38443 and *P. sanguineus* MUCL 38531 belonging to the *Polyporaceae*, *Polyporales*, were used as white rot references. All white rot fungi employed within this study represent species with proven capabilities for bleaching coloured compounds (Bending et al., 2002; Jaouani et al., 2003; Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Pointing and Vrijmoed, 2000; Swamy and Ramsay, 1999; Wesenberg et al., 2003). For none of the dyes, did the uninoculated controls show a decrease in absorbance. No visible binding of dyes to mycelial mats formed by the fungi on top of the dye-containing culture medium in the wells of the 96-well plates was observed. All strains showed individual patterns in their decolourisation efficiency, depending on the type of dye and its concentration. Concentration-dependent decolourisation of single dyes (CB, DY3, RBBR, and RR4), observed with the non-basidiomycetous aquatic strains *Phoma* sp. UHH 5-1-03, *Coniothyrium* sp. KI-S5, and *Alternaria* sp. Tt-S1, are exemplified in Fig. 1. At the majority of all tested concentrations, *T. versicolor* DSM 11269 decolourised 3 of the 4 dyes shown in Fig. 1 more (CB, RR4) or equally (RBBR) efficient as the aquatic strains. However, *Coniothyrium* sp. KI-S5 and *Alternaria*

sp. Tt-S1 proved to be more efficient decolourisers than *T. versicolor* DSM 11269 for DY3 at particular concentrations. *Phoma* sp. UHH 5-1-03 exhibited a decolourisation essentially comparable to that of *T. versicolor* DSM 11269 for RBBR. The decolourisation results obtained with aquatic mitosporic fungi and basidiomycetes at dye concentrations of 0.3 and 1.0 g l⁻¹ are summarised in Table 5. At a dye concentration of 0.3 g l⁻¹, particular non-basidiomycete aquatic fungi decolourised 8 out of the 12 tested dyes to an extent essentially comparable to that observed with the most efficiently decolourising white rot fungus. Several mitosporic strains showed decolourisation efficiencies that were not significantly different or even significantly higher than that of the best performing white rot basidiomycete. At a dye concentration of 1.0 g l⁻¹, no significant differences in dye decolourisation between the most efficient mitosporic strains and white rot fungi were observed for six of the dyes. In addition, *C. didymum* P10-10-3 decolourised DY3 significantly more efficiently than the best performing white rot fungus (*S. rugosoannulata* DSM 11372). The decolourisation observed with *C. aquatica* WD(A)00-1 for NY3 and *Phoma* sp. UHH 5-1-03 for RBBR nearly reached those obtained with the most efficient white rot basidiomycetes.

The formation of new absorbance maxima, that appeared upon incubation of fungal strains in presence of dyes, is shown in Table 6. This is indicative of the formation of biotransformation products. Examples for observed changes in dye absorbance spectra after fungal treatment of NY3, RBBR, and CSB, and dye spectra in the respective uninoculated controls are depicted in Fig. 2. Absorbance

Table 6

Wavelengths (nm) of major new absorbance peaks (shoulders where indicated), indicating alterations in absorbance spectra after dye treatment by fungal strains for 7 days^a

Fungal strain	Acid dyes		Disperse dyes		Reactive dyes		Direct dyes	
	NY3	NY1	DB1	DY3	RBBR	RB5	CSB	CB
Aquatic hyphomycetes								
<i>C. aquatica</i> WD(A)-00-1	NA ^b	433	NA	NA	470 ^d	NA	NA	NA
Other aquatic mitosporic isolates								
<i>C. didymum</i> P10-10-3	482 ^c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	507
<i>Coniothyrium</i> sp. KI-S5	NA	NA	NA	587, 481 ^c	NA	536	NA	555
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-6-18-4	544	483	NA	480 ^c	NA	NA	526	NA
<i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4	478, 522	413, 482	NA	NA	490 ^d	NA	530	NA
<i>Phoma</i> sp. SaSe-B6	NA	481	NA	435 ^d	NA	540 ^d	NA	NA
<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	NA	NA	NA	NA	479 ^d	NA	NA	481
White rot basidiomycetes								
<i>C. polyzona</i> MUCL 38443	480	432	525	NA	490 ^d	477	NA	NA
<i>H. fasciculare</i> UHH 1-4-03	504	NA	NA	NA	480	NA	497	383
<i>P. sanguineus</i> MUCL 38531	499	NA	NA	NA	NA	NA	584	481
<i>S. rugosoannulata</i> DSM 11372	483	429 ^c	NA	NA	478	NA	501	451
<i>T. versicolor</i> DSM 11269	476	NA	510 ^d	NA	474	NA	NA	NA

