

BIOTRANSFORMATION VON MIKROKONTAMINATEN DURCH AQUATISCHE PILZE

KUMULATIVE DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR RERUM NATURALIUM
(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DER

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I -
BIOWISSENSCHAFTEN

DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

VON CLAUDIA MARTIN

GEBOREN AM 28. 12. 1978 IN ZWICKAU

GUTACHTER

- 1. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß**
- 2. Prof. Dr. Uwe Karst**
- 3. Prof. Dr. Frieder Schauer**

Halle(Saale), 23. Juni 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014214

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014214>]

Wie ein Weg im Herbst: Kaum ist er rein gekehrt, bedeckt er sich wieder
mit den trockenen Blättern.

Franz Kafka

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einführung	6
1.1 Aquatische Pilze	6
1.2 Laccasen (EC 1.10.3.2)	9
1.2.1 Strukturelle Eigenschaften	10
1.2.2 Katalytische Eigenschaften	10
1.3 Galaxolid® und Tonalid®	12
1.3.1 Vorkommen in der aquatischen Umwelt und Risikopotenzial	12
1.3.2 Abbau, Biotransformation und Umweltverhalten	13
1.4 Technisches Nonylphenol (t-NP)	15
1.4.1 Vorkommen in der aquatischen Umwelt und Risikopotenzial	15
1.4.2 Abbau und Biotransformation	16
1.4.3 Die Komplexität von t-NP als analytische Herausforderung	17
1.5 Ziel der Arbeit	18
2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe durch aquatische Pilze	19
(Martin <i>et al.</i> , 2007, Environmental Science and Technology 41 , 5395-5402)	
2.1 Biotransformation von HHCB und AHTN in Pilzkulturen	19
2.2 Oxidation von HHCB und AHTN durch isolierte Laccasen	22
2.3 Implikationen für den Einfluss von Pilzen auf das Umweltverhalten von polycyclischen Moschusduftstoffen in natürlichen aquatischen Systemen	24
3 Reinigung und Charakterisierung einer Laccase des aquatischen Pilzstamms <i>Myrioconium</i> sp. UHH 1-13-18-4 und Analyse des Laccase-codierenden Gens	26
(Martin <i>et al.</i> , 2007, Applied Microbiology and Biotechnology 77 , 613-624)	
3.1 Laccase-Produktion und -Reinigung	26
3.2 Strukturelle Charakterisierung der Laccase	27
3.2.1 Strukturelle Eigenschaften des gereinigten Proteins	27
3.2.2 Analyse des Laccase-Gens	28

3.3	Katalytische Eigenschaften	29
3.4	Rückschlüsse auf Funktionen der <i>Myrioconium</i> sp. Laccase	30
4	Analytische Charakterisierung des technischen Nonylphenol	32
	(Möder <i>et al.</i> , 2006, <i>Journal of Chromatography A</i> 1102 , 245-255, Möder <i>et al.</i> , 2006, <i>Journal of Chromatography A</i> 1107 , 233-239)	
4.1	Gaschromatographie-Tandem Massenspektrometrie (GC-MS/MS) und Cluster-Analyse	32
4.1.1	Aufklärung der spektrometrischen Fragmentierungswege von synthetisierten NP-Referenzisomeren	33
4.1.2	Klassifizierung der t-NP-Isomere mittels Clusteranalyse	34
4.2	NP-Isomerentrennung mittels zweidimensionaler Gaschromatographie-Flugzeit-Massenspektrometrie (GCxGC-TOF-MS)	35
5	Biotransformation von t-NP durch den aquatischen Hyphomyceten <i>Clavariopsis aquatica</i>	38
	(Martin <i>et al.</i> , submitted to <i>Applied Environmental Microbiology</i>)	
5.1	Einfluss der extrazellulären Laccase auf die Umsetzung von NP durch Pilzkulturen	39
5.1.1	Umsetzung distinkter Isomerengruppen des t-NP	40
5.2	Intrazelluläre Biotransformationsprodukte von t-NP und synthetisierten Einzelisomeren in <i>C. aquatica</i> Kulturen	41
5.3	Bilanzierung des Umsatzes von NP-Einzelisomeren in Pilzkulturen	44
5.4	Folgerungen für Biotransformation und Detoxifikation von t-NP in natürlichen, aquatischen Systemen	44
6	Zusammenfassung	46
7	Anhang	
	Eidesstattliche Erklärung	A-1
	Danksagung	A-2
	Lebenslauf	A-3
	Literatur	A-4

Abkürzungsverzeichnis

2,6 DMP	2,6-Dimethoxyphenol
α -C	alpha-Kohlenstoff
aa	Aminosäure
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
AHTN	1-(3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethanon
AQH	aquatische Hyphomyceten
ATR/FT-IR	Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared
bp	Basenpaar
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cbr	Kupferbindungsregion (c opper b inding region)
cDNS	Aus dem Englischen complementary Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DT ₅₀	Halbwertszeit
EMBL	European molecular biology laboratory
EU	Europäische Union
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
GCxGC-TOF-MS	comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry
HBT	Hydroxybenzotriazol
HHCB	4,6,6,7,8,8-hexamethyl-1,3,4,6,7,8-hexahydrocyclopenta[g]isochromen
IEF	isoelektrische Fokussierung
k _a	abiotische Geschwindigkeitskonstante
k _b	biotische Geschwindigkeitskonstante
k _{beob}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
K _{cat}	Geschwindigkeitskonstante einer Enzymreaktion 1.Ordnung
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight-mass spectrometry
MRE	metal response element
MXR	multi-xenobiotic-resistance
NP	Nonylphenol (Substitutionsposition der Alkylseitenkette nicht definiert)
NPEO	Nonylphenoethoxylat
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PAK	polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
pMD	polycyclische Moschusduftstoffe

PNEC	predicted no effect concentration
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
SDS-PAGE	sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
t-NP	technisches Nonylphenol

1 Einführung

Spurenkontaminanten, deren unvollständiger Abbau in Kläranlagen zur Verschmutzung der Oberflächengewässer führt, sind erst in den letzten Jahren in den Blickwinkel der Öffentlichkeit gerückt. Sie besitzen ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotenzial für aquatische Ökosysteme und den Menschen. Die geringen Konzentrationen, mit denen diese Xenobiotika in der aquatischen Umwelt vorkommen, verursachen keine akuten toxischen Effekte. Allerdings ist von einer Vielzahl von Substanzen, wie z. B. Alkylphenolen, Vertretern der Pestizide und Herbizide, sowie von einigen polychlorierten Biphenolen und Dibenzodioxinen, bekannt, dass sie an den Östrogenrezeptor binden und damit hormonelle Ungleichgewichte hervorrufen. Nonylphenol, ein Vertreter der Alkylphenole, besitzt auch in umweltrelevanten Konzentrationen eine nachweisbare endokrine Aktivität (Schwaiger *et al.*, 2002) und wird deshalb in der EU-Direktive COM(2006)397 als prioritäre, gefährliche Substanz gelistet. Neben der Beeinflussung des Hormonsystems wird vermutet, dass Langzeitexpositionen gegenüber geringen Konzentrationen zu verschiedenen sublethalen Effekten, wie beispielsweise der Inhibierung von Enzymen, Wachstumsstörungen, oder der Beeinträchtigung der Motorik (Schwaiger *et al.*, 2000; Spieser *et al.*, 2000), führen können. Mögliche mikrobielle Prozesse, die nach der Freisetzung dieser Kontaminanten in die aquatische Umwelt zu deren Eliminierung beitragen können, sowie die daran beteiligten Mikroorganismen und Enzyme sind weitgehend unbekannt.

1.1 Aquatische Pilze

In stehenden und fließenden aquatischen Ökosystemen existiert eine große Artenvielfalt von Pilzen. Es wird angenommen, dass sich aquatische Pilze über verschiedene evolutionäre Pfade aus terrestrischen Vorfahren entwickelt haben und zum Teil ubiquitär in der Umwelt auftreten (<http://www.life.uiuc.edu/fungi/>). Sie besiedeln organisches Material in fließenden und stehenden Gewässern (Findlay *et al.*, 2002; Sridhar und Bärlocher, 2000). Dabei ernähren sie sich vorrangig saprotroph von abgestorbenem Pflanzenmaterial oder leben als Parasiten oder Endophyten auf Wasserpflanzen und Algen. Indem sie schwer verwertbare pflanzliche Polymere zersetzen, vermitteln aquatische Pilze den Nährstoff- und Energiefluss zwischen pflanzlichem Detritus und Invertebraten und nehmen damit eine wichtige Stellung in der Nahrungskette der aquatischen Ökosysteme ein (Suberkropp, 2001). Derzeit sind ca. 2900 Pilzarten beschrieben, die aus Süß-, Meer- und Brackwasser, sowie Mangrovenwäldern isoliert wurden (Shearer *et al.*, 2007). Dabei dominieren die meiosporen Ascomyceten mit einem Anteil von 52% der bekannten Taxa die aquatischen Lebensräume (Shearer *et al.*, 2007).

In der zweitgrößten Gruppe (27%) sind verschiedene mitospore Pilze zusammengefasst, die aus Süßwassergebieten isoliert wurden und bei denen es sich hauptsächlich um Anamorphe von Ascomyceten handelt (Shearer *et al.*, 2007). Mit einem Anteil von 20% repräsentieren die universell vorkommenden Tüpfchenpilze (Chytridiomycota) die dritte große Gruppe der aquatischen Pilze. Nur rund 1% aller Pilzarten, die weltweit aus wässrigen Habitaten isoliert wurden, gehören zu den auf dem Land beträchtlich häufiger auftretenden Basidiomyceten.

Die umfangreiche Gruppe der mitosporen Pilze wird in die aquatischen Hyphomyceten (AQHs), die aeroaquatischen Hyphomyceten und weitere diverse, mitospore Pilze („Miscellaneous“) unterteilt (<http://www.life.uiuc.edu/fungi/>). AQHs, die 1942 durch Ingold erstmalig beschrieben und daher auch als „Ingoldian fungi“ bekannt sind, leben auf abgestorbenen Blättern und Holz (Bärlocher, 1992), oder auch im Schaum (Iqbal und Webster, 1973) in sauerstoffreichen Fließgewässern. Sie wurden des Weiteren aus sauerstoffarmen Grundwasserbrunnen isoliert (Krauss *et al.*, 2003b). Ihre tetraradiat oder sigmoid geformten Konidien, die während der Sporulation unter Wasser gebildet werden, verdeutlichen die spezielle Adaptation an das Leben in fließenden Gewässern (Webster *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu den AQHs besiedeln die aeroaquatischen Hyphomyceten vorrangig Substrate in stehenden Gewässern, wobei ihre Verbreitung an der Wasseroberfläche stattfindet und ihre Sporen einzigartige Strukturen für eine optimale Schwimmfähigkeit aufweisen (<http://www.botanik.univie.ac.at/mycology>). Die Gruppe der diversen mitosporen Pilze setzt sich aus hyalinen und pigmentierten Hypho- und Coelomyceten zusammen. Letztere unterscheiden sich von den wesentlich häufiger vorkommenden Hyphomyceten dadurch, dass ihre Konidien in einen Fruchtkörper eingeschlossen sind.

Zu den mitosporen Pilzen zählen sowohl „indweller“ als auch „immigrants“. Diese Definition von Park (1972) bezeichnet Pilzarten, die ausschließlich für aquatische Habitate beschrieben wurden („indweller“, z. B. AQHs), bzw. jene, die ubiquitär („immigrants“) vorkommen.

Pilze besiedeln sowohl unbelastete als auch belastete Gewässersysteme. Dies schließt Habitate ein, die durch anthropogene Einträge industriellen, landwirtschaftlichen oder urbanen Ursprungs belastet (Schlosser *et al.*, 2008) und mit Organika und Schwermetallen kontaminiert sind (Krauss *et al.*, 2003a; Krauss *et al.*, 2001; Sridhar *et al.*, 2007). Solche Stressfaktoren verringerten die Biodiversität und Biomasse von untersuchten AQH-Gemeinschaften aus verunreinigten Gewässern Mitteldeutschlands. Die Sensitivität der AQH-Stämme gegenüber Umwelteinflüssen könnte als Indikator für anthropogene Eingriffe in die aquatische Umwelt genutzt werden (Solé *et al.*, 2008). Für

Pilzstämmen aus Nonylphenol-kontaminierten Sedimenten konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind diesen Schadstoff auch umzusetzen (Junghanns et al., 2005).

Pilze haben für das Überleben in extremen Habitaten verschiedene Mechanismen als Antwort auf den adaptiven Stress entwickelt. Biosorption, Bioakkumulation und intrazelluläre Sequestrierung sind Mechanismen der Metall-Homöostase in Pilzen, die die Metallkonzentrationen in den Zellen regulieren und den Pilzen die Existenz in Schwermetall-kontaminierten Gewässern ermöglichen (Krauss et al., 2008). Aktuelle Studien zeigen, dass aquatische Pilze organische Kontaminanten metabolisieren können. So waren Pilzstämmen, die aus Nonylphenol-kontaminierten Sedimenten isoliert wurden, in der Lage den Schadstoff in Laborversuchen umzusetzen (Junghanns et al., 2005). Das gleiche Verhalten zeigten Pilzstämmen aus Gewässern, die mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) belastet waren (Augustin et al., 2006; Ravelet et al., 2001; Salvo et al., 2005). Diese Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass aquatische Pilze an der Biotransformation von Xenobiotika, die in die natürlichen Lebensräume dieser Organismen eingetragen werden, beteiligt sein können. Daher stellt sich die Frage, welches Potenzial aquatische Pilze für die Selbstreinigung des Wassers besitzen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten zur Beantwortung dieser Frage beitragen. Ein weiterer Aspekt ist die mögliche biotechnologische Nutzung der biologischen Aktivität von aquatischen Pilzen. Bisher beschränken sich industrielle Anwendungen im Wesentlichen auf Pilze, die aus terrestrischen Habitaten stammen. Zum Beispiel finden Weisfäule-erregende Basidiomyceten Anwendung in verschiedenen Reaktoren zur Reinigung von Industrieabwasser (Font et al., 2006; Ryan et al., 2005). Derzeit wird jedoch im Rahmen eines aktuellen EU-Projektes (SOPHIED, Novel sustainable bioprocesses for European colour industries, www.sophied.net) untersucht, ob aquatische Pilze Vorteile gegenüber ihren terrestrischen Verwandten für die Behandlung von Färbereiabwässern besitzen (Junghanns et al., 2008).

Die Umsetzung von Schadstoffen durch Pilze, die aerobe Gewässer besiedeln, erfolgt über oxidative Prozesse. Der intrazelluläre Angriff auf Xenobiotika kann z. B. zu Hydroxylierungen an Aromaten oder Aliphaten führen, die auch als Phase I-Reaktionen bezeichnet werden. Hydroxylierungen der aliphatischen Seitenketten von Nonylphenol-Isomeren des technischen Gemischs sind für die Umsetzung durch den aquatischen Hyphomyceten *Clavariopsis aquatica* und das mitospore Isolat UHH 1-6-18-4 beschrieben (Junghanns et al., 2005). Bei der Metabolisierung des PAK-Metaboliten 1-Naphthol durch den aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* wurde 1,4-Naphthochinon als Phase I-Metabolit identifiziert (Augustin et al., 2006). Phase II-Reaktionen, die im Allgemeinen eine Entgiftung durch die Bildung von wasserlöslichen Konjugaten (z. B. Methylierung oder Sulphatierung) bewirken, wurden bei der Biotransformation von 1-

Naphthol nachgewiesen (1-Methoxynaphthalen, 1-Naphthylsulfat und 4-Hydroxy-1-naphthylsulfat) (Augustin *et al.*, 2006). Neben Enzymen wie Cytochrom-P450-Oxygenasen oder Transferasen, die bei der intrazellulären Metabolisierung agieren, beeinflussen auch Enzyme des lignolytischen Systems die Umsetzung von organischen Substraten. Außer Manganperoxidasen, Ligninperoxidasen und versatilen Peroxidasen, die im Wesentlichen auf terrestrische Basidiomyceten beschränkt sind, bilden extrazellulären Laccasen (EC 1.10.3.2) eine effektive Gruppe Lignin-modifizierender Enzyme. Sie katalysieren die Bildung von Substratradikalen, die anschließend zahlreiche Folgereaktionen eingehen können. Dazu zählen Oligomerisierungen, wie für Chlorphenole (Park *et al.*, 2000), 3-Nitrotoluol-Abbauprodukte (Dawel *et al.*, 1997) und endokrin aktive Substanzen (Dubroca *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2001) gezeigt wurde, sowie die Bindung von Schadstoffen an natürliches, organisches Material (Ahn *et al.*, 2002; Bollag und Myers, 1992). Laccase, die aus Kulturüberständen des aquatischen Hyphomyceten *C. aquatica* isoliert wurde, polymerisierte technisches Nonylphenol zu di- bis pentameren Kopplungsprodukten (Junghanns *et al.*, 2005). Für das Prozessverständnis der Metabolisierung von Xenobiotika durch aquatische Pilze ist es wichtig, das Wissen über die daran beteiligten Enzyme zu erweitern.

1.2 Laccasen (EC 1.10.3.2)

Von ihrem Entdecker Yoshida wurde Laccase bereits 1883 aus den Exsudaten des japanischen Lackbaumes *Rhus vernicifera* isoliert (Yoshida, 1883). Laccasen werden jedoch nicht nur in Pflanzen produziert sondern ebenfalls in Pilzen, Bakterien und Insekten, in denen sie unterschiedliche physiologische Funktionen einnehmen (Mayer und Staples, 2002). Detailliertes Wissen existiert über pilzliche Laccasen, die z. B. an Morphogenese, Stressabwehr und Ligninabbau beteiligt sind (Baldrian, 2006; Thurston, 1994). Diese Enzyme konnten sowohl in den Zellen als auch sezerniert im Kulturüberstand oder Zellwand-assoziiert nachgewiesen werden (Thurston, 1994). Der überwiegende Teil der in der Literatur beschriebenen pilzlichen Laccasen wurde aus Basidiomyceten isoliert (Hoegger *et al.*, 2006), wobei vorrangig extrazelluläre Enzyme auf Grund der leichteren Handhabung und ihrer Eignung für den industriellen Einsatz untersucht wurden. Extrazelluläre Laccaseaktivitäten wurden ebenfalls in aquatischen Pilzstämmen, die aus Flüssen Mitteldeutschlands, dem Nildelta und tropischen Regionen isoliert wurden, detektiert (Junghanns *et al.*, 2005; Abdel-Raheem, 2004; Bucher *et al.*, 2004). Diese Enzyme wurden bislang allerdings nicht detailliert untersucht.

1.2.1 Strukturelle Eigenschaften

Laccasen, die aus Asco- und Basidiomyceten isoliert wurden, besitzen typischerweise Molmassen zwischen 60 und 80 kDa und treten überwiegend als Monomere auf (Baldrian, 2006; Kiiskinen *et al.*, 2002; Tetsch *et al.*, 2006). Jedoch wurden auch Homodimere, Homotrimere, Heterodimere und Heterooligomere beschrieben (Baldrian, 2006; Edens *et al.*, 1999; Fernández-Larrea und Stahl, 1996; Giardina *et al.*, 2007). Der isoelektrische Punkt (pI) der meisten Laccasen liegt bei pH 4,0. Eine Vielzahl von Pilzen produziert mehrere Laccase-Formen, die sich zum Teil sehr ähnlich sind, aber auch stark in Struktur und Eigenschaften voneinander abweichen können. Mit 17 nichtallelen Laccase-Genen wurden im Genom des Basidiomyceten *Coprinopsis cinerea* die bislang höchste Anzahl von Isoenzymen identifiziert (Kilaru *et al.*, 2006). Die Produktion von Isoenzymen unterliegt häufig der differentialen Regulation (Palmieri *et al.*, 2000). Laccasen sind Glykoproteine mit einem durchschnittlichen Zuckergehalt von 10% bis 25% der Molmasse, allerdings sind Ausnahmen sowohl für geringere als auch höhere Glykosylierungsgrade bekannt (Baldrian, 2006). Die Glykosylierung der Laccasen stellt ein großes Problem für die Produktion der Enzyme in heterologen Expressionssystemen dar (Baldrian, 2006). Wie bereits erwähnt, gehören Laccasen zu den Multikupferoxidasen, wobei gewöhnlich 4 Kupferionen das katalytische Zentrum der Laccasen bilden.

1.2.2 Katalytische Eigenschaften

Der Mechanismus der Laccase-Katalyse läuft über die Reduktion der 4 im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisierten Kupferionen, das Typ-1-Kupfer, und die das trinukleare Cluster bildenden Typ-2- und Typ-3-Kupfer (Abb. 1).