^a Peak wavelengths of the untreated dyes: 595 and 637 nm (NY3), 520 nm (NY1), 592 nm (DB1), 358 nm (DY3), 592 nm (RBBR), 598 nm (RB5), 615 nm (CSB), 520 nm (CB). Dyes (CR, DR1, RR4, RY81) and fungal strains (*Alternaria* sp. Tt-S1, *Varicosporium* sp. SpW08-1) not leading to any shift in absorbance wavelengths were omitted.

^b NA, no alteration in absorbance spectrum.

^c New absorbance peak appearing at only very weak intensity.

^d Only shoulder.

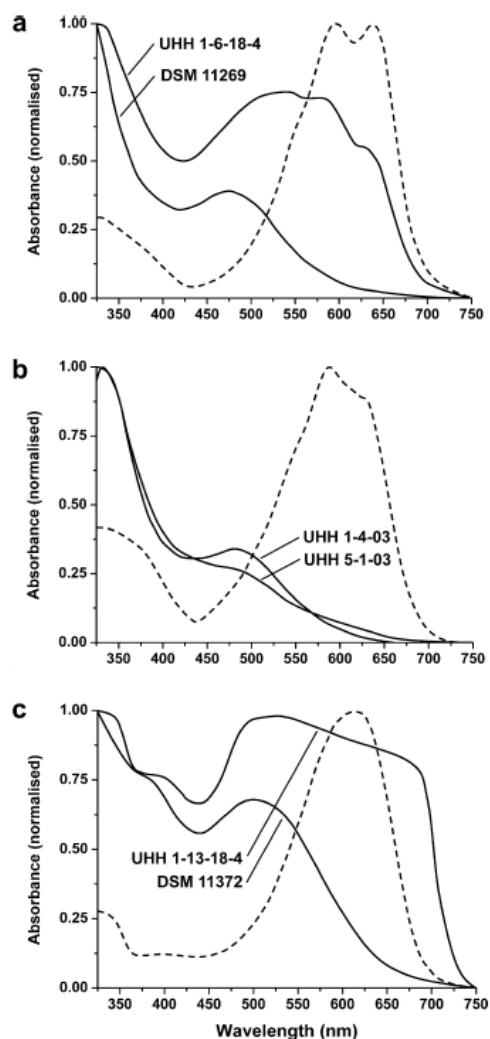


Fig. 2. Absorbance spectra observed after fungal treatment for 7 days of NY3 (a), RBBR (b), and CSB (c). Dashed lines represent the spectra of dye-containing assays without fungi (controls).

peaks that potentially also may be attributable to *de novo* synthesised fungal metabolites should have also been observed independently from the presence of a particular dye, which was not the case. New absorbance peaks or shoulders resulting from fungal attack on RBBR appeared at essentially comparable wavelengths upon application of both basidiomycete and non-basidiomycete strains. Absorbance peaks within the same wavelength range were also observed in both basidiomycete as well as non-basidiomycete strains for NY3, NY1, and CB, but for these dyes some individual peaks only appearing in fungi of either group were also recorded. No comparable peaks, appearing in both the basidiomycete and the non-basidiomycete strains, were detected for DB1, DY3, RB5, and CSB.

New peaks with comparable wavelengths that were present in more than 1 non-basidiomycetous strain but absent in basidiomycetes were detected for NY3, NY1, DY3, RB5, and CSB. None of the basidiomycetes formed any new absorbance peaks from DY3, whereas 3 non-basidiomycete aquatic strains were shown to biotransform the dye. On the other hand, new absorbance peaks appeared upon treatment of DB1 with 2 of the basidiomycetes but not after incubation of DB1 with the non-basidiomycetous isolates.