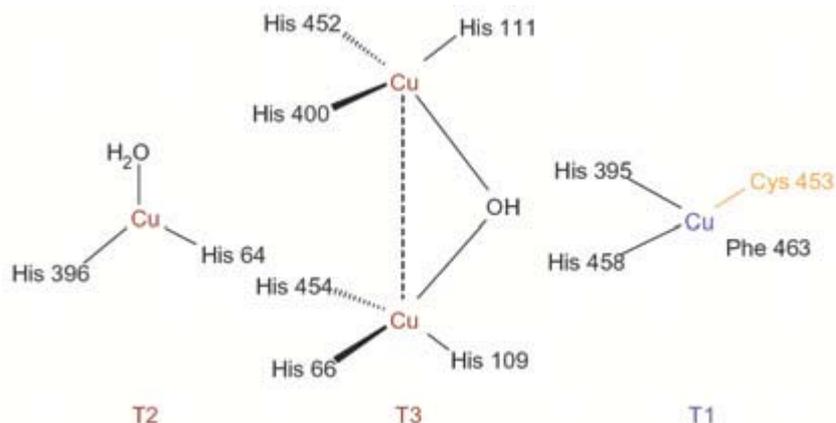


Abbildung 1 Katalytisches Zentrum einer Laccase von *Trametes versicolor* mit 4 Kupferatomen und den koordinierenden Aminosäuren. Dargestellt sind das Typ-1-Kupfer (T1) und das trinukleare Zentrum, das von Typ-2-Kupfer (T2) und Typ-3-Kupfer (T3) gebildet wird. (Riva, 2006)

Beginnend mit einer Ein-Elektronen-Oxidation, die das Substrat als Radikal freisetzt, wird ein Elektron auf das Typ-1-Kupfer im „native intermediate“ übertragen. Dieses Elektron wird auf das trinukleare Cluster transferiert und reduziert den dort bindenden Sauerstoff zu Wasser. Durch sukzessive Substratoxidation und Elektronenübertragung vom Typ-1-Kupfer auf das trinukleare Cluster wird die Oxidation von 4 Substratmolekülen an die Reduktion von einem Sauerstoffmolekül gekoppelt. Das Typ-1-Kupfer verleiht den Laccasen die charakteristische Absorption bei ca. 610 nm und ist damit für ihre Zuordnung zu den „blauen“ Multikupferoxidasen verantwortlich.

Das Substratspektrum der Laccasen umfasst Polyphenole, methoxylierte Phenole, Diamine (Thurston, 1994) und viele weitere Substanzklassen, wie beispielsweise Farbstoffe (Wesenberg *et al.*, 2003) und PAKs (Collins *et al.*, 1996). Prinzipiell können Laccase-Substrate in natürliche und synthetische Verbindungen eingeteilt werden. Zu den natürlichen Substraten zählen Phenol, Anilin, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzylalkohol (Johannes und Majcherczyk, 2000). Bekannte Vertreter der synthetischen Substrate sind N,N'-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzyliden)hydrazin (Syringaldazin), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat) (ABTS) und 1-Hydroxybenzotriazol (HBT) (Fabbrini *et al.*, 2002; Thurston, 1994). In thermodynamischer Hinsicht wird die Oxidation von Laccase-Substraten durch das Redoxpotenzial des Typ-1-Kupfers, das in Abhängigkeit vom Organismus zwischen 0,4 und 0,8 V gegenüber einer Normalwasserstoffelektrode liegt (Majcherczyk *et al.*, 1999), bestimmt. Redoxpotenzial-bedingte Limitationen des Substratspektrums können durch so genannte Redoxmediatoren überwunden werden. Darunter versteht man kleine, diffusionsfähige Moleküle, die als Laccase-Substrate dienen und in ihrer oxidierten Form Verbindungen, die durch Laccasen nicht direkt angegriffen werden, oxidieren. Redoxmediatoren wirken somit als Elektronenüberträger zwischen dem katalytischen Zentrum von Laccasen und der zu oxidierenden Verbindung (Abb. 2).

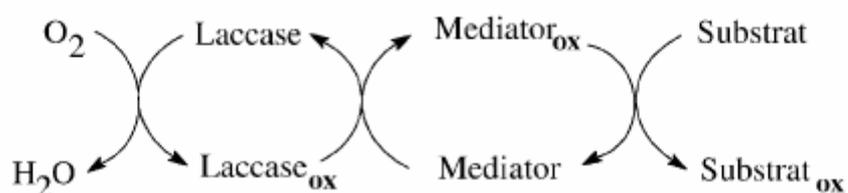


Abbildung 2 Schema des Laccase-Mediator-Systems (Fabbrini *et al.*, 2002).

Natürliche Verbindungen, wie beispielsweise Phenol, 3-Hydroxyanthranilat oder 4-Hydroxybenzoesäure, können als Mediator fungieren und werden von den Organismen selbst produziert (Eggert *et al.*, 1996; Johannes und Majcherczyk, 2000). Beispiele für die Wirkung von synthetischen Enzym-Mediator-Systemen sind Laccase-katalysierte

Oxidationen von PAKs (Baldrian, 2006; Johannes und Majcherczyk, 2000) und persistenten synthetischen Farbstoffen (Camarero *et al.*, 2005) in Gegenwart von ABTS und HBT. ABTS beschleunigte weiterhin die Laccase-katalysierte Oxidation von endokrin aktiven Substanzen wie dem technischen Nonylphenol und Bisphenol A. Dies wurde für Laccasen aus Lignin-abbauenden Basidiomyceten und zwei aquatischen Pilzen gezeigt (Junghanns *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2001).

1.3 Galaxolid[®] und Tonalid[®]

4,6,6,7,8,8-hexamethyl-1,3,4,6,7,8-hexahydrocyclopenta[g]isochromen (HHCB) mit dem Markennamen Galaxolid[®] und 1-(3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethanon (AHTN) mit dem Markennamen Tonalid[®] sind die zwei wichtigsten Vertreter der polycyclischen Moschusduftstoffe (pMD).

Der erste künstliche Moschusduftstoff wurde von Baur bereits 1890 durch Nitrierung von Butyltoluol synthetisiert. Die daraus hervorgegangenen Nitromoschusduftstoffe, wie „Musk xylene“ oder „Musk ambrette“, dominierten den Markt bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts. Als bekannt wurde, dass Nitromoschusduftstoffe zur Bildung kanzerogener aromatischer Amine führen, photoallergische Reaktionen auslösen können und zudem in Fisch- und Gewässerproben nachgewiesen wurden, reagierte die Industrie vor allem in Europa (Barbetta *et al.*, 1988; Sommer, 2004). Die Produktion der Nitromoschusduftstoffe wurde gedrosselt und die seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts bekannten polycyclischen Moschusduftstoffe übernahmen zunehmend Marktanteile. Bereits 1996 lag dieser bei 70% (Rimkus, 1999). Der weltweite Verbrauch von pMDs belief sich im Jahr 2000 auf 10.000 t mit weiter steigendem Trend (Somogyi und Kishi, 2001).

1.3.1 Vorkommen in der aquatischen Umwelt und Risikopotenzial

Polycyclische Moschusduftstoffe werden unter anderem Körperpflegeprodukten und Detergenzien zur Geruchsgebung beigefügt. Parfüme beispielsweise enthalten bis zu 4990 µg/g HHCB und 450 µg/g AHTN, Shampoos bis zu 122 µg/g HHCB und 13,2 µg/g AHTN (Reiner und Kannan, 2006). Viele dieser Produkte werden durch Industrie- und kommunale Abwässer in Kläranlagen eingetragen. Die Konzentrationen von HHCB und AHTN in ungeklärten Abwässern variieren geographisch. In Europa liegen die Werte durchschnittlich bei 10 µg/L für HHCB und 6 µg/L für AHTN, während in den USA fast die doppelten Mengen detektiert wurden (Simonich *et al.*, 2002). In Deutschland gibt es starke regionale Unterschiede. So sind die Gehalte der Duftstoffe in Kläranlagenausläufen und in Oberflächengewässern in Berlin (HHCB bis zu 12,5 µg/L; AHTN 6,8 µg/L) deutlich höher als im Ruhrgebiet (HHCB bis zu 0,7 µg/L; AHTN 0,2 µg/L) (Bester, 2004; Heberer, 2003). Die Größenordnungen, in denen die Duftstoffe in Berlin und Umgebung detektiert

wurden, entsprechen denen der PAKs und übertreffen sogar die der Pestizide (Winkler *et al.*, 1998). Auf Grund ihrer hydrophoben Natur sorbieren die Substanzen mit sehr hohen Konzentrationen von durchschnittlich 500 mg/kg an Sedimenten (Heraproject, 2004; Rimkus, 1999).

Polycyclische Moschusduftstoffe stellen für Organismen auf Grund ihrer hohen Bioakkumulation ein Risiko dar. Die erste Publikation zur Detektion von HHCB und AHTN in Lebewesen wurde bereits 1994 von Eschke veröffentlicht, der die Duftstoffe in Gewebeproben von Fischen detektieren konnte (Eschke *et al.*, 1994). Dem folgten Nachweise über Bioakkumulation in Muscheln, in wasserlebenden Säugetieren und in Wasservögeln (Balk und Ford, 1999; Gatermann *et al.*, 2002; Kannan *et al.*, 2005; Nakata, 2005). Auf Grund des ständigen Hautkontaktes wurden beide Substanzen im menschlichen Fettgewebe und in Muttermilch wieder gefunden (Rimkus und Wolf, 1996). Toxikologische Untersuchungen zu HHCB und AHTN ergaben, dass weder HHCB noch AHTN mutagen sind oder allgemein genotoxisch wirken (Mersch-Sundermann *et al.*, 1998). Entgegen früherer Annahmen, dass die Umweltkonzentrationen zu gering seien, um eine Gefahr für Mensch und Umwelt darzustellen (Seinen *et al.*, 1999), inhibierten sowohl HHCB als auch AHTN Transporter des Multi-Xenobiotic-Resistance (MXR) Mechanismus in der Meeresmuschel *Mytilus californianus* (Luckenbach *et al.*, 2004). Damit fördern sie die Akkumulation von Giftstoffen in Zellen. Außerdem hemmen HHCB und AHTN die Larvenentwicklung von Ruderfußkrebsen in nanomolaren Konzentrationen (Wollenberger *et al.*, 2003). Eine einmalige sehr hohe Dosis von AHTN bewirkte Leberschäden bei Ratten (Steinberg *et al.*, 1999). Beide Substanzen rufen in hohen Konzentrationen schwache endokrine Effekte in menschlichen Nierenzellen hervor, wohingegen antiöstrogene Aktivitäten abhängig von der Zellart auch bei geringen Konzentrationen auftraten (Bitsch *et al.*, 2002; Schreurs *et al.*, 2002; Seinen *et al.*, 1999). Dies verdeutlicht, dass das Risiko einer Beeinträchtigung von Mensch und Umwelt durch HHCB und AHTN gegeben ist. Derzeit gibt es jedoch keinen finanziell attraktiven Ersatz für polycyclische Moschusduftstoffe, da die Synthese von bereits entwickelten, makrocyclischen Duftstoffen sehr aufwändig ist. Aktuell wird an linearen Substanzen, die von den 347 menschlichen, olfaktorischen Rezeptoren erkannt werden können (Kraft, 2004), geforscht.

1.3.2 Abbau, Biotransformation und Umweltverhalten

In herkömmlichen Kläranlagen mit Aktivschlammbecken wurden Konzentrationsabnahmen zwischen 50 und 88% für HHCB und AHTN gemessen (Bester, 2004; Simonich *et al.*, 2002). Die semi-polaren Eigenschaften beider Verbindungen ($\lg K_{ow} = 5,9$ für HHCB und $\lg K_{ow} = 5,7$ für AHTN) (Wormuth *et al.*, 2005) und ihre relativ

geringe Wasserlöslichkeit (1,75 mg/L für HHCB und 1,25 mg/L für AHTN) (Wormuth *et al.*, 2005) unterstützen die Sorption an Klärschlammteilchen. Dort wurden durchschnittliche Konzentrationen im zweistelligen mg/kg-Bereich detektiert (Rimkus, 1999; Ternes *et al.*, 2004). Die Bilanzierung zweier Kläranlagen in der Schweiz, die zusätzlich Bioreaktoren in die Abwasserbehandlung integrieren, ergab für HHCB eine geringe Biotransformation, wobei wiederum der Großteil der Konzentrationsabnahme auf Sorption beruhte (Joss *et al.*, 2005). Der biologische Abbau hat demzufolge keinen großen Anteil an der Abnahme der Duftstoffkonzentrationen in Klärwässern.

Standardtests zur biologischen Abbaubarkeit von HHCB und AHTN, die den OECD-Richtlinien folgten, ergaben keine signifikante Mineralisierung beider Verbindungen (Balk und Ford, 1999). Jedoch zeigten bei der Untersuchung von 64 Böden (Sand, Ton, Lehm und Torf) auf biologische Aktivität gegenüber HHCB und AHTN 40% der Proben das Potential zur Biotransformation (Balk und Ford, 1999). Weiterhin wurden terrestrische Pilzstämme beschrieben, die AHTN (*Phanerochaete chrysosporium*) und HHCB (*Cladosporium cladosporioides*) zu polarerer Metaboliten transformieren, aber nicht mineralisieren (Balk und Ford, 1999). Derzeit existieren keine Studien zum biologischen Abbau der Substanzen in aquatischen Ökosystemen. Detailliert beschrieben sind jedoch abiotische Transformationsmechanismen für HHCB und AHTN unter photooxidativen Bedingungen, wobei sich HHCB als resistenter gegenüber dem photochemischen Abbau erwies (Biselli *et al.*, 2004; Sanchez-Prado *et al.*, 2004).

Der einzige in der Literatur bekannte Metabolit des HHCB ist das HHCB-Lacton. Es wurde sowohl in Abwässern (230 ng/L) und Kläranlagenausläufen (370 ng/L) als auch in kommerziellen, HHCB-enthaltenden Produkten detektiert (Bester, 2004; Franke *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise auf die Bildung des Lactons durch abiotische (Autoxidation, Photooxidation) aber auch durch biotische Prozesse (Itrich *et al.*, 1998). So wurde HHCB während der Abwasserbehandlung (Bester, 2005) und in Fischen (Hühnerfuss, 2004) zum Lacton oxidiert. Ein Enzym, das die Bildung des HHCB-Lacton katalysiert, wurde bisher nicht beschrieben.

Peck und Hornbuckle (2006) haben für den Michigansee (USA) eine Ein- und Austragsbilanz für beide Moschusduftstoffe aufgestellt. Dabei wurden als Eintragswege Kläranlagenwässer und zu einem geringen Anteil atmosphärische Niederschläge identifiziert. Als Prozesse, die zur Erniedrigung der Duftstoffkonzentration im freien Wasserkörper beitragen, wurden Sedimentation, Volatilisierung, Photolyse und Abfluss berücksichtigt. Dabei stellt Sedimentation einen wichtigen Prozess für den Verbleib von HHCB und AHTN im See dar. Die Bilanzierung der Ein- und Austräge weist allerdings eine Differenz von rund 30% für beide Verbindungen auf. Diese könnte durch die Berücksichtigung eines denkbaren biologischen Abbaus geschlossen werden.

Als Resümee der bisherigen Arbeiten zum Umweltverhalten von HHCB und AHTN lässt sich sagen, dass diese Duftstoffe in der Umwelt persistent sind und Organismen, die ihren Abbau in aquatischen Ökosystemen katalysieren könnten, bislang nicht identifiziert wurden.

1.4 Technisches Nonylphenol (t-NP)

Technisches Nonylphenol dient als Ausgangsstoff für die Synthese von Nonylphenolyethoxylaten (NPEO), die als nichtionische Tenside in vielen industriellen Prozessen, unter anderem in der Leder- und Textilherstellung, vorwiegend jedoch als Zusatz von Detergenzien (Vallini *et al.*, 2001), eingesetzt werden. Sie bilden die wichtigste Gruppe der Alkylphenoethoxylate, von denen 1995 rund 500.000 t weltweit hergestellt wurden (Fries und Püttmann, 2003). Nonylphenol ist das Produkt einer Friedel-Crafts-Alkylierung von 4-Phenol und Nonen (Rothman, 1982), wobei das in der industriellen Synthese eingesetzte Nonen kein lineares Alken ist, sondern ein Gemisch verzweigter Isomere. Dadurch ergibt sich eine strukturelle Vielfalt verschiedener Isomere im t-NP und der daraus synthetisierten NPEOs.

1.4.1 Vorkommen in der aquatischen Umwelt und Risikopotenzial

Technisches Nonylphenol gelangt hauptsächlich über zwei Wege in die aquatische Umwelt. Neben monomeren und dimeren Nonylphenoethoxylaten ist Nonylphenol ein biologisches Abbauprodukt der NPEOs in Kläranlagen, über deren Ausläufe die Verbindung direkt in die natürlichen Ökosysteme entlassen wird (Vallini *et al.*, 2001). Die Konzentration von Nonylphenol (NP) in Kläranlagenausläufen liegt im µg/L-Bereich (Ying *et al.*, 2002). Ferner ist Nonylphenol Bestandteil von Pflanzenschutzmitteln in der Agrarwirtschaft. Allein in Österreich gelangten 2003 auf diese Weise 40 t des Schadstoffs in den Boden und durch Auswaschungseffekte in die aquatische Umwelt (Bursch *et al.*, 2004). In Westeuropa existiert seit 1986 ein freiwilliges Abkommen der Industrie, das den Einsatz von NPEOs für Industrie- und Haushaltreiniger einschränkt (Bursch *et al.*, 2004). Hierzulande liegen die durchschnittlichen NP-Konzentrationen in Flüssen im dreistelligen ng/L-Bereich (Heemken *et al.*, 2001; Lalah *et al.*, 2003b). Die deutschlandweit höchsten Werte des Jahres 2000 wurden im Rhein bei Rüsselsheim (567 ng/L) und in der Oder bei Küstrin (737 ng/L) gemessen (Fries und Püttmann, 2003). Die EU legte die „Predicted No Effect Concentration“ (PNEC) für Nonylphenol auf 330 ng/L fest (Servos, 1999). Im „EU Commission Proposal“ COM(2006)397 aus dem Jahre 2006 wird t-NP als prioritäre, gefährliche Substanz eingestuft. In den USA werden jedoch weiterhin NPEOs auf Grund ihrer Eigenschaften in industriellen Prozessen eingesetzt (Lalah *et al.*, 2003b).

Nonylphenol ist eine endokrin aktive Verbindung, die die Wirkung von Östrogenen durch die Bindung an die entsprechenden Rezeptoren imitiert. Dabei werden östrogene Effekte hervorgerufen, wie in aquatischen Organismen nachgewiesen werden konnte (Lalah *et al.*, 2003a; Schwaiger *et al.*, 2002). Für die Bindung an den Rezeptor ist die verzweigte Alkylkette in *para*-Position entscheidend (Tabira *et al.*, 1999), wobei vermutlich ein höherer Verzweigungsgrad zu erhöhter endokriner Aktivität führt (Kim *et al.*, 2004). Neben dem Auslösen östrogener Effekte besteht ein akut toxikologisches Potenzial, das sich z. B. in Anämien und Verhaltensauffälligkeiten von Fischen äußerte (Schwaiger *et al.*, 2002; Spieser *et al.*, 2000). Ab einer Konzentration von 100 µM wirkt NP toxisch auf das Wurzelwachstum von *Lupinus hartwegii* (Bokern *et al.*, 1998). Die akuten Toxizitäten von Nonylphenol, die für Fische (17-3000 µg/L), Invertebraten (20-3000 µg/L) und Algen (27-2500 µg/L) bestimmt wurden (Servos, 1999), liegen weit über den detektierten Gewässerkonzentrationen.

1.4.2 Abbau und Biotransformation

Technisches Nonylphenol wird von Bakterien (Corvini *et al.*, 2004; Gabriel *et al.*, 2005a), Hefen (Vallini *et al.*, 2001), Pilzen (Junghanns *et al.*, 2005; Kollmann *et al.*, 2003), Pflanzenzellen (Schmidt *et al.*, 2003), Invertebraten (Lalah *et al.*, 2003a) und Fischen (Meldahl *et al.*, 1996) metabolisiert. Bei der Biotransformation von t-NP durch den aquatischen Hyphomyceten *C. aquatica* und das mitospore aquatische Isolat UHH 1-6-18-4 wurden zwei Gruppen oxidierter Produkte detektiert (Junghanns *et al.*, 2005; Moeder *et al.*, 2006). Einerseits handelte es sich um Monohydroxylierungen einzelner NP-Isomere, die auf eine subterminale Oxidation der Nonylkette hindeuten. Diese Oxidationsprodukte wurden sowohl für verzweigte Nonylphenolisomere als auch für das nicht im technischen Gemisch vorkommende 4-n-Nonylphenol bei anderen eukaryotischen Modellsystemen wie Fischen (Meldahl *et al.*, 1996) und Pflanzen (Schmidt *et al.*, 2003) beschrieben. Der zweiten Metabolitgruppe gehören phenolische Substanzen mit verkürzten Alkylketten an, die auf einen teilweisen Abbau der hydroxylierten Seitenkette hinweisen (Junghanns *et al.*, 2005). In Kulturen des Stammes UHH 1-6-18-4, die mit t-NP inkubiert wurden, konnte 4-Hydroxybenzoesäure detektiert werden, die möglicher Weise das Endprodukt der Seitenkettenoxidation darstellt (Junghanns *et al.*, 2005). Die Hefe *Candida aquatextoris* setzt das nicht umweltrelevante 4-n-Nonylphenol zu *trans*-4-Hydroxycimtsäure und 4-Hydroxyacetophenon um, wobei es sich vermutlich um eine ω - und anschließende β -Oxidation der Seitenkette handelt (Vallini *et al.*, 2001). Weder aquatische Pilze, noch *C. aquatextoris* zeigten Hinweise auf die Oxidation des phenolischen Teils von NP, der für den bakteriellen Abbau von NP-Isomeren mit verschiedenen *Sphingomonas*-Stämmen beschrieben wurde (Corvini *et al.*, 2005; Gabriel

et al., 2005b). Über einen ungewöhnlichen *ipso*-Substitutionsmechanismus wurden dabei chinoide Derivate und Hydrochinon als stabiles Intermediat gebildet. Die Abspaltung der kompletten Alkylseitenkette konnte durch Detektion der entsprechenden Nonanole, die bei der Umsetzung durch *Sphingomonas*-Stämme entstanden, nachgewiesen werden (Gabriel *et al.*, 2005a; Tanghe *et al.*, 2000). Ein mögliches Zusammenspiel von Pilzen und Bakterien bei der Umsetzung von t-NP in der aquatischen Umwelt stellt sich damit als eine relevante Thematik heraus.

1.4.3 Die Komplexität von t-NP als analytische Herausforderung

Die Aufklärung der Zusammensetzung des umweltrelevanten t-NP ist zum Einen für toxikologische Betrachtungen und zum Anderen für Mechanismusuntersuchungen der Biotransformation wichtig. Dabei bedarf es zur Separierung der physikalisch kaum unterscheidbaren Konfigurationsisomere einer analytischen Methode mit hoher Trennleistung. Es gibt mittlerweile viel versprechende Ansätze, um die Zusammensetzung des technischen Gemischs aufzuklären (Gundersen, 2001; He und Lee, 1996; Ieda *et al.*, 2005; Thiele *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 1997). Die meisten dieser Methoden basieren auf einer gaschromatographischen (GC) Trennung und anschließender Detektion mit einem Massenspektrometer. Der Vorteil dieser Kopplung ist die hohe Trennleistung der GC und die Möglichkeit, strukturelle Informationen über die Isomere durch Auswertung der spektrometrischen Daten zu gewinnen. Bislang gibt es jedoch keine Methode oder Kombination von Methoden, um das Gemisch vollständig zu charakterisieren.

Die Synthese von NP-Isomeren als Referenzmaterial stellt einen weiterführenden Ansatz dar, der zur Lösung des komplexen analytischen Problems beiträgt. 4-(1-Ethyl-1,4-dimethylpentyl)phenol (NP1), 4-(1,1,5-Trimethylhexyl)phenol (NP2) und 4-(1-Ethyl-1,3-dimethylpentyl)phenol (NP3) sind Beispiele für synthetisierte NP-Isomere. Ihre Anteile im technischen Gemisch liegen bei 13% (NP1), 5% (NP2) und 20% (NP3), womit NP1 und NP3 neben 4-(1,1,3-Trimethylhexyl)phenol die Isomere mit den höchsten Anteilen sind (Russ, 2005). Folglich können alle 3 Isomere als charakteristisch für t-NP angesehen werden. NP1 besitzt, verglichen mit dem Durchschnitt der Isomere des technischen Gemischs, eine höhere Wasserlöslichkeit und dementsprechend geringere Oktanol-Wasser- und Luft-Wasser-Verteilungskoeffizienten, weshalb eine verringerte Persistenz von NP1 in wässrigen Medien zu erwarten ist. Von allen untersuchten NP-Einzelisomeren wies NP2 eine der höchsten endokrinen Wirkungen in Tests mit menschlichen Brustkrebszelllinien auf (Corvini *et al.*, 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den bisher wenig beachteten Einfluss aquatischer Pilze auf die Biotransformation von organischen Umweltkontaminanten anhand von ausgewählten umweltrelevanten Beispielen unterschiedlicher Mikroschadstoffe detailliert zu untersuchen. Neben der Identifizierung von Biotransformationsmetaboliten und den daran beteiligten Mechanismen sollten Aussagen zur möglichen Rolle der Pilze und ihrer extrazellulären Laccasen, bei biologischen Selbstreinigungsprozessen in Oberflächenwässern gewonnen werden.

Bei den verwendeten Modellorganismen handelt es sich um den aquatischen Hyphomyceten *Clavariopsis aquatica* Stamm WD(A)-00-01, der aus dem Steinbach in der Nähe von Waldau (Sachsen-Anhalt) isoliert wurde (Junghanns *et al.*, 2005), sowie um den *Myrioconium* sp. Stamm UHH 1-13-18-4, der aus der Saale in der Nähe von Halle (Sachsen-Anhalt) stammt (Junghanns *et al.*, 2008). Beide Stämme sind mitospore Pilze, wobei die Teleomorphe von *C. aquatica* in die Ascomyceten-Gattung *Massarina* eingeordnet wird (Junghanns *et al.*, 2008). Anhand von Sequenzierungen der ITS-Regionen und dem 5'-Ende der 28S rDNA kann *Myrioconium* sp. den *Helotiales*, *Ascomycota*, zugeordnet werden (Junghanns *et al.*, 2008). Mit *C. aquatica* wurde somit ein obligat aquatischer Pilz ausgewählt, während für *Myrioconium* sp. eine ubiquitäre Verbreitung denkbar ist. Sowohl *C. aquatica* als auch *Myrioconium* sp. bilden Laccasen, deren mögliche Funktion bei der Biotransformation der untersuchten Mikrokontaminanten betrachtet werden sollte.

Die Auswahl der Schadstoffe umfasste die zwei wichtigsten Vertreter der synthetischen Moschusduftstoffe HHCB und AHTN und das endokrin aktive, technische NP-Gemisch. Die Biotransformation der genannten Verbindungen sollte durch Detektion und Beschreibung von Metaboliten belegt und mögliche Metabolisierungswege damit näher charakterisiert werden. Die Untersuchung des komplexen t-NP-Isomerenmischs stellte zusätzlich eine analytische Herausforderung dar, die durch die Anwendung verschiedener gaschromatographischer Methoden und den Einsatz von synthetisierten Einzelisomeren gelöst werden sollte.

2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe durch aquatische Pilze

Martin, C., M. Moeder, X. Daniel, G. Krauss, 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.

Das Wissen über die Biotransformation und dabei entstehende Produkte der beiden Hauptvertreter der pMDs HHCB und AHTN, deren Vorkommen in der aquatischen Umwelt durchaus ein Risiko darstellt, ist unzureichend. Bisher wurde kein Bakterienstamm isoliert, der HHCB oder AHTN umsetzt, wohingegen Reinkulturen terrestrischer Pilze beschrieben wurden, die beide Schadstoffe transformieren, aber nicht mineralisieren. Detaillierte Aussagen zur biologischen Bildung von Metaboliten sind nur begrenzt verfügbar. Das folgende Kapitel fokussiert auf die Umsetzung der Duftstoffe durch aquatische Pilze. Dabei wurde die Biotransformation sowohl *in vivo* durch aktive Pilzkulturen als auch *in vitro* durch die extrazellulären Laccasen der Pilze untersucht und entstandene Metabolite detektiert und strukturell analysiert.

2.1 Biotransformation von HHCB und AHTN in Pilzkulturen

In aktiven *Myriocoonium* sp. Kulturen nahm die Konzentration von HHCB im Verlauf einer Inkubation über 29 Tage von anfänglich 250 μM auf $24,3 \pm 4,4 \mu\text{M}$ und die von AHTN auf $10,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Parallelen) ab. In den mit NaN_3 inaktivierten Kontrollkulturen wurden am Ende des Versuchs 65% HHCB bzw. 71% AHTN, bezogen auf die jeweilige Ausgangskonzentration von 250 μM , wieder gefunden. In aktiven *C. aquatica* Kulturen sank die eingesetzte Konzentration von 250 μM nach 40 Tagen auf $60,8 \pm 7,4 \mu\text{M}$ für HHCB und auf $31,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ für AHTN. Die Wiederfindungsraten in den parallel mitgeführten Kontrollansätzen lagen für HHCB und AHTN bei 78% und 71%, wiederum bezogen auf die jeweilige Ausgangskonzentration. Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen der Duftstoffe wurden die Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion 1. Ordnung bestimmt. Die abiotische Transformation (k_a) von HHCB und AHTN ergab sich aus den Daten der biologisch inaktiven Kontrollansätze. Zur Ermittlung der biotischen Transformation (k_b) wurde die Differenz aus der beobachteten Geschwindigkeitskonstante (k_{beob}) in den aktiven Kulturen und der abiotischen Geschwindigkeitskonstante k_a gebildet. Ausgehend von k_b ließen sich die Halbwertszeiten (DT_{50}) für die biologische Umsetzung der Duftstoffe bestimmen. Da sich die Abbaukinetiken in aktiven *C. aquatica* Kulturen nicht als Reaktion 1. Ordnung beschreiben ließen, wurden nur für die Duftstoffumsetzung in *Myriocoonium* sp. Kulturen DT_{50} Werte ermittelt. Während die abiotischen Geschwindigkeitskonstanten von HHCB

2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe

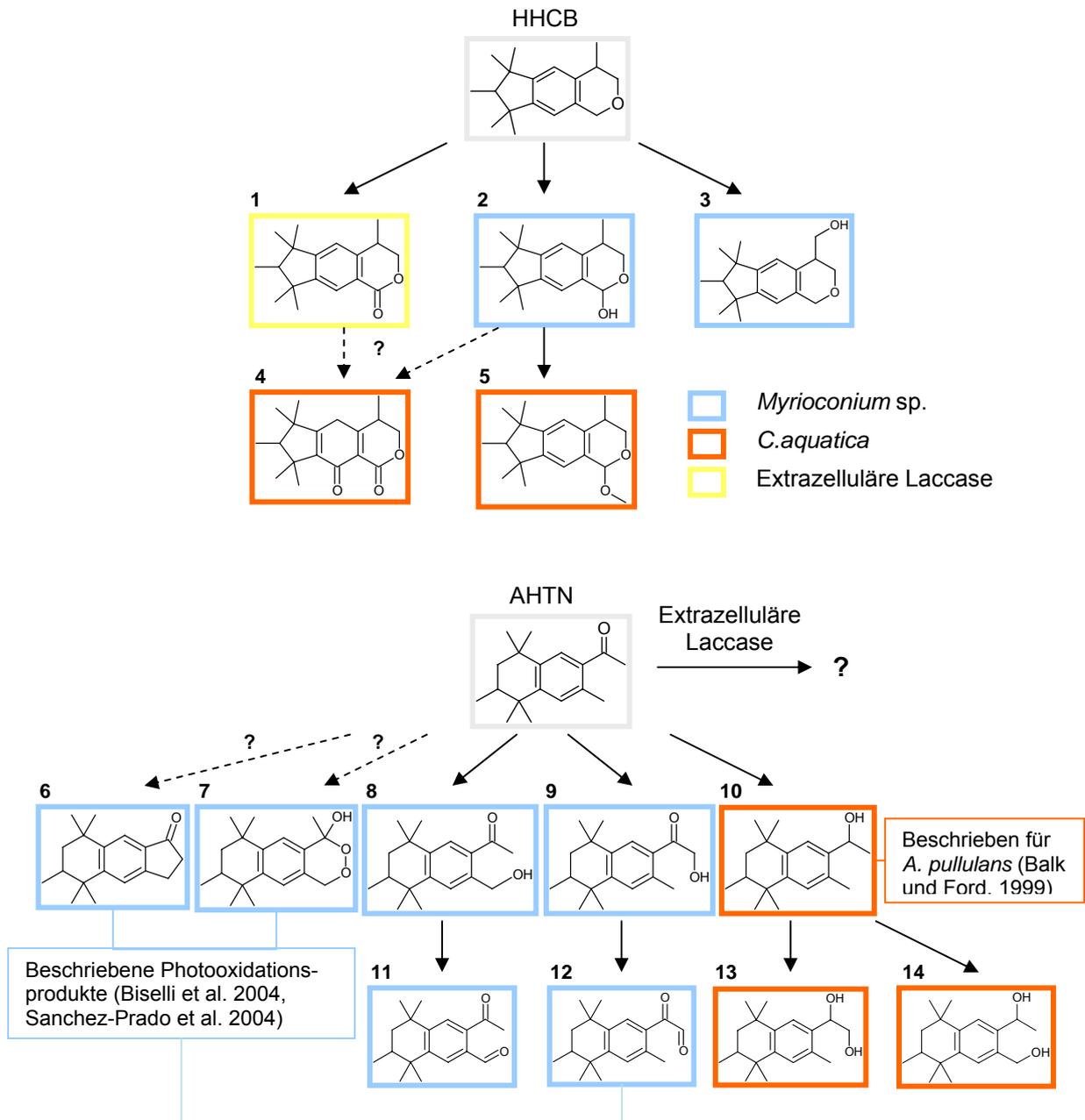
($k_a \approx 0$) zu vernachlässigen waren, nahm die Konzentration von AHTN in Kontrollkulturen von *Myrioconium* sp. zu einem gewissen Prozentsatz ab ($k_a = 0,011 \pm 0,004 \text{ d}^{-1}$). Dies lässt sich vermutlich auf den photochemischen Abbau von AHTN (Buerge *et al.*, 2003) während der Probenahme oder -vorbereitung, bei der Lichteinstrahlung nicht vermieden werden konnte, zurückführen. Es ist bekannt, dass AHTN gegenüber Licht empfindlicher ist als HHCB (Buerge *et al.*, 2003). In Übereinstimmung damit wurden in *Myrioconium* sp. Kulturen AHTN-Metabolite detektiert, die für den photochemischen Abbau der Substanz beschrieben wurden (Biselli *et al.*, 2004; Sanchez-Prado *et al.*, 2004). Ausgehend von den k_{beob} -Werten ($0,075 \pm 0,004 \text{ d}^{-1}$ für HHCB und $0,112 \pm 0,018 \text{ d}^{-1}$ für AHTN) wurden für HHCB und AHTN k_b -Werte von $0,075 \text{ d}^{-1}$ und $0,101 \text{ d}^{-1}$ berechnet. Die sich daraus ergebenden DT_{50} -Werte von 9,2 Tagen für HHCB und 6,9 Tagen für AHTN zeigten, dass HHCB resistenter gegenüber *Myrioconium* sp. ist. Der gleiche Effekt wurde bei höheren Eukaryoten wie z. B. dem blauen Sonnenbarsch beobachtet, dabei wurden Abnahmeraten von $0,215$ bis $0,261 \text{ d}^{-1}$ und $0,337$ bis $0,577 \text{ d}^{-1}$ für HHCB und AHTN detektiert (Balk und Ford, 1999). Der terrestrische Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* setzte, im Gegensatz dazu, HHCB in 3 und AHTN in 6 Tagen komplett um (Balk und Ford, 1999).

Bei der GC-MS-Analyse von HHCB-haltigen Pilzkulturextrakten und unbehandelten HHCB-Lösungen wurde eine Verbindung detektiert, deren Molekül-Ion von m/z 272 (Schema 1: 1) und charakteristische Fragment-Ionen auf den HHCB-Metaboliten HHCB-Lacton hinwiesen. Die Identität des HHCB-Lactons konnte mittels Infrarotspektroskopie und GC-MS/MS Experimenten bestätigt werden. In HHCB-enthaltenden Kontrollen von *Myrioconium* sp. stieg die Anfangskonzentration des HHCB-Lactons innerhalb von 28 Tagen nach Zugabe von HHCB um rund 100% an. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass das Lacton abiotisch durch HHCB-Autoxidation gebildet werden kann (Franke *et al.*, 1999). In aktiven *Myrioconium* sp. Kulturen wurden nur rund 2% der HHCB-Lacton-Konzentration der Kontrollen wiedergefunden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass *Myrioconium* sp. den Metaboliten umsetzt. Im Gegensatz dazu war die Endkonzentration des Lactons in aktiven *C. aquatica* Kulturen und den entsprechenden Kontrollen fast identisch. Als Ursachen hierfür kommen entweder ein Gleichgewicht zwischen biochemischen Bildungs- und Abbaureaktionen des Lactons oder das Unvermögen von *C. aquatica*, das auf abiotische Weise gebildete HHCB-Lacton weiter umzusetzen, in Betracht. Für terrestrische Pilze wie *Cladosporium cladosporioides* und *P. chrysosporium* wurde die Bildung von HHCB-Lacton aus HHCB bereits beschrieben (Balk und Ford, 1999).

Die mittels GC-MS erhaltenen spektrometrischen Daten bildeten die Grundlage für die Strukturvorschläge der weiteren für HHCB und AHTN nachgewiesenen Metaboliten.

2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe

Diese Verbindungen traten weder in den unbehandelten Stammlösungen der Duftstoffe noch in Pilzkulturen auf, die keine Duftstoffe enthielten. Die Strukturvorschläge und die vermutliche Entstehung der Metabolite sind in Schema 1 dargestellt.



Schema 1 Vorschläge für HHCB- und AHTN-Metabolitstrukturen und deren Bildungsweg in aktiven Kulturen von *Myrioconium sp.* und *C. aquatica*, sowie in Laccase-haltigen, aufkonzentrierten Kulturüberständen von *Myrioconium sp.* Auf die Zahlen 1-14 wird in Abschnitt 2.1 Bezug genommen.

Auf die vermutete Beteiligung der extrazellulären Laccase an der Bildung von HHCB-Lacton (Schema 1: **1**) wird in Abschnitt 2.2. eingegangen. Für die anderen in Schema 1 aufgeführten Metabolite können intrazelluläre Bildungsprozesse angenommen werden. Die Ableitung der Strukturvorschläge in Schema 1 soll im Folgenden für das Beispiel der

2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe

Metabolite **2** und **3** erläutert werden. Detaillierte Erläuterungen zu den Strukturvorschlägen der in Schema 1 aufgeführten Metabolite sind in Martin et al. (2007) sowie in der Supplementary Information zu dieser Publikation beschrieben. Beide Produkte besitzen ein Molekül-Ion mit m/z 274, unterscheiden sich jedoch leicht in ihren MS-Fragmentationsmustern, die auf eine Hydroxylierung hindeuten. Durch Derivatisierung mit Sylon BTZ konnte bestätigt werden, dass es sich tatsächlich um monohydroxylierte Verbindungen handelt. Eine Hydroxylierung an der Cyclopentan-Einheit würde durch die Methylsubstituenten möglicherweise sterisch behindert und erscheint daher als wenig wahrscheinlich. Ebenfalls unwahrscheinlich ist die Hydroxylierung des aromatischen Ringes, da die typischen MS-Fragmente für eine solche Substitution, wie z. B. solche, die die Abspaltung von $-CO$ und $-CHO$ anzeigen würden, nicht beobachtet wurden. Ausgehend von diesen Überlegungen wurden Strukturen mit einer Hydroxylierung an der Isochromen-Einheit des HHCB für die Metabolite **2** und **3** vorgeschlagen.

Die möglichen biologischen Effekte, die von den gebildeten HHCB- und AHTN-Metaboliten ausgehen könnten, bedürfen weiterer Aufklärung.

2.2 Oxidation von HHCB und AHTN durch isolierte Laccasen

Laccase-enthaltende Konzentrate der Kulturüberstände von *Myriocoonium* sp. und *C. aquatica* und die detailliert beschriebene, kommerzielle Laccase von *T. versicolor* wurden für die Untersuchung der Reaktion des Enzyms gegenüber Duftstoffen erstmalig getestet. Die Laccase-Produktion in *Myriocoonium* sp. Kulturen ist Gegenstand von Kapitel 4. Die Produktion von *C. aquatica* Laccase wurde in Junghanns *et al.* (2005) beschrieben. Die Biotransformation in Laccase-Konzentraten wurde anhand der Konzentrationen von HHCB und AHTN zu Beginn und nach 6 Tagen Inkubation mit der Enzymlyösung erfasst. Dabei zeigte sich, dass die *T. versicolor* Laccase die Duftstoffe am effizientesten abbaut (76,8% und 57,3% Konzentrationsabnahme für HHCB und AHTN), gefolgt von Laccase aus *Myriocoonium* sp. (30,5% HHCB und 12,3% AHTN). In den Ansätzen mit *C. aquatica* Laccase wurde keine signifikante Umsetzung der Duftstoffe detektiert. Die unterschiedlichen Konzentrationsabnahmen könnten in direktem Zusammenhang mit den Redoxpotenzialen der einzelnen Laccasen stehen, die einen limitierenden Faktor bei der Katalyse durch Laccase darstellen (Xu, 1997).

Mit Hilfe von Redoxmediatoren kann diese Limitation umgangen werden. Als typisches Laccase-Substrat wurde der Einfluss von ABTS als Redoxmediator bei der enzymatischen Oxidation von HHCB und AHTN untersucht. Die Zugabe von ABTS führte zu einer Umsetzung von 33% HHCB durch *C. aquatica* Laccase, verringerte jedoch die Konzentrationsabnahme von HHCB durch *Myriocoonium* sp. Laccase auf 16,3% im Vergleich zur Kontrolle. Als mögliche Ursache dafür könnte die Konkurrenz von HHCB

2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe

und dessen primären Abbauprodukt(en) um ABTS-Radikale angesehen werden. Im Gegensatz dazu wird die Umsetzung von AHTN durch *Myrioconium* sp. Laccase in Anwesenheit von ABTS verbessert (27,1%), allerdings bleibt die Resistenz von AHTN gegenüber *C. aquatica* Laccase auch mit ABTS bestehen. Dies verdeutlicht, dass die Laccase-katalysierte Oxidation von HHCB und AHTN durch Redoxmediatoren unter bestimmten Bedingungen erhöht werden kann. Natürliche Redoxmediatoren, die vom Organismus selbst gebildet werden, wurden für Weißfäulepilze beschrieben (Johannes und Majcherczyk, 2000).