4. Discussion

A total of 132 fungal isolates derived from aquatic environments has been tested for the decolourisation of the disazo dye RB5 and the anthraquinone dye RBBR using an agar plate screening method. Among them, 33 strains at least partly decolourised both dyes, 20 isolates were active only on RBBR, and 6 strains decolourised only RB5. Hence, 59 isolates representing about 45% of the tested aquatic strains were able to act on at least one dye. The ability of 21 selected aquatic strains to decolourise dyes was confirmed using a liquid test system (Table 4). A more detailed comparison of the decolourising abilities of the most efficient aquatic mitosporic strains with those of selected white rot basidiomycetes revealed that the majority of dyes were decolourised by particular mitosporic fungi at rates essentially comparable to those observed with the most efficient white rot fungus (Fig. 1, Table 5). Under certain conditions, mitosporic aquatic isolates decolourised dyes even more efficiently than the best performing white rot fungus (Fig. 1, Table 5). Effective decolourisers among mitosporic moulds have also been described by others (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002). To the best of our knowledge, decolourisation of synthetic dyes by aquatic hyphomycetes (Ingoldian fungi) has never been described before. The decolourisation profiles obtained with the most effective aquatic mitosporic isolates (Table 5) indicate comprehensive decolourising abilities that are not restricted to certain dyes, which should provide advantages with respect to the often changing dye compositions in real effluents (Hao et al., 2000; Pophali et al., 2003; Wesenberg et al., 2003). Several authors have described that anthraquinone dyes are decolourised at higher rates than azo dyes by white rot fungi (Abadulla et al., 2000; Jarosz-Wilkolazka et al., 2002). This observation can obviously not be generalised as indicated by various examples which show that aquatic mitosporic fungi and also some white rot basidiomycetes can decolourise certain azo dyes more efficiently than anthraquinone dyes (Table 5). The observed concentration-dependent decolourisation rates of the different fungi (Fig. 1, Table 5) may reflect individual dye affinities of the fungi and their decolourising enzymes. These depend on the dye structure, concentration, and the respective fungus. For decolourisation of the disazo type dye RB5, an apparent half-saturating concentration of about 106 mg l^{-1} was determined with immobilized mycelium of *Funalia troglia* (Mazmanci and Ünyayar, 2005). Increasing decolourisation

efficiencies upon increasing dye concentrations (Fig. 1) might have been caused by the induction of enzymes acting on dyes. The extracellular oxidoreductase laccase is known to be involved in fungal dye decolourisation (Wesenberg et al., 2003) and an inductive effect of the anthraquinone dye RBBR on laccase production was demonstrated for the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* (Schliephake and Lonergan, 1996). In the bacterial strain *Pseudomonas* KF46, an azoreductase initiating azo dye degradation is induced by its substrate Orange II (Zimmermann et al., 1982). The enzymes contributing to dye decolourisation by the aquatic fungi assessed within the present study remain to be defined. In addition, decolourisation could have been affected by the inhibitory effects of dyes. Biosorption of dyes onto fungal mycelia (Yesilada et al., 2002; Zhang et al., 2003), which was not directly visible within our study, may have also contributed to the observed removal of dyes. However, the appearance of new absorbance maxima upon the fungal treatment of dyes (Fig. 2, Table 6) in 40 out of the tested 168 (12 dyes and 14 strains) combinations indicates the formation of biotransformation metabolites. This was also the case for certain dyes treated with the highly efficiently decolourising non-basidiomycete strains *Phoma* sp. UHH 5-1-03, *Coniothyrium* sp. K1-S5, and *Phoma* sp. SaSe-B6. Pathways addressing the formation of intermediates and their further metabolism during dye degradation by whole fungal cultures have only been rarely reported (Wesenberg et al., 2003). Such data would facilitate the development of treatment processes for dye-containing effluents with respect to the selection of appropriate organisms, including their ability to not only to decolourise but also to detoxify the dyes. The absorbance peaks appearing at essentially comparable wavelengths upon incubation of both non-basidiomycete and basidiomycete fungi with certain dyes (Table 6) would indicate that decolourisation involves the same biotransformation metabolites and hence at least partly identical bioconversion pathways in different taxonomic groups. This would assume that such peaks arise from identical compounds, which needs to be assessed further. In addition, individual absorbance peaks only observed in certain fungi of either group suggest that different metabolic routes may be also employed for dye biotransformation, depending on the fungal species and the dye.