Nach 6 Tagen Inkubation mit *T. versicolor*, *Myrioconium* sp. und *C. aquatica* Laccase erhöhten sich in HHCB-haltigen Enzymansätzen ohne den Zusatz von ABTS die HHCB-Lacton-Konzentrationen auf 780%, 353% und 198% (Vergleich zu inaktiven Kontrollen). Diese Beobachtung korreliert mit den HHCB-Umsetzungseffizienzen der einzelnen Laccasen in Abwesenheit von ABTS. Überdies zeigt es, dass Laccasen HHCB oxidieren und damit erstmalig, dass ein Enzym die Reaktion zum HHCB-Lacton katalysiert. Bisher war die Bildung des Lactons aus photochemischen Experimenten bekannt (Biselli *et al.*, 2004) und es wurde angenommen, dass Autoxidation als abiotischer und enzymatische Oxidation als biotischer Prozess zu gleichen Teilen an der Entstehung des Metaboliten z. B. in Klärsystemen beteiligt sind (Biselli *et al.*, 2004; Franke *et al.*, 1999; Itrich *et al.*, 1998). Mit der bislang unbekanntem Erkenntnis, dass pilzliche Laccasen das HHCB-Lactons bilden, war es erstmalig möglich, einen Reaktionsmechanismus zu entwickeln. Bei diesem katalysiert die Laccase im ersten Schritt die Radikalbildung von HHCB durch eine Ein-Elektronen-Oxidation unter gleichzeitiger Freisetzung eines Protons. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für die Laccase-Oxidation von phenolischen Verbindungen bekannt (Xu, 1997). Die enzymatische Initialisierung ermöglicht abiotische Folgereaktionen wie Sauerstoffaddition, Peroxidbildung und Wasserabspaltung, die letztendlich zur Bildung des HHCB-Lactons führen und bereits vorgeschlagen wurden (Biselli *et al.*, 2004).

Bei der Umsetzung von AHTN durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Laccasen wurden keine Metabolite detektiert. Potenzielle oxidative Kopplungsprodukte der Oxidation von HHCB und AHTN durch Laccase hätten mit der angewandten Analysemethoden (GC-MS, Detektion des Massenbereiches von 50-500 amu) nicht erfasst werden können.

Zusätzlich zu den bisher unbekanntem intrazellulären Enzymen könnte die Laccase, wenn sie in ausreichenden Mengen produziert wird, zur Biotransformation von HHCB und AHTN durch aquatische Pilze beitragen. Laccasen werden zunehmend auch für Bakterien beschrieben (Claus, 2003), wodurch ihre potenzielle Rolle für Umweltprozesse auch auf weitere Mikroorganismengruppen ausgeweitet wird.

2.3 Implikationen für den Einfluss von Pilzen auf das Umweltverhalten von polycyclischen Moschusduftstoffen in natürlichen aquatischen Systemen

Pilze gelten als wichtige Zersetzer von organischem Pflanzenmaterial in stehenden und fließenden Süßwassersystemen (Findlay *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2006). In Umgebungen, in denen ausreichend Nährstoffe vorhanden sind und genügend Sauerstoff verfügbar ist, z. B. in den oberen Sedimentschichten von Bächen und Flüssen oder in den ufernahen Sedimenten von Seen, könnten diese Organismen Wasserschadstoffe co-metabolisch umsetzen. Findlay *et al.* (2002) bestimmten für 9 US-amerikanische Flüsse den Anteil der Pilzbiomasse in grobem (Blattreste, Laub und Holzstücke) und feinem organischen Material, das mit der Flussbettfläche oder Sedimenten in einem Bereich von 2 bis 5 cm unter der Wasseroberfläche verbunden ist. Die durchschnittlichen Pilztrockengewichte lagen für Laub, Holz und Sedimente auf und unter der Wasseroberfläche entsprechend bei 15 g, 9 g, 1 g und 0,4 g pro kg organischem Material (Werte aus Findlay *et al.* (2002) berechnet nach Gulis und Suberkropp (2003)). Pilze besiedeln vorrangig die grobkörnigen, organischen Bestandteile in Gewässern und sind im Gegensatz zu Bakterien weniger häufig auf den feinen Partikeln des Bodensediments zu finden (Findlay *et al.*, 2002). Als eine Ursache für die Konzentrationsabnahme von HHCB und AHTN im Wasser wurde Sedimentation, die eine räumliche Verbindung zwischen den Schadstoffen und den aquatischen Pilzen herstellen würde, beschrieben (Buerge *et al.*, 2003; Peck und Hornbuckle, 2006).

Die hohe Sensitivität der Pilze bei der Besiedlung organischer Materialien im Vergleich zu Bakterien und die bevorzugte Kolonisierung von grobem Sediment (Findlay *et al.*, 2002) lassen vermuten, dass der Einfluss der Pilze auf die Biotransformation von Duftstoffen in Gewässern stark von der individuellen Umweltsituation abhängt. Basierend auf den biologischen Umsetzungsraten von HHCB und AHTN durch aquatische Pilze wurden zu erwartende Halbwertszeiten in einem theoretischen Süßwasser-Sediment-System (oberste 5 cm des Bodensediments einschließlich des groben und feinen Sediments) abgeschätzt. Diese Werte sollen einen Anhaltspunkt für die Größenordnungen der Umsetzung von HHCB und AHTN durch Pilze geben. Zwei Szenarien, geringe und hohe Konzentration an katalytisch aktiver Pilzbiomasse im Sediment, wurden betrachtet und ergaben Halbwertszeiten von ca. 2567 Tagen für HHCB und 1873 Tagen für AHTN bei geringeren, sowie 58 Tage für HHCB und 38 Tage für AHTN bei höheren Pilzaktivitäten. In Mikrokosmos-Experimenten wurde eine Halbwertszeit von 79 Tagen für HHCB angegeben, allerdings wurden die involvierten Organismen nicht identifiziert (Heraproject, 2004). Aus Mikrokosmos-Experimenten mit Schlamm-angereichertem Boden sowie Wald- und Agrarboden wurden entsprechende Halbwertszeiten von 105, 95 und 239 Tagen für HHCB erhalten (Heraproject, 2004). In verschiedenen mit Schlamm-angereicherten

2 Biotransformation polycyclischer Moschusduftstoffe

Böden reichten die detektierten Restkonzentrationen der Duftstoffe nach einem Jahr Inkubation von 0% bis 9% für HHCB und 40% bis 86% für AHTN (DiFrancesco *et al.*, 2004). Die Aussagen der zitierten Studien belegen, dass die vollständige, biologische Umsetzung von HHCB und AHTN durch Sediment- und Bodenmikroorganismen innerhalb eines Jahres möglich ist und geben damit einen zeitlichen Rahmen an, der dem theoretischen Wert für die Biotransformation durch aquatische Pilze entspricht.

Die geringen Konzentrationen, in denen HHCB und AHTN in der Umwelt vorkommen (ng/L-Bereich in Oberflächengewässer (Balk und Ford, 1999; Bester, 2005; Rimkus, 1999), 3-stelliger µg/kg-Bereich in Flusssedimenten (Rimkus, 1999)), sollten solche natürlichen biologischen Abbauprozesse, bei denen die Duftstoffe als Nährstoffquelle der umsetzenden Mikroorganismen dienen könnten, erschweren. Pilze sind jedoch nicht auf die Verwertung von Schadstoffen als Kohlenstoffquelle angewiesen, sondern können diese co-metabolisch umsetzen. Da aquatische Pilze auf organischem Pflanzenmaterial leben, sind die damit assoziierten Konzentrationen von HHCB und AHTN entscheidend. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Duftstoffmolekülen und organischem Material (Ternes *et al.*, 2004), welches als Nährstoffquelle für aquatische Pilze dient, ermöglichen die Adsorption von HHCB und AHTN an derartige Pilzsubstrate. Daraus ergibt sich eine räumliche Nähe der Moschusduftstoffe und der biokatalytisch aktiven Pilze, die eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit von HHCB und AHTN bewirken und kinetische Limitationen ihres Abbaus verringern sollte.

Die in der Literatur angegebenen Konzentrationen von HHCB und AHTN in grobem Sediment liegen im 3-stelligen µg/kg-Bereich. Diese Konzentrationen repräsentieren jedoch Durchschnittswerte der heterogenen Sedimentmatrix, welche aus Sand, Ton, Lehm und organischen Domänen zusammengesetzt ist. Die von Ternes *et al.* (2004) beschriebenen hydrophoben Wechselwirkungen lassen vermuten, dass es zur Anreicherung der Duftstoffe in den organischen Sedimentdomänen kommt. HHCB- und AHTN-Konzentrationen im mg/kg-Bereich wurden für Aktivschlämme mit hohem Kohlenstoffgehalt beschrieben (Balk und Ford, 1999; Rimkus, 1999; Ternes *et al.*, 2004). Die lokalen Moschusduftstoff-Konzentrationen organischer Sedimentdomänen sollten daher beträchtlich höher als für Sedimente publizierte Durchschnittskonzentrationen liegen, was sich positiv auf ihre co-metabolische Umsetzung durch aquatische Pilze auswirken könnte.

3 Reinigung und Charakterisierung einer Laccase des aquatischen Pilzstamms *Myriocoonium* sp. UHH 1-13-18-4 und Analyse des Laccase-codierenden Gens

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

Derzeit stammt die Mehrzahl der isolierten Laccasen, deren Eigenschaften untersucht wurden, von Basidiomyceten. Die Anzahl der untersuchten Ascomyceten-Laccasen ist hingegen vergleichbar gering (Hoegger *et al.*, 2006). Neben der Darstellung ihres biotechnologischen Potenzials (Duran *et al.*, 2002; Kiiskinen *et al.*, 2002; Mayer und Staples, 2002) würden vertiefende Studien zu Ascomyceten-Laccasen auch zur Klärung ihrer physiologischen Funktionen beitragen (Litvintseva und Henson, 2002; Tetsch *et al.*, 2006). Zusätzlich würde ein breiteres Wissen über die strukturellen und katalytischen Eigenschaften von Ascomyceten-Laccasen Einblicke in die regulatorischen Aspekte der Produktion dieser Enzyme geben und die Klärung ihrer ökologischen Funktionen, sowie phylogenetischen Verwandtschaften unterstützen. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Laccase eines aquatischen Pilzes mit Verbindung zu Ascomyceten biochemisch und molekulargenetisch charakterisiert.

3.1 Laccase-Produktion und -Reinigung

Myriocoonium sp. Stamm UHH 1-13-18-4 wurde aus der Saale in der Nähe von Halle (Sachsen-Anhalt) isoliert. In Kultur bildet *Myriocoonium* sp. eine phialidische Anamorphe mit kleinen (4 x 3 µm), kugelförmigen Konidien (Junghanns *et al.*, 2005). Die Sequenzierung der „internal transcribed spacer“-Region und des 5'-Endes der 28S rDNA ergab, dass *Myriocoonium* sp. zur Ascomyceten-Familie *Helotiaceae* gehört (Junghanns *et al.*, 2008). Eine genauere Identifikation war auf Grund des fehlenden Auftretens einer Teleomorphe nicht möglich.

Nach 20 Tagen Kultivierung in Malzextraktmedium wurde im Kulturüberstand eine maximale Laccase-Aktivität von 33 UL⁻¹ gemessen. Bei Zugabe von 50 µM CuSO₄ und 1 mM Vanillinsäure am 4. Kultivierungstag war diese bereits nach 16 Tagen um das Dreifache höher (103 UL⁻¹).

Zur Reinigung der extrazellulären Laccase aus dem Kulturüberstand von *Myriocoonium* sp. wurde die Biomasse abgetrennt und die Laccase-haltige Lösung durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Das Retentat mit einer spezifischen Aktivität von 0,1 Umg⁻¹ enthielt

dunkelbraune Verunreinigungen, die vor der chromatographischen Trennung durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt wurden. Nach Anionenaustausch-Chromatographie und anschließender Gelfiltration wurde ein einzelner Laccase-Peak, der eine Molmasse von ca. 80 kDa und eine spezifische Aktivität von 80 U mg^{-1} aufwies, detektiert. Dies entspricht einem Aufreinigungsfaktor von 800 mit einer Ausbeute von 2%.

3.2 Strukturelle Charakterisierung der Laccase

3.2.1 Strukturelle Eigenschaften des gereinigten Proteins

Die Reinheit der *Myrioconium* sp. Laccase konnte durch die Detektion einer einzelnen Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 88 kDa nach SDS-PAGE mit kolloidaler „Coomassie Brilliant Blue“ (CBB)-Färbung bestätigt werden. Die genaue Masse der Laccase wurde mittels „matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight“-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) auf 72,7 kDa bestimmt und entspricht damit einem für Laccasen typischen Molekulargewicht (Baldrian, 2006). Die Detektion einer Proteinbande mit der GelCode[®] Glykoprotein-Färbung nach SDS-PAGE, die ein zur CBB-Färbung vergleichbares Molekulargewicht aufwies, diente als Nachweis für ein Glykoprotein. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen ergab die Native PAGE des Kulturüberstandes nach Aktivitätsfärbung mit ABTS eine einzelne Bande mit Laccase-Aktivität. Nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) wurde ebenfalls eine Bande mit Aktivitätsfärbung detektiert, deren pI-Wert im sauren pH-Bereich außerhalb der IEF-Marker mit pI-Werten von 6,5 bis 2,8 lag. Der isoelektrische Punkt der *Myrioconium* sp. Laccase befindet sich damit im stark sauren Bereich der für pilzliche Laccasen bekannten Werte (Baldrian, 2006).

Das funktionale Enzym konnte durch den Vergleich von tryptischen Peptiden, die mittels MS/MS-Ionensuche identifiziert wurden, und genomischer Laccasesequenz auf einem MASCOT-Server auf das Laccase-Gen zurückgeführt werden¹. Zwei tryptische Peptide der aufgereinigten Laccase, die 5% der Sequenz abdecken, wurden zweifelsfrei in der Gensequenz identifiziert.

¹ Der tryptische Verdau des gereinigten Enzyms und die Ionensuche auf dem MASCOT-Server wurde von Nico Jehmlich vom Department Proteomics am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ durchgeführt.

3.2.2 Analyse des Laccase-Gens²

Laccase-Gene sind charakterisiert durch 4 konservierte Abschnitte, die die Kupferbindungsstellen (copper binding regions: cbr I – cbr IV) kodieren. Um das Laccase-Gen in *Myrioconium* sp. zu amplifizieren, wurden zunächst zwei degenerierte Primer, die zwischen cbr I und cbr III binden und bereits von pilzlichen Laccasen bekannt waren, eingesetzt. Das erhaltene Sequenzstück diente als Ausgang für die Entwicklung der spezifischen Primer, um sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende des Laccase-Gens zu sequenzieren. Als Ergebnis der Sequenzierung wurde in der genomischen DNS von *Myrioconium* sp. ein Laccase-Gen gefunden, das in CuSO₄- und Vanillinsäure-enthaltenden Flüssigkulturen transkribiert wurde. Die vollständige genomische DNS-Sequenz der Laccase und die partielle cDNS-Sequenz sind in der European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Datenbank hinterlegt.

Der abgeleitete offene Leserahmen mit einer Länge von 1743 bp, die 581 aa kodieren, schließt ein Intron mit einer Länge von 56 bp ein. Neben diesem wurde eine potenzielle Splice-Variante in zwei Klonen der cDNS identifiziert. Im zugehörigen, offenen Leserahmen fehlte ein 58 bp-langes, fakultatives Intron zwischen cbr II und cbr III. Die Möglichkeit, dass diese Splice-Variante ein eigenes Laccase-Gen darstellt, wurde mit einer entsprechenden PCR widerlegt. Bei der Expression der Splice-Variante würde ein 405 aa-langes Protein ohne die grundlegenden Sequenzabschnitte, wie cbr III und cbr IV, entstehen. Larrondo *et al.* (2003) berichten von alternativ gespleißten Transkripten in Multikupferoxidase-Genen von *Phanerochaete chrysosporium*, deren zeitige Stopcodons die Translation abbrechen würden. Dies lässt vermuten, dass die zu einem nichtfunktionalen Transkript führende Splice-Variante in der Laccase-Sequenz von *Myrioconium* sp. eine Möglichkeit für die Regulierung der Enzymproduktion ist.

Ausgehend von der Aminosäuresequenz des Laccase-Gens wurde ein sekretorisches Protein mit Signalpeptid mit einer Länge von 561 aa und einer Molmasse von 61 kDa vorhergesagt. Damit ergibt sich ein Unterschied von 16% zur Molmasse des Proteins, bestimmt mit MALDI-TOF-MS (72,7 kDa). Dieser Unterschied könnte auf eine Glykosylierung zurückzuführen sein, die Laccasen vor Proteolyse schützt (Yoshitake *et al.*, 1993) und zumeist 10 bis 25% der Enzymmasse ausmacht (Baldrian, 2006). Die Anzahl von 8 vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen in der Gensequenz der sekretorischen *Myrioconium* sp. Laccase wurde ebenfalls bei der extrazellulären Laccase von *Hortaea acidophila* (Tetsch *et al.*, 2006) beobachtet. Das C-terminale Sequenzmotiv DSGI des gereinigten Enzyms ist eng verwandt mit dem konservierten Sequenzmotiv

² Die Sequenzierung des Laccase wurde von Marek Pecyna, der von 2006 bis 2007 in der Arbeitsgruppe von Dr. Schlosser arbeitete, durchgeführt.

DSGL, welches ein typisches Element in Ascomyceten-Laccasen *sensu stricto* ist (Hoegger *et al.*, 2006). Die leicht modifizierte Form dieses Motivs ist auch für zwei Laccase-Gene des Ascomyceten *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* beschrieben (Litvintseva und Henson, 2002).

In der Promotor-Region der Laccase-Sequenz, die 379 bp umfasst, wurden mögliche Bindungsstellen für transkriptionell aktive Gene, wie die TATA-Box, die Octamer-Faktor 1-Box und die GC-Box, identifiziert. Des Weiteren enthält dieser Abschnitt eine mögliche CreA-Bindungsstelle, die auch von Genen anderer Pilzlaccasen bekannt ist (Galhaup *et al.*, 2002). Der CreA-Repressor vermittelt in Pilzen die Glukosehemmung bei Genen, die in den Metabolismus von alternativen Kohlenstoffquellen involviert sind (Arst und MacDonald, 1975; Stapleton und Dobson, 2003). Zwei putative „metal response element“ (MRE1 und MRE2)-Motive, die ebenfalls in der Promotor-Region der Laccase vorkommen, stimmen teilweise mit der MRE-Konsenssequenz TGCRNC höherer Eukaryoten (Thiele *et al.*, 2004) überein. Das Auftreten von putativen MREs in *Myrioconium* sp. lässt einen potenziellen Einfluss des Kupfers auf die Genexpression der Laccase vermuten, der für Ascomyceten (Tetsch *et al.*, 2006) bereits vorgeschlagen wurde.

Ein Abgleich der *Myrioconium* sp. Laccase-Sequenz mit der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ergab die größte Ähnlichkeit mit den Laccasen der Ascomyceten *Monilinia fructigena* (65%), *Botryotinia fuckeliana* (64%), *Sclerotinia minor* (62%) und *Sclerotinia sclerotiorum* (62%). Sie alle gehören zur Familie der *Sclerotiniaceae*, Ordnung *Helotiales* (Kirk *et al.*, 2001). Die phylogenetische Betrachtung der *Myrioconium* sp. Laccase und weiterer Ascomyceten-Laccasen aus der Datenbanksuche resultierte in einer Abgrenzung der zu *Sclerotiniaceae* gehörenden Enzyme. Nur ein zweites Gen von *B. fuckeliana* (AAK77952) befand sich in größerer phylogenetischer Distanz.

3.3 Katalytische Eigenschaften

Die Betrachtung der Laccase-Oxidation von typischen Substraten, wie ABTS, Syringaldazin und 2,6-Dimethoxyphenol (2,6-DMP) ergab Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) von 104,9 μM (ABTS), 4,2 μM (Syringaldazin) und 67,8 μM (2,6-DMP). Die berechneten katalytischen Wirkungsgrade (k_{cat}/K_m) basierten auf dem mit MALDI-TOF-MS bestimmten Molekulargewicht von 72,7 kDa und lagen bei 28,2 (ABTS), 46,9 (Syringaldazin) und 67,3 (2,6-DMP) $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Tyrosin, ein typisches Substrat von Tyrosinasen, wurde vom Enzym nicht umgesetzt. Die Effizienz der Oxidation der genannten Substrate ergibt folgende Rangordnung: Syringaldazin > 2,6-DMP > ABTS. Darin stimmt die *Myrioconium* sp. Laccase mit den Laccasen der Ascomyceten

3 *Myrioconium* sp. Laccase

Melanocarpus albomyces (Kiiskinen *et al.*, 2004) und *Chaetomium thermophilum* (Chefetz *et al.*, 1998) überein. Die hohe Affinität des gereinigten Enzyms gegenüber Syringaldazin (4,2 µM) entspricht Werten, die auch für Laccasen der Ascomyceten *M. albomyces* (1,3 µM (Kiiskinen *et al.*, 2004)) und *Xylaria polymorpha* (3,5 µM (Liers *et al.*, 2007)) sowie für einen Bodenascomyceten der *Chaetomiaceae* (9 µM (Saito *et al.*, 2003)) beschrieben wurden.

Die Oxidation von ABTS durch *Myrioconium* sp. Laccase ergab ein pH-Optimum zwischen pH 2,5 und 3. Die Aktivitätsprofile der Oxidation von Syringaldazin und 2,6-DMP waren, im Gegensatz zum kontinuierlich abnehmenden Profil von ABTS, glockenförmig mit entsprechenden Maximalwerten bei pH 6,0 und 6,5. In Abhängigkeit von der Temperatur stieg die Laccase-Aktivität bei der Oxidation von ABTS bis zum höchsten getesteten Wert von 70°C kontinuierlich an. Die pH-Optima für die Oxidation von ABTS, Syringaldazin und 2,6-DMP sowie das temperaturabhängige Oxidationsverhalten sind mit denen anderer Laccasen, die aus Pilzen isoliert wurden, vergleichbar (Baldrian, 2006; Tetsch *et al.*, 2006).

Zeitabhängige Stabilitätsuntersuchungen bei 15°C in einem pH-Bereich von 2 bis 8 zeigten, dass nach einer Inkubationszeit von 1 h bei pH 4 bis 6 mehr als 80% der anfänglichen Laccase-Aktivität erhalten blieb. Nach einer weiteren Stunde wurden bei pH 6 noch 80% der ursprünglich eingesetzten Aktivität gemessen, währenddessen die Restaktivitäten bei den übrigen pH-Werten unter 50% lagen. Im sauren pH-Bereich ist die Stabilität der *Myrioconium* sp. Laccase verglichen mit Laccasen von *C. thermophilum* (Chefetz *et al.*, 1998) und *X. polymorpha* (Liers *et al.*, 2007) höher.

Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der gereinigten Laccase wurde zwischen 15 und 60°C untersucht und ergab die höchsten Restaktivitäten bei 15°C (mehr als 80% nach 1 h Inkubationszeit). Die gegenüber anderen Ascomyceten-Laccasen geringere Stabilität des Enzyms bei Temperaturen über 15°C könnte auf die kühleren Temperaturen in Fließgewässern, dem Lebensraum von *Myrioconium* sp., zurückgeführt werden.

3.4 Rückschlüsse auf Funktionen der *Myrioconium* sp. Laccase

Natürliche Nährstoffquellen aquatischer Pilze (pflanzliche Überreste der Ufervegetation) enthalten phenolisches und nicht-phenolisches Lignin und phenolische Sekundärmetabolite der Pflanzen (Boerjan *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 1991). Neben Kupfer führte auch die Anwesenheit von Vanillinsäure in *Myrioconium* sp. Flüssigkulturen zu einer Erhöhung der Laccase-Aktivität. Vanillinsäure, die in Pflanzen vorkommt (Huang und Sheu, 2006), wird als phenolisches Ligninmodelsubstrat eingesetzt (Bollag *et al.*, 1982). In Asco- und Basidiomyceten wurde die Laccase-Produktion nachweislich durch aromatische Substanzen, Lignin-haltige Pflanzenextrakte und Pflanzenhomogenisate

3 *Myrioconium* sp. Laccase

erhöht (Litvintseva und Henson, 2002; Schlosser *et al.*, 1997; Soden und Dobson, 2001). Daraus lässt sich schließen, dass *Myrioconium* sp. Laccase produzieren sollte, wenn er auf natürlichen Substraten wächst. Als mögliche Funktionen der Laccase ließe sich die Beteiligung an der Umsetzung von pflanzlicher Lignozellulose oder an der Abwehr giftiger Pflanzenstoffe ableiten. Der Abbau von Lignin und die gleichzeitige Produktion von Laccase wurde für tropische Süßwasserpilze beschrieben (Bucher *et al.*, 2004). Eine weitere potenzielle Rolle der *Myrioconium* sp. Laccase - die Umsetzung von umweltrelevanten Schadstoffen im aquatischen Ökosystem - ergibt sich aus ihrer Fähigkeit HHCB und AHTN zu oxidieren (Martin *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Laccasen als Biokatalysatoren für die HHCB-Lacton-Bildung vorgestellt. Dabei erwies sich die *Myrioconium* sp. Laccase gegenüber der *C. aquatica* Laccase als effektiver. Die Produktion von Laccasen wird zunehmend auch für Bakterien beschrieben (Claus, 2003). Diese Tatsache erhöht die Relevanz der Laccasen bei Umweltprozessen für weitere Gruppen von Mikroorganismen. Zudem könnten Laccasen als Biokatalysatoren für Umwelt-orientierte Biotechnologie dienen (Baldrian, 2006).

4 Analytische Charakterisierung des technischen Nonylphenol

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.

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.

Die fast ubiquitär in der aquatischen Umwelt vorkommenden Nonylphenole stellen auf Grund ihrer endokrinen Aktivität ein potenzielles Risiko für Natur und Gesundheit dar. Die Konfigurationsisomere des industriell eingesetzten technischen NP-Gemischs unterscheiden sich in der Verzweigung der Alkylseitenkette, von der auch die hormonelle Wirkung beeinflusst wird. Um die spezifischen endokrinen Rezeptorantworten besser zu verstehen, ist die Strukturaufklärung der individuellen NP-Isomere, die in natürlichen Habitaten zu finden sind, entscheidend (Tabira *et al.*, 1999). Allerdings erschweren die ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften die Trennung der Isomere mit herkömmlichen chromatographischen Methoden und dadurch auftretende Co-Elutionen stören die Interpretation von Strukturdaten. Die Verbesserung der Trennung der NP-Isomere ist daher zwingend notwendig, stellt jedoch zugleich eine analytische Herausforderung dar.

4.1 Gaschromatographie-Tandem Massenspektrometrie (GC-MS/MS) und Cluster-Analyse³

Das spektrometrische Fragmentierungsmuster von NP ist abhängig von Grad und Position der Verzweigung der Alkylseitenkette. Der ladungsstabilisierende Einfluss des Phenolteils im NP-Molekül hat zur Folge, dass die charakteristischen Fragmentierungen der NP-Isomere am aliphatischen Teil auftreten. Daraus ergeben sich Basisfragment-Ionen, mit denen eine Einteilung der Isomere des t-NP in 5 bzw. 6 Gruppen von Wheeler *et al.* (1997) bzw. Thiele *et al.* (2004) bereits vorgenommen wurde. Diese Gruppen wurden anhand der typischen Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms (α -C) klassifiziert. Die Entstehung der Fragment-Ionen und damit deren Gewichtung im Massenspektrum ist jedoch unter „full-scan“-⁴Messbedingungen, wie sie von den oben genannten Autoren angewandt wurden, nicht hinreichend erklärbar.

³ Die Datenauswertung mittels Cluster-Analyse wurde von Dr. Monika Möder vom Department Analytik des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ durchgeführt.

Die in dieser Arbeit ergänzend eingesetzte Fragment-Ion-Analyse lieferte entscheidende Informationen zur Strukturaufklärung der Isomere.

4.1.1 Aufklärung der spektrometrischen Fragmentierungswege von synthetisierten NP-Referenzisomeren

Die spektrometrischen Daten der „full-scan“ Messung und der Produkt-Ion-Analyse⁵, sowie die Retentionseigenschaften von drei synthetisierten NP-Isomeren des technischen Gemischs (NP1: 4-(1-Ethyl-1,4-dimethylpentyl)phenol; NP2: 4-(1,1,5-Trimethylhexyl)phenol; NP3: 4-(1-Ethyl-1,3-dimethylpentyl)phenol) dienen als Grundlage für die Strukturaufklärung von unbekanntem NP-Isomeren des technischen Gemischs. In Abbildung 3 sind die spektrometrischen Fragmentierungswege von NP1, NP2 und NP3, abgeleitet aus den entsprechenden Produkt-Ion-Analysen, dargestellt.

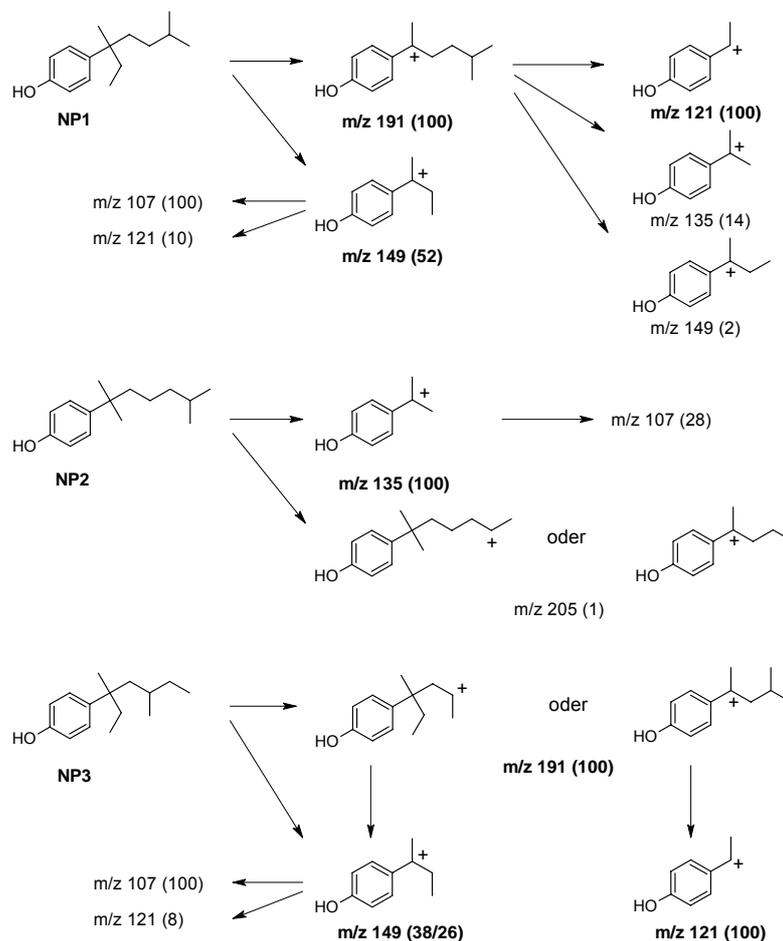


Abbildung 3 Fragmentierungswege der NP-Isomere NP1, NP2 und NP3, abgeleitet aus den Produkt-Ion-Analysen. Die relativen Häufigkeiten der Ionen sind in Prozent in Klammern angegeben.

⁴ Methode des MS-Detektors, bei der alle Signale in einem definierten Massenbereich (hier 50-500 amu) wiedergegeben werden.

⁵ Untersuchung massenspektrometrischer Zerfälle ausgewählter Fragment-Ionen.

4 Analyse des technischen Nonylphenols

Auf Grund der identischen α -C-Konfiguration der beiden Isomere NP1 und NP3 sind die massenspektrometrischen Fragmentierungswege vergleichbar. Unterschiede zeigten sich lediglich in der relativen Häufigkeit des Ions mit m/z 149 und im weiteren Zerfall des dominierenden Ions mit m/z 191, der sich für NP3 auf ein Ion mit m/z 121 beschränkt (Abb. 3). Die Fragmentierung von NP2 wird durch die 1,1-Dimethyl-Substitution am α -C bestimmt. Das intensivste Ion mit m/z 135 reflektiert die bevorzugte Bildung des stabilen 4-iso-Propylphenol-Kations (Abb. 3).

4.1.2 Klassifizierung der t-NP-Isomere mittels Clusteranalyse

Die Clusteranalyse ermöglicht eine multivariate Datenanalyse, die Kenndaten, in diesem Fall Massenspektren und Retentionszeiten, so gruppiert, dass der Verwandtschaftsgrad von Mitgliedern derselben Gruppe sehr groß ist (kleinste euklidische Distanz). Die Ergebnisse der Clusteranalyse unterstützten die formale Klassifizierung der NP-Isomere und zeigten neue Zusammenhänge und Strukturierungen der spektrometrischen Daten auf.

Mit der „full-scan“ Methode wurden NP-Isomere separiert, die nach Anwendung der Clusteranalyse in drei Gruppen abhängig vom jeweiligen Basispeak bei m/z 135, 121 und 107 eingeteilt wurden. Letztere ist durch die hohe Häufigkeit des unspezifischen Hydroxyltropylium-Ions (m/z 107) charakterisiert und umfasst mehrere Untergruppen mit Isomeren, deren Massenspektren sich stark unterscheiden. Folglich bedarf es der spezifischen, spektrometrischen Daten aus der Produkt-Ion-Analyse, um präzisere Aussagen aus der Klassifizierung zu erhalten.

Die Produkt-Ion-Analyse des technischen Gemischs begann mit der Untersuchung des massenspektrometrischen Zerfalls des NP-Molekül-Ions mit m/z 220. Die Cluster-Analyse gruppierte die gewonnenen MS/MS-Daten von insgesamt 35 detektierten Peaks in 4 in etwa gleich große Gruppen. Drei der 4 Gruppen waren durch dominante Fragment-Ionen mit m/z 191, 135 und 121 charakterisiert. In der 4. Gruppe wurden Isomere zusammengefasst, die keine intensiven Fragmente in ihren Massenspektren aufwiesen. Darauf aufbauend wurden die dominanten Ionen mit m/z 191, 135 und 121 einzeln mit der Fragment-Ion-Analyse charakterisiert, um die Strukturzuweisung unbekannter Isomere der technischen Mischung zu verfeinern. Als Beispiel sind die Ergebnisse der Cluster-Analyse für die Fragment-Ion-Analyse des Ions m/z 191 in Abbildung 3 dargestellt. Die 8 detektierten Peaks wurden in zwei Untergruppen mit jeweils 4 Isomeren eingeteilt (Abb. 4).

4 Analyse des technischen Nonylphenols

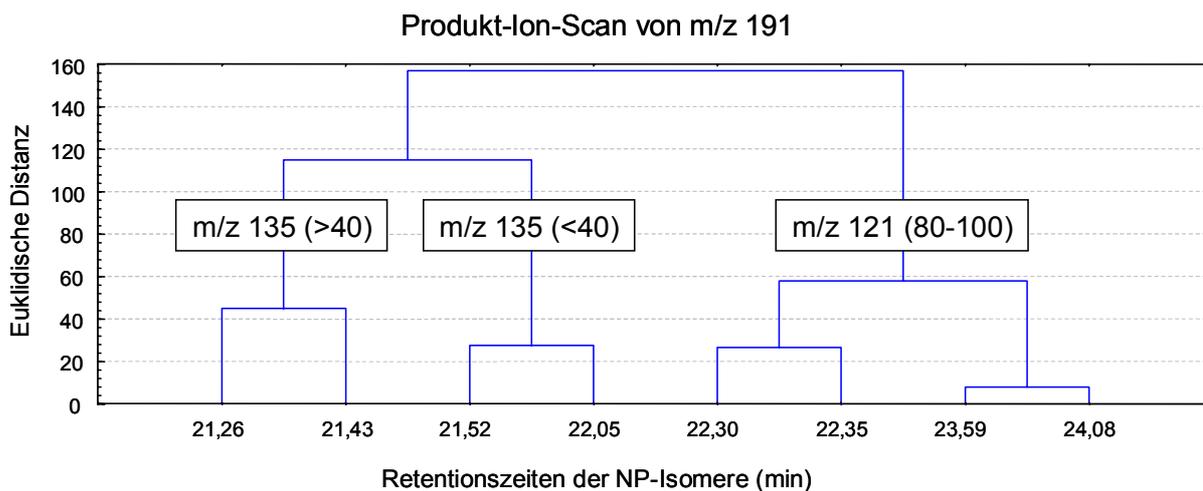


Abbildung 4 Diagramm der Clusteranalyse der Produkt-Ion-Analyse ausgehend vom Ion mit m/z 191. Die relativen Häufigkeiten der Fragmente in Prozent sind in Klammern angegeben.

Die gewonnenen Informationen über die Fragmentierungsmuster der Referenzisomere (Abschnitt 4.1.1) ermöglichen, zusammen mit den Ergebnissen der Fragment-Ion-Analyse des t-NP in Kombination mit der Cluster-Analyse, die Erarbeitung von 18 fundierten Strukturvorschlägen unbekannter Isomere des technischen Gemischs. Die Herangehensweise dafür soll am Beispiel eines Isomers mit einer Retentionszeit von 21,26 min demonstriert werden. Im Produkt-Ion-Spektrum des NP-Molekül-Ions (m/z 220) dominiert das Fragment mit m/z 191, das aus einer C_2H_5 -Eliminierung resultiert und auf eine Ethylsubstitution am α -C schließen lässt. Die nach Auswertung aller Daten vorgeschlagene Isomerenkonfiguration beinhaltet zwei Ethylgruppen in der verzweigten Alkylseitenkette (4-(1,3-Diethyl-pentyl)phenol), da zwei Abspaltungspositionen im Molekül die Intensität des dominierenden Fragments erklären. Mit dieser Struktur sind die außerdem im Fragment-Ion-Spektrum von m/z 191 auftretenden Buten- und Penten-Eliminierungen erklärbar.

4.2 NP-Isomerentrennung mittels zweidimensionaler

Gaschromatographie-Flugzeit-Massenspektrometrie (GCxGC-TOF-MS)

Mit Standardprotokollen für die GC-MS-Analyse ist man derzeit in der Lage ca. 20 NP-Isomere zu trennen (Guenther *et al.*, 2002; Thiele *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 1997). Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass GC gekoppelt mit MS/MS (Fragment-Ion-Analyse) die Selektivität erhöht, jedoch ist auch dabei die Strukturaufklärung durch vorhandene Interferenzen der Isomere eingeschränkt. Weder einfache Gas- noch Flüssigchromatographie besitzen eine ausreichende Trennleistung zur Auftrennung aller NP-Isomere (Braun *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2004; Jeannot *et al.*, 2002; Moeder *et al.*, 2000).

4 Analyse des technischen Nonylphenols

Die Trennleistungen von chromatographischen Verfahren kann durch Säulenkopplung stark verbessert werden, so dass sich die neue, zweidimensionale Trenntechnik, GCxGC, als eine aussichtsreiche Methode zur Trennung des komplexen NP-Isomeregemisches anbietet. Bei dieser Technik wird die primäre Trennsäule an eine zweite kürzere Trennsäule durch einen Modulator gekoppelt, der die eluierenden Peaks der ersten Säule in mindestens 3 Fraktionen unterteilt. Diese Fraktionen werden vom Modulator als schmale Pulse in die zweite Säule injiziert und dort einer schnellen Trennung unterzogen. Von den vielen unterschiedlichen Modulatortypen basieren die meisten auf kryogener Kühlung zum Stoppen der Fraktionen und thermischer Desorption für die Injektion auf die zweite Trennsäule (Harynuk und Gorecki, 2003; Kristenson *et al.*, 2003; Marriott *et al.*, 2003; Pursch *et al.*, 2003). Im Allgemeinen spiegelt die Position eines Analyten im zweidimensionalen Konturdiagramm sowohl seine Flüchtigkeit (erste Trennsäule) als auch seine Polarität (zweite Trennsäule) wider (Abb. 5). 2D-Konturdiagramme veranschaulichen damit Informationen über isomere und homologe Zusammenhänge zwischen den Analyten. Für die Detektion der Analyte, die als sehr schmale Peaks mit 100 bis 200 ms Basisbreite eluieren, bedarf es eines Detektors mit hoher Datenaufnahmefrequenz, wie z. B. eines Flugzeitmassenspektrometers mit Aufnahmeraten von bis zu 500 Spektren/s. Neben dem kommerziell erhältlichen technischen Nonylphenol wurden extrahierte Kulturüberstände aus t-NP-Abbauversuchen mit dem aquatischen Hyphomyceten *C. aquatica* mittels GCxGC-TOF-MS untersucht.

Die GCxGC-TOF-MS Analyse des technischen Nonylphenols ergab 40 getrennte Peaks, die als Nonylphenole identifiziert wurden. Neben den NP-Isomeren wurden auch schwache Signale von Octyl- und Decylphenolen detektiert. Ieda *et al.* (2005) publizierten die Detektion von 102 Isomeren mit GCxGC-TOF-MS. Diese Anzahl konnte durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass ein anderes technisches Gemisch für die Analyse eingesetzt wurde.

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erläutert wurde, erweitern Produkt-Ion-Analysen die Informationen über strukturelle Eigenschaften der Analyte. Am Beispiel der NP-Isomere mit dem dominanten Fragment-Ion m/z 191 (1-Ethyl-Konfiguration des α -C) soll dieser Ansatz für die Analyse mit GCxGC-TOF-MS beschrieben werden. In Abbildung 5 ist das extrahierte Konturdiagramm der Ionenspur mit m/z 191 zweidimensional dargestellt. Die Isomerengruppe ist in der ersten Dimension schon weitestgehend getrennt, zeigt jedoch weitere Auftrennung auf der zweiten, polareren Säule. Der Vergleich mit der entsprechenden Aufnahme des Abbauversuchs mit *C. aquatica* Kulturen, denen t-NP am 5. Kulturtag zugegeben wurde, zeigt eine deutliche Veränderung im 2D-Konturdiagramm nach 32 Tagen Inkubationszeit (Abb. 5). Die NP-Isomere wurden von aktiven *C. aquatica* Kulturen umgesetzt. Bei den dabei gebildeten

4 Analyse des technischen Nonylphenols

Biotransformationsprodukten handelt es sich, wie bei Junghanns *et al.* (2005) bereits beschrieben, um mono-hydroxylierte NP-Isomere (m/z 236) und Alkylphenole mit verkürzter Alkylseitenkette (m/z 208), deren Struktur jedoch unbekannt war. Die Informationen über Strukturmerkmale, die aus Fragmentierungsdaten der Einzelisomere gewonnen werden konnten (siehe 4.1.1.), ermöglichten die Identifikation der verkürzten Alkylphenole als carboxylierte Pentyphenole mit einer 1,1-Dimethyl-Konfiguration am α -C.