Our observations illustrate a high and as yet unexploited potential of fungi occurring in aquatic environments for the treatment of dye-containing waste waters. High concentrations of inorganic ions such as sulfate and chloride, and alkaline pH values as detected in waters of some of the isolation sites (see Section 2) are also frequently found in industrial dye-containing effluents (D'Souza et al., 2006; Pophali et al., 2003; Shaw et al., 2002). Higher salt concentrations stimulated growth, laccase production, and decolourisation of synthetic dyes in two basidiomycetes isolated from marine environments (D'Souza et al., 2006; Raghukumar et al., 1999). Due to the high concentrations of inorganic compounds, which are known to be unfavour-

able for conventional waste water treatment processes (Pophali et al., 2003) but that are also found in natural aquatic environments, possible fungal adaptations to these may be advantageous for the treatment of real dye-containing waste waters.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the funding of this study within the EC FP6 Project SOPHIED (NMP2-CT-2004-505899). Many thanks to S. Vanhulle and V. Mertens (Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve) for providing the strains *C. polyzona* MUCL 38443 and *P. sanguineus* MUCL 38531, the 96-well test system, and the dye NY1, and to A. Jarosz-Wilkolazka (Maria Curie-Skłodowska University, Lublin) for providing the dye NY3. Furthermore, we want to thank L. Marvanová (Czech Collection of Microorganisms, Brno), C. Decock and P. Massart (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve), and the CBS identification service for their efforts in the identification of fungal strains, and S. Köhler (UFZ) for the help with the ion determinations. Finally, we thank B. Krause, S. Köhler, and J. Steffen (UFZ) for their technical assistance, R. Wennrich (UFZ) for helpful cooperation and discussions, and K. Smith (UFZ) for linguistic improvement of the manuscript.

References

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.-H., Cavaco-Paulo, A., Guebitz, G.M., 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3357–3362.
- Bending, G.D., Friloux, M., Walker, A., 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol. Lett.* 212, 59–63.
- Bucher, W.C., Pointing, S.B., Hyde, K.D., Reddy, C.A., 2004. Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi. *Microbial Ecol.* 48, 331–337.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1775–1784.
- Champagne, P.P., Ramsay, J.A., 2005. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 276–285.
- Chivukula, M., Renganathan, V., 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4374–4377.
- Claus, H., Faber, G., König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 672–678.
- D'Souza, D.T., Tiwari, R., Sah, A.K., Raghukumar, C., 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb. Tech.* 38, 504–511.
- Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ. Int.* 30, 953–971.
- Hao, O.J., Kim, H., Chiang, P.-C., 2000. Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 30, 449–505.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M., Szwedzik, U., 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases