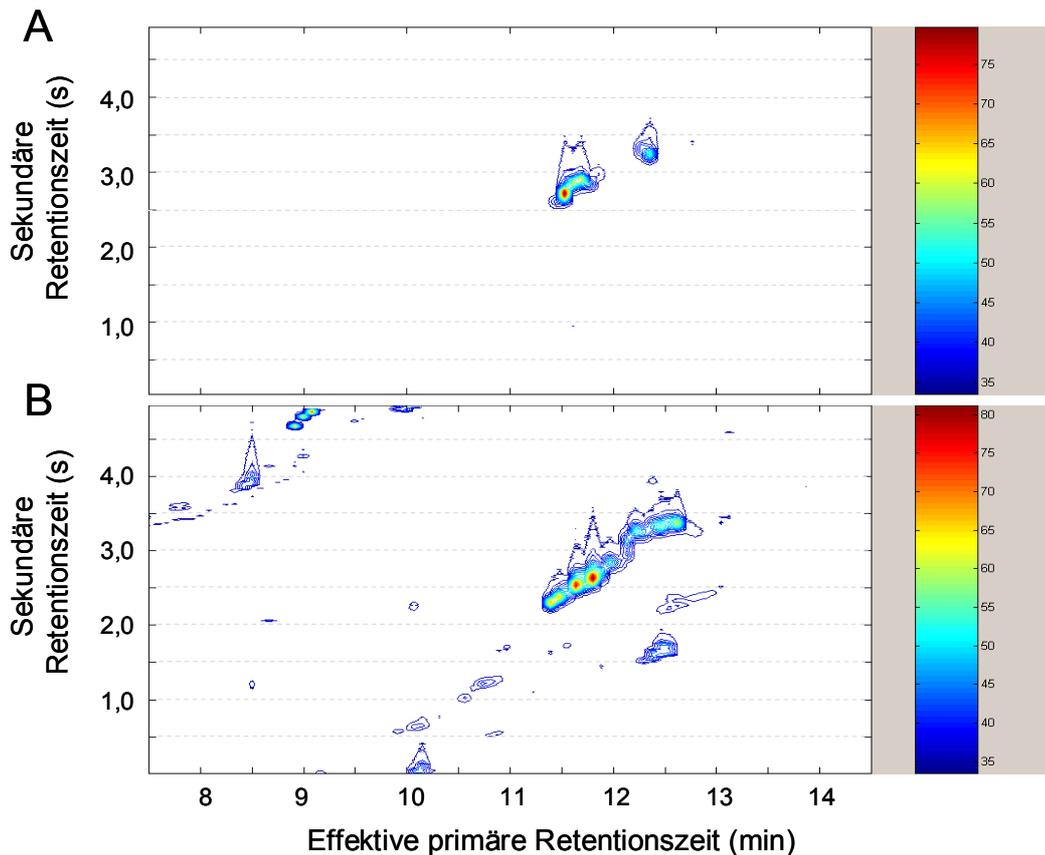


Abbildung 5 GCxGC-Konturdiagramm der extrahierten Ionenspur m/z 191 **A)** der Analyse des t-NP-Standards und **B)** des t-NP-Gemischs nach 32 Tagen Inkubation mit *C. aquatica*.

Als Lösung für das Problem der Co-Elution der t-NP Isomere wurde die GCxGC-TOF-MS-Analyse sehr erfolgreich auf die Trennung des t-NP angewendet. Dennoch bleibt auch unter Einsatz dieser Methode die Strukturidentifikation der t-NP Isomere schwierig und weitere Kriterien, wie Derivatisierung oder der Einsatz von Referenzisomeren, sind nötig, um die Komplexität des technischen NP-Gemischs vollständig aufzuklären.

5 Biotransformation von t-NP durch den aquatischen Hyphomyceten *Clavariopsis aquatica*

Martin, C., P.F.X. Corvini, R. Vinken, C. Junghanns, G. Krauss, D. Schlosser. 2007. Biotransformation of the Xenoestrogen Technical Nonylphenol and Single Nonylphenol Isomers by the Aquatic Hyphomycete *Clavariopsis aquatica* Simultaneously Involves Extracellular Laccase and Intracellular Reactions, submitted to Applied and Environmental Microbiology

In aquatischen Ökosystemen setzt die Verwertung von organischem Pflanzenmaterial, das durch die ufernahe Vegetation eingetragen wird, mit der Besiedlung durch Mikroorganismen ein. Dabei spielen die aquatischen Pilze eine entscheidende Rolle für den Nährstoffkreislauf (Bärlocher, 2005; Krauss *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 1998). AQHs, die in großer Vielfalt (290 Arten (Shearer *et al.*, 2007)) ausschließlich in der aquatischen Umwelt vorkommen, dominieren den Beginn der Zersetzung von eingetragenen Laub (Bärlocher, 1992, 2005). Unter nährstoff- und sauerstoffreichen Bedingungen wurde gezeigt, dass der AQH *C. aquatica* t-NP und das nicht umweltrelevante 4-n-NP co-metabolisch umsetzt (Junghanns *et al.*, 2005). *H. lugdunensis*, ebenfalls ein AQH, metabolisiert unter vergleichbaren Bedingungen 1-Naphthol (Augustin *et al.*, 2006).

Es wurde gezeigt, dass das mitospore Isolat UHH 1-6-18-4, das bis zu 30 UL⁻¹ Laccase im Kulturüberstand aufwies, t-NP besser umsetzte als *C. aquatica*, der weniger als 1 UL⁻¹ Laccase im Kulturüberstand enthielt (Junghanns *et al.*, 2005). In derselben Studie wurde nachgewiesen, dass zellfreie Konzentrate der extrazellulären Laccasen von UHH 1-6-18-4 und *C. aquatica* t-NP innerhalb von 24 h zu 65% und 14% umsetzten. Anhand dieser Ergebnisse wurde eine Beteiligung der Laccase an der Biotransformation von t-NP in Pilzkulturen vorgeschlagen, jedoch ohne einen abschließenden Beweis hierfür zu liefern. In einer weiteren Untersuchung zum Abbau von Nonylphenol durch die Weißfäulepilze *T. versicolor* und *Bjerkandera* sp. BOL 13, bei denen auch extrazelluläre Enzymaktivitäten verfolgt wurden, wurden keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Beteiligung von Laccasen erhalten (Soares *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2005). Im folgenden Kapitel soll der bislang nur vermutete Einfluss der extrazellulären Laccase auf die Biotransformation von t-NP durch aquatische Pilze anhand entsprechender Experimente mit *C. aquatica* bewiesen werden.

Während der Biotransformation von t-NP durch *C. aquatica* erfolgt der Angriff des Pilzes an der Alkylseitenkette, wodurch monohydroxylierte Metabolite (Junghanns *et al.*, 2005) und carboxylierte Produkte der 1,1-Dimethyl-Konfiguration am α -C mit verkürzten Alkylketten entstanden (Moeder *et al.*, 2006). In Versuchen zur Biotransformation der NP-Isomere NP1 und NP3, die eine 1-Ethyl-1-methyl-Konfiguration besitzen, sollte das

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

Verhalten der zwei Isomere mit dem prozentual größten Anteil im technischen Gemisch in *C. aquatica* Kulturen untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Detektion und Strukturzuweisung von Metaboliten, die bei der Umsetzung der Isomere mit *C. aquatica* gebildet werden. Zusätzlich sollte durch die Bilanzierung der Radioaktivität in Biotransformationsversuchen mit ^{14}C -markiertem NP1 und NP3 der Nachweis einer möglichen Mineralisierung durch *C. aquatica* erbracht werden.

5.1 Einfluss der extrazellulären Laccase auf die Umsetzung von NP durch Pilzkulturen

Die Kultivierung des aquatischen Hyphomyceten *C. aquatica* erfolgte in Malzextraktmedium bei 14°C im Dunkeln. Dabei setzte die exponentielle Wachstumsphase ca. 3 Tage nach der Inokulation ein und ging nach ca. 15 Kultivierungstagen in die stationäre Phase mit maximalen Pilzbiotrockenmassen zwischen $3,5\text{ gL}^{-1}$ und $4,0\text{ gL}^{-1}$ über (Junghanns *et al.*, 2005).

Um den Einfluss der Laccase auf die Abnahme der Konzentrationen von t-NP und NP1 in *C. aquatica* Kulturen untersuchen zu können, erfolgte die Zugabe der Schadstoffe zu Beginn der stationären Wachstumsphase (15. Kultivierungstag). Dadurch wurde sichergestellt, dass die Laccase bereits produziert wurde. Die höchsten Umsetzungsraten wurden in Pilzkulturen erhalten, deren Laccase-Produktion nach Zugabe von $50\text{ }\mu\text{M}$ CuSO_4 und 1 mM Vanillinsäure am 4. Kultivierungstag stimuliert wurde. Die dabei erreichten Enzymaktivitäten lagen zu Beginn der Inkubation mit t-NP und NP1 bei 350 UL^{-1} und 405 UL^{-1} . Unter diesen Bedingungen sanken die Konzentrationen von t-NP und NP1 auf $27,0 \pm 2,8\text{ }\mu\text{M}$ und $27,0 \pm 3,8\text{ }\mu\text{M}$ am Ende des Experiments (27. Kultivierungstag). Die Aktivität der Laccase nahm während der NP-Umsetzung weiter zu und fiel erst nach dem Erreichen des Maximalwertes von ca. 800 U/L am Kultivierungstag 25 (t-NP-enthaltende Kulturen) und 21 (NP1-enthaltende Kulturen) ab. In Hitze-inaktivierten Kontrollkulturen wurden nach 27 Tagen Inkubation $55,5 \pm 5,6\text{ }\mu\text{M}$ t-NP und $74,2 \pm 2,3\text{ }\mu\text{M}$ NP1 wiedergefunden. Dies entspricht 74% und 99% der Ausgangskonzentration von $75\text{ }\mu\text{M}$.

Im nächsten Schritt wurde Cycloheximid zur Hemmung der *de novo*-Proteinbiosynthese zusammen mit den Schadstoffen unter den oben beschriebenen Bedingungen zugegeben. Die Umsetzung von t-NP und NP1 war dabei wesentlich geringer, wie die entsprechenden Endkonzentrationen von $35,7 \pm 3,8\text{ }\mu\text{M}$ und $51,2 \pm 0,3\text{ }\mu\text{M}$ zeigen. Zeitgleich zur NP-Zugabe stiegen die Laccase-Aktivitäten noch einen weiteren Tag auf ca. 500 UL^{-1} (t-NP-enthaltende Kulturen) und 450 UL^{-1} (NP1-enthaltende Kulturen) an und nahmen dann kontinuierlich ab. Diese Beobachtung lässt auf eine Inaktivierung der Laccase durch Cycloheximid im weiteren Verlauf des Versuchs schließen.

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

Parallel zu den mit CuSO_4 und Vanillinsäure stimulierten *C. aquatica* Kulturen wurden die NP-Konzentrationsverläufe in Abwesenheit der beiden Induktoren verfolgt. In den entsprechenden Kulturüberständen traten nur geringe Enzymaktivitäten von maximal 17 UL^{-1} (t-NP-enthaltende Kulturen) und 25 UL^{-1} (NP1-enthaltende Kulturen) auf. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass weder t-NP noch NP1 einen induktiven Effekt auf die Laccase-Produktion in *C. aquatica* haben. Im Unterschied dazu erhöhten t-NP und *n*-Nonylphenol im Weißfäulepilz *T. versicolor* die Laccase-Aktivität (Kollmann *et al.*, 2003; Mougín *et al.*, 2002), so dass eine induktive Wirkung bei anderen aquatischen Pilzen nicht ausgeschlossen werden kann. Unter den nichtinduktiven Bedingungen nahm die Konzentration von t-NP und NP1 auf $40,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ und $60,6 \pm 4,0 \mu\text{M}$ ab. Diese im Vergleich zu Laccase-stimulierten Kulturen geringere Konzentrationsabnahme zeigt, dass die Umsetzung von t-NP und NP1 in *C. aquatica* Kulturen sowohl durch intrazelluläre als auch extrazelluläre Prozesse gesteuert wird. Entsprechend der Experimente unter Laccase-induzierten Bedingungen wurde zu *C. aquatica* Kulturen mit natürlichen Laccase-Aktivitäten ebenfalls Cycloheximid zugegeben. In Anwesenheit des Proteinsynthesehemmers fand keine signifikante Umsetzung von t-NP oder NP1 im Vergleich zu Kontrollkulturen statt. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den unbekanntem, intrazellulären Enzymen, die an der Biotransformation von t-NP und NP1 beteiligt sind, nicht um konstitutive Enzyme handelt, sondern dass die Produktion dieser Enzyme durch die Anwesenheit von t-NP induziert wird.

Um einen Vergleich zu einer früheren Studie, die die Umsetzung von t-NP zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *C. aquatica* beschreibt (Junghanns *et al.*, 2005), zu geben, wurden NP1 und NP3 am 3. Kultivierungstag zu *C. aquatica* zugegeben und für 31 Tage inkubiert. Bei einem Teil der Kulturen wurde parallel zur Schadstoffzugabe wiederum mit CuSO_4 und Vanillinsäure die Laccase-Aktivität stimuliert. In diesen Kulturen stieg die Enzymaktivität über den gesamten Zeitraum kontinuierlich an, währenddessen in nichtinduzierten Kulturen keine messbare Enzymaktivität in den Kulturüberständen detektiert wurde. Der Vergleich der NP-Konzentrationen in aktiven Kulturen mit und ohne Laccase-Stimulation ergab eine erhöhte Umsetzung beider Isomere bei Anwesenheit von Laccase, wobei dieser Effekt bei NP3 deutlicher ausgeprägt war.

Die Korrelation der Laccase-Aktivität mit der Konzentrationsabnahme von t-NP, NP1 und NP3 in den beschriebenen Experimenten belegt erstmalig eine Beteiligung der extrazellulären *C. aquatica* Laccase an der Biotransformation dieser Verbindungen.

5.1.1 Umsetzung distinkter Isomerengruppen des t-NP

Ethylacetat-Extrakte der Überstände von *C. aquatica* Kulturen aus den beschriebenen Experimenten wurden mittels GC-MS analysiert. Die chromatographische Trennung von t-

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

NP ermöglichte die Detektion von 12 Isomerengruppen mit zum Teil interferierenden NP-Isomeren, die neben dem Molekül-Ion (m/z 220) typische Fragment-Ionen aufwiesen (siehe 4.1.2.) und unterschiedlichen Isomerengruppen zugeordnet werden können.

In Laccase-stimulierten *C. aquatica* Kulturen, denen zeitgleich mit t-NP Cycloheximid zur Inhibierung der *de novo*-Proteinsynthese am 15. Kultivierungstag zugesetzt wurde, war eine annähernd gleich effiziente prozentuale Umsetzung aller chromatographisch getrennten t-NP-Isomerengruppen (im Vergleich zu den jeweiligen Konzentrationen in Hitze-inaktivierten Kontrollen) zu beobachten. Cycloheximid-enthaltende Kulturen ohne extrazelluläre Laccase-Aktivität zeigten keine signifikante Abnahme von t-NP im Vergleich zu entsprechenden, Hitze-inaktivierten Kontrollen. Diese gleichmäßige Umsetzung der Isomerengruppen durch Laccase-bildende Kulturen spiegelt den durch Laccase katalysierten Anteil der Oxidation der chromatographisch auflösbaren Isomerengruppen des t-NP wieder. Übereinstimmend damit war eine annähernd gleich effiziente prozentuale Umsetzung aller chromatographisch getrennten t-NP-Isomerengruppen auch in Experimenten mit Laccase-Konzentraten aus dem zellfreien Kulturüberstand von *C. aquatica* zu beobachten. Dies weist insgesamt auf eine relativ unspezifische Oxidation der einzelnen t-NP-Isomere durch Laccase hin. Die Oxidation von Nonylphenol durch Laccase basiert auf dem Angriff der phenolischen OH-Gruppe, wobei die unterschiedlich verzweigten Alkylsubstituenten offenbar nur einen geringen Einfluss auf die Reaktion haben. Der gleiche Effekt wurde für Laccase-katalysierte Oxidationen unterschiedlich substituierter Phenole beschrieben, bei denen sterische Effekte großer Substituenten in *para*-Position zu vernachlässigen waren (Xu, 1996).

In Pilzkulturen, in denen die Laccase-Aktivität stimuliert, aber kein Proteinsynthese-Inhibitor zugesetzt wurde, zeigte sich ein stärker individuell ausgeprägter Umsatz der unterschiedlichen Isomerengruppen. Dies deutet daraufhin, dass parallel zur extrazellulären Laccase auch intrazelluläre Enzyme an der Umsetzung von t-NP beteiligt sind. Bestätigt wurde dies durch eine offensichtlich selektive Umsetzung individueller NP-Isomerengruppen in Kulturen ohne messbare Laccase-Aktivitäten, denen kein Cycloheximid zugesetzt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass im Gegensatz zur Laccase die intrazellulären Enzyme distinkte Isomere des t-NP wesentlich Isomerengruppen wesentlich spezifischer angreifen.

5.2 Intrazelluläre Biotransformationsprodukte von t-NP und synthetisierten Einzelisomeren in *C. aquatica* Kulturen

Biotransformationsprodukte, deren Bildung auf intrazelluläre Prozesse zurückzuführen ist, wurden in Ethylacetat-Extrakten von *C. aquatica* Kulturen ohne extrazelluläre Laccase-Aktivität mit GC-MS analysiert. Extrahiert wurden Kulturen, denen t-NP bzw. NP1 zu

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

Beginn der stationären Wachstumsphase zugesetzt wurde. Die dabei detektierten Metabolite mit den folgenden Molekül-Ionen: m/z 218 (t-NP-Metabolite A-1, A-2 und NP1-Metabolite A-3, A-4), m/z 234 (t-NP-Metabolit C-1), m/z 236 (t-NP-Metabolite B-1, B-2, B-3, B-4 und NP1-Metabolite B-5, B-6) und m/z 278 (t-NP-Metabolit D-1 und NP1-Metabolit D-2) (Tabelle 1), wurden weder in Cycloheximid-versetzten Kulturen, Hitze-inaktivierten Kontrollen, NP-Stammlösungen oder aktiven *C. aquatica* Kulturen ohne Zusatz von NP detektiert. Aus dem Vergleich der Massenspektren und der Retentionszeiten der genannten Metabolite geht hervor, dass die t-NP-Metabolite A-1, B-2, B-4 und D-1 mit den entsprechenden NP1-Metaboliten A-4, B-5, B-6 und D-2 identisch sind. Demzufolge wird NP1 auch im technischen NP-Gemisch von *C. aquatica* Kulturen umgesetzt.

Ebenfalls extrahiert wurden Kulturen, denen NP1 und NP3 zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zugegeben wurde. In diesen Kulturen entstanden Metabolite mit den folgenden Molekül-Ionen: m/z 218 (NP1-Metabolite A-5, A6), m/z 234 (NP3-Metabolite C-2, C-3), m/z 236 (NP1-Metabolite B-7, B-8) und m/z 264 (NP1-Metabolit E-1) (Tabelle 1). Auf Grund der vergleichbaren massenspektrometrischen Daten und Retentionszeiten konnte gezeigt werden, dass die NP1-Metabolite A-5 und A-6 sowie B-7 und B-8 unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe des Schadstoffes in *C. aquatica* Kulturen gebildet werden. Im Gegensatz dazu wurde der Metabolit D-2 nur in Kulturen, denen NP1 zu Beginn der stationären Wachstumsphase zugesetzt wurde und der Metabolit E-1 ausschließlich in Kulturen mit NP1-Zugabe zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase detektiert (Tabelle 1).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass den meisten detektierten NP-Metaboliten eine Hydroxylierung als Vorstufe vorausgeht. Eine Ausnahme hiervon könnte die Desaturierung der Alkylkette, wie sie für die NP-Produkte mit dem Molekül-Ion m/z 218 vorgeschlagen wird, darstellen. Seitenkettendesaturierungen sind für Sterole (Kelly *et al.*, 1995; Mejanelle *et al.*, 2001) und 4-*n*-NP-Metabolite, die aus der Biotransformation durch Pflanzenzellkulturen resultieren, beschrieben. Allerdings wiesen die zuvor erwähnten 4-*n*-NP-Metabolite außerdem eine Hydroxylierung an der Alkylkette auf (Schmidt *et al.*, 2003). Die initiale Hydroxylierung der verzweigten Alkylkette der t-NP-Isomere und die anschließende Oxidation zu Aldehyd- oder Keto-Verbindungen (Metabolite C-1, C-2, C-3) und Carboxy-Derivaten (Metabolit E-1) gleicht den ersten Schritten des Metabolismus von *n*-Alkylbenzen in Hyphomyceten (Fedorak und Westlake, 1986) und Hefen (Jigami *et al.*, 1979), dem Katabolismus von Phenylalkanen in Actinomyceten (Sariaslani *et al.*, 1974), sowie dem biologischen Abbau von 4-*n*-Nonylphenol durch die Hefe *Candida aquatextoris* (Vallini *et al.*, 2001).

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

Tabelle 1 Massenspektrometrische Daten und GC-MS-Retentionszeiten der Biotransformationsprodukte von t-NP, NP1 und NP3, die in *C. aquatica* Kulturen ohne extrazelluläre Laccase-Aktivität detektiert wurden und nach einem Kultivierungszeitraum von ^a 27 und ^b 31 Tagen analysiert wurden. ^c Die Retentionszeiten wurden, basierend auf der von NP, wegen einer leichten Verschiebung der Retentionszeiten in einer anderen Messung korrigiert.

Nonylphenol und Tag der Zugabe	Metabolit	GC-Retentionszeit (min)	<i>m/z</i> der intensivsten Fragment-Ionen (relative Abundanz [%])
t-NP, Tag 15 ^a	A-1	16,20	218 (M ⁺ , 6), 203 (5), 189 (9), 149 (100), 133 (11), 121 (12), 107 (65)
	A-2	16,30	218 (M ⁺ , 16), 203 (2), 163 (6), 147 (9), 135 (100), 124 (7), 121 (7), 107 (33)
	B-1	16,73	236 (M ⁺ , 5), 147 (5), 135 (100), 121 (5), 107 (12)
	B-2	16,76	236 (M ⁺ , 10), 207 (11), 189 (45), 149 (100), 135 (27), 121 (12), 107 (46)
	C-1	16,87	234 (M ⁺ , 19), 205 (44), 187 (53), 172 (13), 149 (100), 135 (58), 121 (26), 107 (57)
	B-3	16,88	236 (M ⁺ , 5), 191 (4), 135 (100), 121 (9), 107 (15)
	B-4	17,66	236 (M ⁺ , 8), 207 (17), 189 (20), 149 (100), 135 (33), 121 (16), 107 (51)
	D-1	18,33	278 (M ⁺ , 5), 249 (21), 189 (14), 149 (100), 133 (6), 121 (12), 107 (37)
NP1, Tag 15 ^a	A-3	15,67	218 (M ⁺ , 14), 189 (36), 149 (100), 133 (11), 121 (22), 107 (77)
	A-4	16,22	218 (M ⁺ , 6), 189 (10), 149 (100), 133 (10), 121 (14), 107 (85)
	B-5	16,81	236 (M ⁺ , 10), 207 (12), 189 (47), 149 (100), 133 (9), 121 (9), 107 (42)
	B-6	17,71	236 (M ⁺ , 8), 207 (17), 189 (21), 149 (100), 133 (8), 121 (17), 107 (46)
	D-2	18,33	278 (M ⁺ , 7), 249 (22), 189 (15), 149 (100), 134 (8), 121 (11), 107 (37)
NP1, Tag 3 ^b	A-5	15,69 ^c	218 (M ⁺ , 12), 189 (36), 149 (100), 133 (11), 121 (20), 107 (73)
	A-6	16,27 ^c	218 (M ⁺ , 5), 189 (9), 149 (100), 133 (13), 121 (15), 107 (99)
	B-7	16,85 ^c	236 (M ⁺ , 8), 207 (11), 189 (42), 149 (100), 134 (9), 133 (8), 121 (10), 107 (46)
	B-8	17,80 ^c	236 (M ⁺ , 5), 207 (11), 189 (24), 149 (100), 134 (6), 133 (6), 121 (9), 107 (21)
	E-1	18,05 ^c	264 (M ⁺ , 6), 235 (26), 189 (5), 175 (5), 149 (100), 134 (9), 133 (8), 121 (19), 107 (52)
NP3, Tag 3 ^b	C-2	16,77	234 (M ⁺ , 18), 205 (35), 187 (39), 149 (100), 121 (16), 107 (5)
	C-3	16,87	234 (M ⁺ , 13), 205 (27), 187 (38), 149 (100), 121 (10), 107 (34)

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

Zwei Keto-Derivate mit unveränderter Alkylseitenkette (3-(4-Hydroxyphenyl)-3,5-dimethylheptan-4-on und 5-(4-Hydroxyphenyl)-3,5-dimethylheptan-2-on) und ein Keto-Derivat mit verkürzter Alkylkette (4-(4-hydroxyphenyl)-4-methylhexan-3-on) wurden als Metabolite der Umsetzung von NP3 in einem Bioreaktor vorgeschlagen (Cirja *et al.*, 2006). Die intrazellulären Enzyme, die die Alkylseitenkette der NP-Isomere oxidieren, sind bislang unbekannt. Aus dem *n*-Alkan- und Fettsäuremetabolismus in Hyphomyceten und Hefen kann man schlussfolgern, dass vermutlich Monooxygenasen der Cytochrom P450 Familie für die Oxidation der Nonylseitenkette verantwortlich sind (Corvini *et al.*, 2006). Innerhalb der Cytochrom P450 Superfamilie finden sich auch Desaturasen (Kelly *et al.*, 1995).

5.3 Bilanzierung des Umsatzes von NP-Einzelisomeren in Pilzkulturen

Eine denkbare Mineralisierung des aromatischen Rings von NP sollte in Experimenten mit [Ring-U-¹⁴C]-NP1 und [Ring-U-¹⁴C]-NP3, bei denen die ¹⁴C-markierten NP-Isomere *C. aquatica* Kulturen am 4. Kulturtag zugesetzt wurden, erbracht werden. Nach 22 Kulturtagen wurden die Restgehalte an Radioaktivität in den Überständen und in der Biomasse der *C. aquatica* Kulturen, sowie in NaOH-Fallen, welche dem Nachweis von potentiell gebildetem ¹⁴CO₂ und flüchtigen, organischen Verbindungen dienen, bilanziert. Der größte Anteil der initial eingesetzten Radioaktivität fand sich in den Überständen der Kulturen wieder. Nur ein geringer Anteil der eingesetzten Radioaktivität (weniger als 1,5%) wurde in den NaOH-Fallen detektiert, wobei kein Unterschied zwischen aktiven und Kontrollkulturen beobachtet wurde. Folglich kann unter den betrachteten Bedingungen die Mineralisierung des aromatischen Rings der NP-Isomere in *C. aquatica* Kulturen ausgeschlossen werden. Diese Aussage steht in Übereinstimmung mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen zu Metabolitstrukturen des intrazellulären Angriffs, welche Oxidationen der Alkylketten demonstrieren (Kapitel 5.2). Die bislang einzige Studie zur Mineralisierung von NP durch Pilze beschreibt den Abbau von ¹⁴C-markiertem 4-n-NP in Kulturen des terrestrischen Weißfäulepilzes *T. versicolor* (Dubroca *et al.*, 2005). Daraus geht jedoch nicht hervor, ob die Bildung des ¹⁴CO₂ aus der Alkylkette oder dem phenolischen Rest erfolgt.

5.4 Folgerungen für Biotransformation und Detoxifikation von t-NP in natürlichen, aquatischen Systemen

In dieser Arbeit wurden die intra- und extrazellulären Metabolisierungswege der Biotransformation von t-NP durch *C. aquatica* untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse beweisen erstmalig die Beteiligung der extrazellulären Laccase an der Umsetzung von t-NP durch Kulturen aquatischer Pilze. Im Kapitel 3.4 wurde bereits darauf verwiesen, dass die Produktion von Laccase durch aquatische Pilze in deren natürlichen Lebensräumen sehr wahrscheinlich ist. Folglich kann die Oxidation durch extrazelluläre Laccase, neben

5 Biotransformation von technischem Nonylphenol

intrazellulären Reaktionen, für die Biotransformation von t-NP in der aquatischen Umwelt als relevant angesehen werden.

Mit der Betrachtung des Metabolismus von t-NP in aquatischen Pilzen stellt sich die Frage nach der Abnahme der endokrinen Aktivität bei der enzymatischen Umsetzung. Die Oxidation von t-NP durch Laccasen von *C. aquatica* und *Coriolopsis polyzona*, einem Basidiomyceten, resultiert in der Bildung von oxidativen Kopplungsprodukten (Di- bis Pentamere) (Cabana *et al.*, 2007; Junghanns *et al.*, 2005). Struktur und Größe dieser Produkte schließen die Bindung an den Östrogenrezeptor aus und bewirken damit die Eliminierung der endokrinen Aktivität des Schadstoffes (Saito *et al.*, 2004; Tsutsumi *et al.*, 2001). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine positive Korrelation zwischen der Länge der Seitenkette *para*-alkylsubstituierter Phenole und damit ihrer Hydrophobizität und der endokrinen Aktivität besteht, was auf einer stärkeren Bindung von mehr hydrophoben *para*-substituierten Phenolen mit längeren Alkylketten an Östrogenrezeptoren beruht (Tabira *et al.*, 1999). Oxidationen der Alkylketten von t-NP und t-NP-Isomeren, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit für den intrazellulären Metabolisierungsweg beschrieben wurden, setzen die Hydrophobizität entsprechender Metabolite herab und könnten somit auch ihre Bindung an Östrogenrezeptoren schwächen. Folglich könnten sowohl intra- als auch extrazelluläre Biotransformationsprozesse die endokrine Aktivität von t-NP in aquatischen Ökosystemen verringern und zum Selbstreinigungsprozess in natürlichen Gewässern beitragen.

6 Zusammenfassung

Während der letzten 15 Jahre sind organische Mikroschadstoffe, die hauptsächlich durch unvollständigen Abbau in Klärwerkssystemen in die Oberflächengewässer gelangen, in den Blickwinkel der Umweltforschung und der Öffentlichkeit gerückt. Hierzu zählen unter anderem Inhaltsstoffe von kosmetischen Produkten und von Reinigungsmitteln, aber auch Reststoffe aus medizinisch-diagnostischen oder therapeutischen Applikationen, die ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotenzial für Mensch und Umwelt besitzen. Aquatischen Pilze, die zum Teil auch in Mikrokontaminanten-enthaltenden Gewässern vorkommen, kommt eine entscheidende Rolle bei der Umsetzung von komplexem, natürlichem, organischem Material in aquatischen Ökosystemen zu. Neben dieser Funktion wird vermutet, dass aquatische Pilze an der Biotransformation von organischen Xenobiotika mit Schadstoffpotenzial beteiligt sind. Inhalt der vorliegenden Arbeit ist es, eine solche Funktion der Pilze am Beispiel von ausgewählten, umweltrelevanten Mikrokontaminanten zu untersetzen und dabei spezielle mechanistische Fragestellungen, wie die der Beteiligung intra- und extrazellulärer Reaktionen an der Biotransformation der untersuchten Xenobiotika, zu betrachten. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Identifizierung von Biotransformationsprodukten, die Hinweise auf die an ihrer Bildung beteiligten Mechanismen geben. Aus den experimentellen Daten zur Umsetzung der Schadstoffe durch die untersuchten Pilze lassen sich außerdem Rückschlüsse auf ihr Umweltverhalten in natürlichen aquatischen Systemen und die mögliche Funktion von aquatischen Pilzen hierfür ziehen. Zusätzlich zeichnet sich damit ein mögliches biotechnologisches Potenzial der aquatischen Pilze ab.

Für die Untersuchungen dienten der ubiquitär vorkommende Stamm *Myrioconium* sp. und der aquatische Hyphomycet *C. aquatica* als Vertreter der aquatischen Pilze. Beispielhaft für die umweltrelevanten Mikrokontaminanten wurden HHCB, AHTN und t-NP ausgewählt. HHCB und AHTN repräsentieren die polycyclischen Moschusduftstoffe, die sich auf Grund ihrer Persistenz in der aquatischen Umwelt anreichern. Das endokrin aktive t-NP setzt sich aus Konfigurationsisomeren der C₉-Alkylseitenkette zusammen und ist ein Produkt der unvollständigen Tensid-Biotransformation. Wie HHCB und AHTN ist auch t-NP in unterschiedlichen, aquatischen Umweltkompartimenten zu finden.

Für die Biotransformation der drei ausgewählten Verbindungen durch aquatische Pilze konnten sowohl intra- als auch extrazelluläre enzymatische Prozesse als relevant identifiziert werden (Abb. 6). Intrazellulär gebildete Metabolite sind auf Biotransformationsreaktionen wie Hydroxylierung, weiterführende Oxidationen zu Keto- und Aldehydverbindungen, sowie Methylierung zurückzuführen, die unabhängig vom Schadstoff nachgewiesen wurden. Daneben finden sich ebenfalls Schadstoff-spezifische Transformationen, wie die Reduktion der Ketogruppe von AHTN oder die weitere Oxidation von Alkylketten-hydroxylierten NP-

Isomeren zu Carboxylphenolen. Die intrazellulären Enzyme, die an diesen Reaktionen beteiligt sind, sind gegenwärtig nicht bekannt. *Myriocoonium* sp. und *C. aquatica* produzieren extrazelluläre Laccasen, die an der Umsetzung aller drei untersuchten Xenobiotika beteiligt sind. Die damit verbundenen radikalischen Prozesse können unterschiedliche, abiotische Folgereaktionen, wie Polymerisation oder Oxidation, nach sich ziehen.

Im Folgenden wird detaillierter auf die Biotransformation der untersuchten Substanzklassen und die daran beteiligten Mechanismen eingegangen.

HHCB und AHTN

Die Literaturdaten zur Metabolitbildung während der biologischen Umsetzung von HHCB und AHTN sind unzureichend und beschränken sich zumeist auf die Aussage, dass die gebildeten Produkte hydrophiler als ihre Ausgangsverbindungen sind. Sowohl für HHCB als auch für AHTN gelang es bislang, unbekannte Biotransformationsprodukte mittels GC-MS zu detektieren, deren massenspektrometrische Daten eine Strukturzuweisung erlaubten. Anhand dieser Strukturen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Metabolite höchstwahrscheinlich durch intrazelluläre Reaktionen gebildet werden. Für AHTN wurden zusätzlich bereits beschriebene Produkte photochemischer Reaktionen identifiziert.

In Experimenten mit Laccase-haltigen, aufkonzentrierten Kulturüberständen von *Myriocoonium* sp. und *C. aquatica* konnte gezeigt werden, dass sowohl HHCB als auch AHTN durch diese Enzyme oxidiert werden. Für HHCB-enthaltende Laccase-Konzentrate wurde dabei eine Zunahme der Konzentration des HHCB-Lactons, einem bereits in der Literatur zitierten Metaboliten, detektiert. Die Abnahme des HHCB-Gehaltes in den entsprechenden, enzymatischen Versuchen korrelierte mit der Zunahme des HHCB-Lactons, das mittels „attenuated total reflection fourier transform-infrared“-Spektroskopie und GC-MS/MS-basierter Methoden identifiziert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit erstmalig der Nachweis erbracht werden, dass ein Enzym die Reaktion des HHCB zum Lacton katalysiert. Davon ausgehend wurde ein Reaktionsmechanismus entwickelt, der im ersten Schritt die durch Laccasen katalysierte Radikalbildung von HHCB beschreibt.

Myriocoonium sp. Laccase erwies sich, verglichen mit der *C. aquatica* Laccase, bei der Umsetzung von HHCB und AHTN als das effektivere Enzym. Aus diesem Grund wurde die extrazelluläre Laccase von *Myriocoonium* sp. isoliert, gereinigt und biochemisch untersucht. Daneben gestattete die molekularbiologische Analyse die Sequenzierung des Laccase-codierenden Gens. Die damit in Zusammenhang stehende Publikation (Martin *et al.*, 2007) repräsentiert die erste Charakterisierung der extrazellulären Laccase eines aquatischen Pilzisolates, dessen Teleomorphe den Ascomyceten zugeordnet werden kann. Die erhaltenen Daten erweitern das Wissen über strukturelle und katalytische Eigenschaften von Ascomyceten-Laccasen und geben Einblicke in deren mögliche, ökologische Funktionen und

die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen. *Myrioconium* sp. Laccase zeigte die größte Ähnlichkeit zu Laccasen der Familie der *Sclerotiniaceae*, Ordnung *Helotiales*.

Technisches Nonylphenol

Die Trennung der Konfigurationsisomere des t-NP stellt ein anspruchsvolles, analytisches Problem dar. In dieser Arbeit wurden verschiedene analytische Methoden, die auf gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion basieren, eingesetzt, um eine möglichst vollständige Separierung zu erreichen und gleichzeitig strukturelle Informationen zu erhalten. Im Ergebnis war mittels GCxGC-TOF-MS die Trennung von über 40 Isomeren möglich. Zudem unterstützten massenspektrometrische Daten der GC-MS/MS-Analyse von synthetisierten NP-Isomeren die Strukturfindung für bislang unbekannte, intrazellulär gebildete Metabolite. Dazu gehören ausschließlich Seitenketten-modifizierte Verbindungen, wie desaturierte, sowie Carboxyl- und Methoxy-Phenole und carboxylierte Phenole mit verkürzten Alkylseitenketten.

Bei der Biotransformation von t-NP in *C. aquatica* Kulturen bewirkten intrazelluläre Reaktionen die spezifische Umsetzung von distinkten Isomerengruppen. Extrazelluläre Laccase ist ebenfalls an der Biotransformation von t-NP durch *C. aquatica* Kulturen beteiligt, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig für aquatische Pilze nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu intrazellulären Reaktionen verläuft die Laccase-katalysierte Oxidation unterschiedlicher Gruppen von t-NP-Isomeren unspezifisch. Als Ursache hierfür ist der Angriff auf die Hydroxylgruppe des Phenols zu sehen, auf den die *para*-Substituenten offenbar nur einen geringen Einfluss haben.

Implikationen für natürlich ablaufende Biotransformationsprozesse in der aquatischen Umwelt

In aquatischen Systemen sind die oberen Sedimentschichten relevante Kompartimente für die co-metabolische Umsetzung von Mikroschadstoffen durch Pilze. Sie enthalten in unterschiedlichen Anteilen natürliches, organisches Material, das den Pilzen als Substrat dient. Solches Material kann Verbindungen, die die Laccase-Produktion in Pilzen stimulieren, enthalten sein. Zudem sorbieren hydrophobe Schadstoffe, wie HHCB, AHTN und t-NP, an natürlichem, organischem Material und gelangen damit in unmittelbare Nähe der Pilzhyphen. Dies kann zu einem verbesserten Massentransfer der Schadstoffe führen und folglich eventuell vorhandene kinetische Limitationen verringern. Aus den Daten zur Umsetzung von HHCB und AHTN durch *Myrioconium* sp. wurden Ratenkonstanten für eine Reaktion 1. Ordnung berechnet, die eine Abschätzung des Abbaus dieser Verbindungen in natürlichen Gewässersystemen erlauben. Je nach Anteil der aktiven, natürlichen Pilzbiomasse ergaben sich Halbwertszeiten für HHCB und AHTN, die eine signifikante Biotransformation der beiden Moschusduftstoffe innerhalb eines Jahres erwarten lassen. Die experimentellen Daten aus

Versuchen mit *C. aquatica* Kulturen lassen die Vermutung zu, dass die Umsetzung von t-NP durch aquatische Pilze ebenfalls in natürlichen Systemen von Bedeutung ist. Prinzipiell gelten hinsichtlich der aktiven Pilzbiomasse und der hydrophoben Eigenschaften des t-NP ähnliche Voraussetzungen für die Biotransformation wie im Falle von HHCB und AHTN.

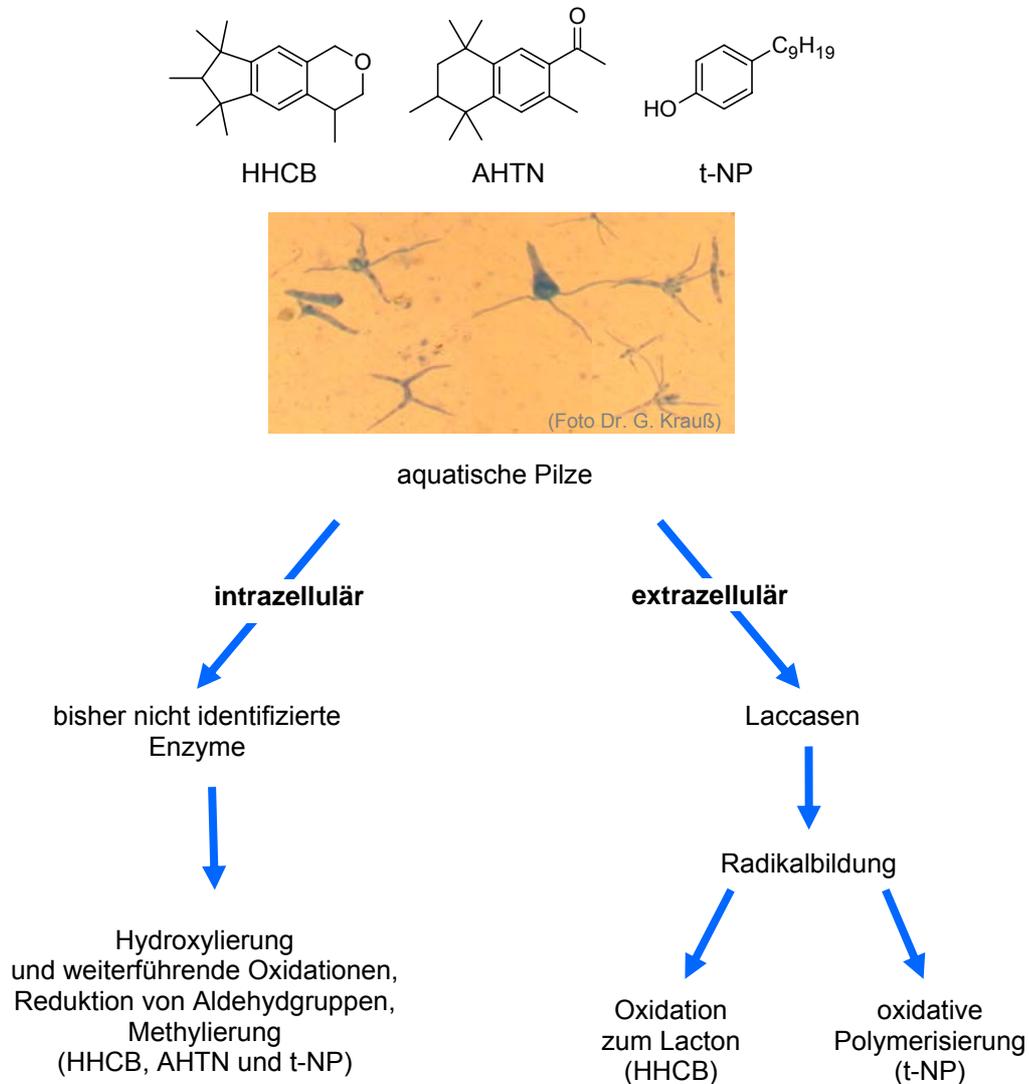


Abbildung 6 Biotransformationsmechanismen von HHCB, AHTN und t-NP durch aquatische Pilze.