- from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2788–2793.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M., Penninckx, M.J., 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme Microb. Tech.* 33, 802–809.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Kochmanska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A., 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 566–572.
- Junghanns, C., Moeder, M., Krauss, G., Martin, C., Schlosser, D., 2005. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151, 45–57.
- Karapinar, K.I., Kargi, F., 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 195–199.
- Kasinath, A., Novotny, C., Svobodova, K., Patel, K.C., Sasek, V., 2003. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme Microb. Tech.* 32, 167–173.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.D., Stalpers, J.A., 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford.
- Krauss, G., Sridhar, K.R., Jung, K., Wennrich, R., Ehrman, J., Bärlocher, F., 2003. Aquatic hyphomycetes in polluted groundwater habitats of central Germany. *Microbial Ecol.* 45, 329–339.
- Lucas, M.S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J.A., Dias, A.A., 2006. Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme Microb. Tech.* 39, 51–55.
- Martinez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 425–444.
- Mazmanci, M.A., Ünyayar, A., 2005. Decolourisation of reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. *Process Biochem.* 40, 337–342.
- Nikolcheva, L.G., Bärlocher, F., 2004. Taxon-specific primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol. Prog.* 3, 41–49.
- Nikolcheva, L.G., Cockshutt, A.M., Bärlocher, F., 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2548–2554.
- Ollikka, P., Alhonen, K., Leppanen, V., Glumoff, T., Rajjola, T., Suominen, I., 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4010–4016.
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, R.L., Crawford, D.L., 1992. Mineralization of sulfonated dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3598–3604.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R., Guthrie, J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigments* 58, 179–196.
- Pinheiro, H.M., Touraud, E., Thomas, O., 2004. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes Pigments* 61, 121–139.
- Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P., 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World J. Microb. Biot.* 16, 317–318.
- Pophali, G.R., Kaul, S.N., Mathur, S., 2003. Influence of hydraulic shock loads and TDS on the performance of large-scale CETPs treating textile effluents in India. *Water Res.* 37, 353–361.
- Raghukumar, C., D'Souza, T.M., Thorn, R.G., Reddy, C.A., 1999. Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2103–2111.
- Ramvalho, P.A., Cardoso, M.H., Cavaco-Paulo, A., Ramalho, M.T., 2004. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2279–2288.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technol.* 77, 247–255.
- Schliephake, K., Lonergan, G.T., 1996. Laccase variation during dye decolourisation in a 200 l packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 18, 881–886.
- Schlosser, D., Höfer, C., 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3514–3521.
- Shaw, C.B., Carliell, C.M., Wheatley, A.D., 2002. Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. *Water Res.* 36, 1993–2001.
- Spadaro, J.T., Renganathan, V., 1994. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 301–307.
- Swamy, J., Ramsay, J.A., 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Tech.* 24, 130–137.
- Webster, J., 1992. Anamorph–teleomorph relationships. In: Bärlocher, F. (Ed.), *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes*. Springer, Berlin, pp. 99–117.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22, 161–187.
- Yesilada, O., Cing, S., Asama, D., 2002. Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets. *Bioresource Technol.* 81, 155–157.
- Zhang, S.J., Yang, M., Zhang, Y., Xin, P., Pan, F., 2003. Biosorption of reactive dyes of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1479–1482.
- Zheng, Z., Levin, R.E., Pinkham, J.L., Shetty, K., 1999. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochem.* 34, 31–37.
- Zimmermann, T., Kulla, H.G., Leisinger, T., 1982. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Eur. J. Biochem.* 129, 197–203.

Anhang V

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Charles Junghanns, Diplom-Biologe
Adresse: Selneckerstrasse 16, 04277 Leipzig
E-Mail: charles.junghanns@gmx.net
Geboren: 9. April 1979 in Leipzig

Werdegang

1985 - 1992	8. Polytechnische Oberschule "Fritz Austel", Leipzig
1992 - 1997	Wilhelm-Ostwald-Gymnasium, Leipzig
1997 - 2003	Studium der Biologie an der Universität Leipzig Hauptfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Ökologie, Verhaltensphysiologie
2001 - 2002	Vertiefung des Hauptfaches Mikrobiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Fokus: Pilzliche Mikrobiologie
2002 - 2003	Diplomarbeit am UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Department Grundwassermikrobiologie <u>Titel:</u> Abbau von organischen Wasserkontaminanten durch aquatische Pilze und die Funktion der extrazellulären Oxidoreduktase Laccase für den Abbau
2003 – 2004	Wissenschaftliche Hilfskraft am UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Department Grundwassermikrobiologie
2004 - 2008	Promotion am UFZ - Helmholtzzentrum für Umweltforschung, Leipzig Department Umweltmikrobiologie innerhalb des RP6 EU-Projektes SOPHIED <u>Titel:</u> Behandlung von Textilfarbstoffen durch aquatische Pilze

Publikationen

Junghanns C., Moeder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D. (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151(1): 45-57.

Junghanns C., Krauss G., Schlosser D. (2008) Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology* 99: 1225-1235.

Martin C., Pecyna M., Kellner H., Jehmlich N., Junghanns C., Benndorf D., von Bergen M., Schlosser D. (2007) Purification and characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 613-624.

Leipzig, 05. Juni 2008

Charles Junghanns

Anhang VI

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Leipzig, 05. Juni 2008

Charles Junghanns