Ausblick

Aquatische Pilze bilden zusammen mit Bakterien komplexe Mikrobengemeinschaften. Die mögliche Verkürzung von t-NP-Isomeren bei der Biotransformation durch Pilze, könnte zu Metaboliten führen, die von verschiedenen Bakterienstämmen angegriffen werden könnten, die nicht in der Lage sind t-NP umzusetzen. Bislang sind nur 3 Bakterienstämme bekannt, die t-NP aerob transformieren (Corvini *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu ist die Umsetzung von kurzkettigen Alkylphenolen, wie Kresolen oder Xylole, für eine Vielzahl von Bakterien beschrieben (Corvini *et al.*, 2006, Takeo *et al.*, 2006). Das mögliche

Zusammenspiel von Bakterien und Pilzen stellt einen interessanten Aspekt bei zukünftigen Untersuchungen zur Biotransformation von t-NP dar.

Untersuchungen, die die Rolle der Pilze im Gewässersystem klären sollen, bedürfen verlässlicher, molekularbiologischer Nachweismethoden zur Identifikation mikrobieller Gemeinschaften. Neben der Zusammensetzung der Gemeinschaften ist es für die Findung von Schlüsselarten entscheidend eine Methode anzuwenden, die quantitative Aussagen zulässt (Krauß *et al.*, 2008). Dafür eignet sich z. B. der "real-time terminal restriction fragment length polymorphism"-Assay (Yu *et al.*, 2005), der bereits für Umweltproben getestet wurde. Ein weiterer Aspekt ist der Nachweis funktionaler Gene kataboler Enzyme in der aquatischen Umwelt durch z. B. pilzspezifische PCR-Primer oder DNS-Mikroassays. Luis *et al.* (2005) beschrieben bereits für Waldboden den erfolgreichen Nachweis von Laccase-Genen terrestrischer Basidiomyceten mittels PCR der extrahierten DNS.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass sowohl aquatische Pilze als auch deren extrazelluläre Laccasen das Potenzial besitzen Mikrokontaminanten umzusetzen. Diese Ergebnisse implizieren die Möglichkeit einer biotechnologischen Nutzung der Pilze oder ihrer Enzyme z. B. in der Abwasseraufbereitung. Von Vorteil könnte dabei der Umstand sein, dass aquatische Pilze bereits an das Leben in wässrigen Systemen angepasst sind und zum Teil in extremen Habitaten mit hohen Metall- (Krauss *et al.*, 2001) oder Salzgehalten überleben können (Junghanns *et al.*, 2008).

7 Anhang

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende kumulative Dissertation von mir selbständig verfasst wurde und nur angegebene Hilfsmittel verwendet worden sind. Passagen dieser Arbeit, die aus anderen Schriften entnommen wurden, sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Leipzig, im März 2008

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs "Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe" der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dessen finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung meinen besonderen Dank verdient.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in der Abteilung Ökologische und Pflanzen-Biochemie in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ anfertigen zu können, für die hilfreiche Unterstützung und dem Interesse an meiner Arbeit.

Speziell bedanken möchte ich mich bei Dr. Dietmar Schlosser für die engagierte, wissenschaftliche Betreuung, die Einblicke in biologische Denkweisen, die Motivation und die ausgezeichneten, gemeinsamen Konferenzbesuche.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Gudrun Krauß für die Unterstützung in Pilz-Fragen sowie dem „Rest“ unserer ursprünglichen Pilzgruppe für das fruchtbare Arbeiten in Halle. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Charles Junghanns, der nicht nur mit seiner Diplomarbeit den Grundstein für meine Dissertation gelegt und mir mit seiner Kompetenz immer ausgeholfen hat, sondern auch zahllose gemeinsame Stunden in Labor, Büro und auf Reisen mit mir verbracht hat.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern des Departments Umweltmikrobiologie für die freundliche Aufnahme in Leipzig und die mir gewährte Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Co-Autoren der Publikationen, die einigen Anteil an dieser kumulativen Dissertation haben, für die konstruktive und lohnende Zusammenarbeit.

Unglaublich wichtig für die Anfertigung dieser Arbeit und darüber hinaus ist meine Familie. Danke!

Last but not least the gang and close friends that I don't want to forget to mention in this moment of maudlin.

Lebenslauf

Claudia Martin
 Kreuzstr. 24
 04103 Leipzig
 Tel: 0341 2278778
 E-mail: claudia.martin@arcormail.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum	28. 12. 1978
Geburtsort	Zwickau
Nationalität	deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit November 2007
 Produktmanagerin der AVIOR systems GmbH

Juli 2007 bis Oktober 2007
 Hilfwissenschaftlerin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ

Januar 2007 bis Juni 2007
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ

Oktober 2006 bis Dezember 2006
 Hilfwissenschaftlerin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ

Oktober 2003 bis September 2006
 Promotionsstudentin am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Gastwissenschaftlerin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ

Oktober 1998 bis Juni 2003
 Chemiestudium an der Universität Leipzig
Abschluss: Diplom Chemiker

Schulische Ausbildung

1992 bis 1998
 Käthe-Kollwitz-Gymnasium; Zwickau
Abschluss: Abitur

1985 bis 1992
 Polytechnische Oberschule Julian Marschlewski; Zwickau

Literatur

- Abdel-Raheem, A. M. und Ali, E.H., 2004, Lignocellulolytic enzyme production by aquatic hyphomycetes species isolated from Nile's delta region. *Mycopathologia* **157**, 277-286.
- Ahn, M.-Y.; Dec, J.; Kim, J.-E. und Bollag, J.-M., 2002, Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *Journal Environmental Quality* **31**, 1509-1515.
- Arst, H. N. und Macdonald, D. W., 1975, Gene cluster in *Aspergillus-nidulans* with an internally located *cis*-acting regulatory region. *Nature* **254**, 26-31.
- Augustin, T.; Schlosser, D.; Baumbach, R.; Schmidt, J.; Grancharov, K.; Krauss, G. und Krauss, G.-J., 2006, Biotransformation of 1-naphthol by a strictly aquatic fungus. *Current Microbiology* **52**, 216-220.
- Baldrian, P., 2006, Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 215-242.
- Balk, F. und Ford, R. A., 1999, Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU - I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters* **111**, 57-79.
- Barbetta, L.; Trowbridge, T. und Eldib, I. A., 1988, Musk aroma chemical industry. *Perfumer & Flavorist* **13**, 60-61.
- Bärlocher, F., 1992. *The ecology of aquatic hyphomycetes.*, Springer-Verlag, Berlin.
- Bärlocher, F., 2005. Freshwater fungal communities, in *The Fungal Community* 3rd ed., J. Dighton; P. Oudemans und J. White (eds.), Vol. 23, Dekker, New York, USA, pp 39-60.
- Bester, K., 2004, Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant. *Chemosphere* **57**, 863-870.
- Bester, K., 2005, Polycyclic musks in the Ruhr catchment area - transport, discharges of waste water, and transformations of HHCB, AHTN and HHCB-lactone. *Journal of Environmental Monitoring* **7**, 43-51.
- Biselli, S.; Gatermann, R.; Kallenborn, R.; Sydnes, L. K. und Hühnerfuss, H., 2004, Biotic and abiotic transformation pathways of synthetic musks in the aquatic environment. *Synthetic Musk Fragrances in the Environment* **3**, 189-211.
- Bitsch, N.; Dudas, C.; Korner, W.; Failing, K.; Biselli, S.; Rimkus, G. und Brunn, H., 2002, Estrogenic activity of musk fragrances detected by the E-screen assay using human MCF-7 cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **43**, 257-264.
- Boerjan, W.; Ralph, J. und Baucher, M., 2003, Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 519-546.
- Bokern, M.; Raid, P. und Harms, H., 1998, Toxicity, uptake and metabolism of 4-nonylphenol in root cultures and intact plants under septic and aseptic conditions. *Environmental Science and Pollution Research* **5**, 21-27.
- Bollag, J.-M.; Liu, S.-Y. und Minard, R. D., 1982, Enzymatic oligomerization of vanillic acid. *Soil Biology and Biochemistry* **14**, 157-163.
- Bollag, J. M. und Myers, C., 1992, Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances. *Science of the Total Environment* **117-118**, 357-366.
- Braun, P.; Moeder, M.; Schrader, S.; Popp, P.; Kusch, P. und Engewald, W., 2003, Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17[alpha]-ethinylestradiol in

- wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **988**, 41-51.
- Bucher, V. V. C.; Pointing, S. B.; Hyde, K. D. und Reddy, C. A., 2004, Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi. *Microbial Ecology* **48**, 331-337.
- Buerge, I. J.; Buser, H. R.; Müller, M. D. und Poiger, T., 2003, Behavior of the polycyclic musks HHCB and AHTN in lakes, two potential anthropogenic markers for domestic wastewater in surface waters. *Environmental Science & Technology* **37**, 5636-5644.
- Bursch, W.; Fuerhacker, M.; Gemeiner, M.; Grillitsch, B.; Jungbauer, A.; Kreuzinger, N.; Moestl, E.; Scharf, S.; Schmid, E.; Skutan, S. und Walter, I., 2004, Endocrine disrupters in the aquatic environment: the Austrian approach - ARCEM. *Water Science and Technology* **50**, 293-300.
- Cabana, H.; Jiwan, J.; Rozenberg, R.; Elisashvili, V.; Penninckx, M.; Agathos, S. und Jones, J., 2007, Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* **67**, 770-778.
- Camarero, S.; Ibarra, D.; Martinez, M. J. und Martinez, A. T., 2005, Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1775-1784.
- Chefetz, B.; Chen, Y. und Hadar, Y., 1998, Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3175-3179.
- Cirja, M.; Zuhlke, S.; Ivashechkin, P.; Schäffer, A. und Corvini, P. F. X., 2006, Fate of a ¹⁴C-labeled nonylphenol isomer in a laboratory-scale membrane bioreactor. *Environmental Science & Technology* **40**, 6131-6136.
- Claus, H., 2003, Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* **179**, 145-150.
- Collins, P. J.; Kotterman, M. J. J.; Field, J. A. und Dobson, A. D. W., 1996, Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4563-4567.
- Corvini, P. F.; Hollender, J.; Ji, R.; Schumacher, S.; Prell, J.; Hommes, G.; Priefer, U.; Vinken, R. und Schäffer, A., 2005, The degradation of alpha-quaternary nonylphenol isomers by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 involves a type II ipso-substitution mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1**, 114-122.
- Corvini, P.; Schäffer A.; Schlosser, D.. 2006. Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols-our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 223-243.
- Corvini, P. F. X.; Vinken, R.; Hommes, G.; Schmidt, B. und Dohmann, M., 2004, Degradation of the radioactive and non-labelled branched 4(3',5'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol nonylphenol isomer by *Sphingomonas* TTNP3. *Biodegradation* **15**, 9-18.
- Dawel, G.; Kästner, M.; Michels, J.; Poppitz, W.; Günther, W. und Fritsche, W., 1997, Structure of a laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2560-2565.
- DiFrancesco, A. M.; Chiu, P. C.; Standley, L. J.; Allen, H. E. und Salvito, D. T., 2004, Dissipation of fragrance materials in sludge-amended soils. *Environmental Science and Technology* **38**, 194-201.
- Dubroca, J.; Brault, A.; Kollmann, A.; Touton, I.; Jolival, G.; Kerhoas, L. und Mouglin, C.: 2005. Biotransformation of nonylphenol surfactants in soils amended with contaminated sewage sludges, in *Environmental chemistry: Green chemistry and*

- pollutants in ecosystems*, E. Lichtfouse; S. Dudd und D. Robert (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 305-315.
- Duran, N.; Rosa, M. A.; D'Annibale, A. und Gianfreda, L., 2002, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 907-931.
- Edens, W. A.; Goins, T. Q.; Dooley, D. und Henson, J. M., 1999, Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3071-3074.
- Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J. F. und Eriksson, K. E., 1996, A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* **391**, 144-148.
- Eschke, H. D.; Traud, D. und Dibowski, H. J., 1994, Untersuchungen zum Vorkommen polycyclischer Moschus-Duftstoffe in verschiedenen Umweltkompartimenten - Nachweis und Analytik mit GC/MS in Oberflächen-, Abwässern und Fischen (1. Mitteilung). *Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **6**, 183-189.
- Fabbrini, M.; Galli, C. und Gentili, P., 2002, Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **16**, 231-240.
- Fedorak, P. M. und Westlake, D. W. S., 1986, Fungal metabolism of n-alkylbenzenes. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 435-437.
- Fernández-Larrea, J. und Stahl, U., 1996, Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular and General and Genetics* **V252**, 539-551.
- Findlay, S.; Tank, J.; Dye, S.; Valett, H. M.; Mulholland, P. J.; McDowell, W. H.; Johnson, S. L.; Hamilton, S. K.; Edmonds, J.; Dodds, W. K. und Bowden, W. B., 2002, A cross-system comparison of bacterial and fungal biomass in detritus pools of headwater streams. *Microbial Ecology* **43**, 55-66.
- Font, X.; Caminal, G.; Gabarrell, X. und Vicent, T., 2006, Treatment of toxic industrial wastewater in fluidized and fixed-bed batch reactors with *Trametes versicolor*: influence of immobilisation. *Environmental Technology* **27**, 845-854.
- Franke, S.; Meyer, C.; Heinzl, N.; Gatermann, R.; Hühnerfuss, H.; Rimkus, G.; König, W. A. und Francke, W., 1999, Enantiomeric composition of the polycyclic musks HHCB and AHTN in different aquatic species. *Chirality* **11**, 795-801.
- Fries, E. und Püttmann, W., 2003, Occurrence and behaviour of 4-nonylphenol in river water of Germany. *Journal of Environmental Monitoring* **5**, 598-603.
- Gabriel, F. L. P.; Giger, W.; Guenther, K. und Kohler, H.-P. E., 2005a, Differential degradation of nonylphenol isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1123-1129.
- Gabriel, F. L. P.; Heidelberg, A.; Rentsch, D.; Giger, W.; Guenther, K. und Kohler, H.-P. E., 2005b, A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram: ipso-hydroxylation and intramolecular rearrangement. *Journal Biological Chemistry* **280**, 15526-15533.
- Galhaup, C.; Goller, S.; Peterbauer, C. K.; Strauss, J. und Haltrich, D., 2002, Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* **148**, 2159-2169.
- Gatermann, R.; Biselli, S.; Hühnerfuss, H.; Rimkus, G. G.; Hecker, M. und Karbe, L., 2002, Synthetic musks in the environment. Part 1: Species-dependent bioaccumulation of polycyclic and nitro musk fragrances in freshwater fish and mussels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **42**, 437-446.

- Giardina, P.; Autore, F.; Faraco, V.; Festa, G.; Palmieri, G.; Piscitelli, A. und Sannia, G., 2007, Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 1293-1300.
- Gonzalez, S.; Petrovic, M. und Barcelo, D., 2004, Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *Journal of Chromatography A* **1052**, 111-120.
- Guenther, K.; Heinke, V.; Thiele, B.; Kleist, E.; Prast, H. und Raecker, T., 2002, Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science and Technology* **36**, 1676-1680.
- Gulis, V. und Suberkropp, K., 2003, Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microbial Ecology* **45**, 11-19.
- Gundersen, J. L., 2001, Separation of isomers of nonylphenol and select nonylphenol. *Journal of Chromatography A* **914**, 161-166.
- Harynuk, J. und Gorecki, T., 2003, New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1019**, 53-63.
- He, Y. und Lee, H. K., 1996, Separation of structural homologues of alkylphenols and isomers of 4-nonylphenol by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **749**, 227-236.
- Heberer, T., 2003, Occurrence, fate, and assessment of polycyclic musk residues in the aquatic environment of urban areas - A review. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **30**, 227-236.
- Heemken, O. P.; Reincke, H.; Stachel, B. und Theobald, N., 2001, The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* **45**, 245-259.
- Heraproject: 2004. Human and environmental risk assessment on ingredients of household cleaning products. Polycyclic musks AHTN (CAS 1506-02-1) and HHCB (CAS 1222-05-05); HERA report, environmental section; Human and Environmental Risk Assessment: Brussels, Belgium, 2004; http://www.heraproject.com/files/29-E-04_pcm_HHCB_AHTN_HERA_Environmenta_DISCLed26.pdf.
- Hoegger, P. J.; Kilaru, S.; James, T. Y.; Thacker, J. R. und Ku, U., 2006, Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* **273**, 2308-2326.
- Huang W.-Y. und Sheu, S.-J., 2006, Separation and identification of the organic acids in *Angelicae Radix* and *Ligustici Rhizoma* by HPLC and CE. *Journal of Separation Science* **29**, 2616-2624.
- Hühnerfuss, H. B., S.; Gatermann, R., 2004, Enantioselective analysis of polycyclic Musks as a versatile tool for understanding of environmental processes, in *Handbook of Environmental Chemistry* 3th. ed., Springer Verlag KG, Berlin, pp. 213-232
- Ieda, T.; Horii, Y.; Petrick, G.; Yamashita, N.; Ochiai, N. und Kannan, K., 2005, Analysis of nonylphenol isomers in a technical mixture and in water by comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* **39**, 7202-7207.
- Iqbal, S. H. und Webster, J., 1973, Aquatic hyphomycete spora of the River Exe and its tributaries. *Transactions of the British Mycological Society* **61**, 233-241.

- Itrich, N. R.; Simonich, S. L. und Federle, T. W.: 1998. Biotransformation of the polycyclic musk, HHCB, during sewage treatment. Poster Presentation at the SETAC 19th Annual Meeting, 14-15 November, Charlotte, NC, USA.
- Jeannot, R.; Sabik, H.; Sauvard, E.; Dagnac, T. und Dohrendorf, K., 2002, Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **974**, 143-159.
- Jigami, Y.; Kawasaki, Y.; Omori, T. und Minoda, Y., 1979, Coexistence of different pathways in the metabolism of n-propylbenzene by *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **38**, 783-788.
- Johannes, C. und Majcherczyk, A., 2000, Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 524-528.
- Joss, A.; Keller, E.; Alder, A. C.; Göbel, A.; McArdell, C. S.; Ternes, T. und Siegrist, H., 2005, Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research* **39**, 3139-3142.
- Junghanns, C.; Krauss, G. und Schlosser, D., 2008, Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technol* **99**, 12251235.
- Junghanns, C.; Moeder, M.; Krauss, G.; Martin, C. und Schlosser, D., 2005, Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* **151**, 45-57.
- Kannan, K.; Reiner, J. L.; Yun, S. H.; Perrotta, E. E.; Tao, L.; Johnson-Restrepo, B. und Rodan, B. D., 2005, Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere* **61**, 693-700.
- Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Corran, A. J.; Baldwin, B. C.; Parks, L. W. und Kelly, D. E., 1995, Purification and reconstitution of activity of *Saccharomyces cerevisiae* P450 61, a sterol delta 22-desaturase. *FEBS Letters* **377**, 217-220.
- Kiiskinen, L.-L.; Kruus, K.; Bailey, M.; Ylosmaki, E.; Siika-aho, M. und Saloheimo, M., 2004, Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* **150**, 3065-3074.
- Kiiskinen, L. L.; Viikari, L. und Kruus, K., 2002, Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 198-204.
- Kilaru, S.; Hoegger, P. und Kües, U., 2006, The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* **50**, 45-60.
- Kim, Y.-S.; Katase, T.; Sekine, S.; Inoue, T.; Makino, M.; Uchiyama, T.; Fujimoto, Y. und Yamashita, N., 2004, Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* **54**, 1127-1134.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; David, J. C. und Staplers, J. A., eds.: 2001, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th Edition, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Kollmann, A.; Brault, A.; Touton, I.; Dubroca, J.; Chaplain, V. und Mouglin, C., 2003, Effect of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. *Journal of Environmental Quality* **32**, 1269-1276.
- Kraft, P., 2004, 'Brain aided' musk design. *Chemistry & Biodiversity* **1**, 1957-1974.

- Krauss, G.-J.; Wesenberg, D.; Ehrman, J.; Solé, M.; Miersch, J. und Krauss, G.: 2008. 'Fungal Responses to heavy metals', in *Novel techniques and ideas in mycology*, K. Sridhar; F. Bärlocher und Hyde, K.D. (eds.), Fungal Diversity Press, Hong Kong, **in press**.
- Krauss, G.; Bärlocher, F.; Krauss, G. J.: 2003a. 'Effects of pollution on aquatic hyphomycetes', in *Freshwater Mycology*, Tsui, C. K. M. und Hyde, K. D (eds.) Vol. 10, Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 211-230.
- Krauss, G.; Bärlocher, F.; Schreck, P.; Wennrich, R.; Glaesser, W. und Krauss, G. J., 2001, Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Nova Hedwigia* **72**, 419-428.
- Krauss, G.; Schlosser, D. und Krauss, G.-J.: 2005. 'Aquatic fungi in heavy metal and organically polluted habitats', in *Biodiversity of fungi: their role in human life*, S. K. Deshmukh und M. K. Rai (eds.), Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, Plymouth, UK, pp. 221-249.
- Krauss, G.; Sridhar, K. R.; Jung, K.; Wennrich, R.; Ehrman, J. und Bärlocher, F., 2003b, Aquatic hyphomycetes in polluted groundwater habitats of central Germany. *Microbial Ecology* **45**, 329-339.
- Kristenson, E. M.; Korytar, P.; Danielsson, C.; Kallio, M.; Brandt, M.; Makela, J.; Vreuls, R. J. J.; Beens, J. und Brinkman, U. A. T., 2003, Evaluation of modulators and electron-capture detectors for comprehensive two-dimensional GC of halogenated organic compounds. *Journal of Chromatography A* **1019**, 65-77.
- Lalah, J. O.; Behecti, A.; Severin, G. F.; Lenoir, D.; Günther, K.; Kettrup, A. und Schramm, K. W., 2003a, The bioaccumulation and fate of a branched ¹⁴C-p-nonylphenol isomer in *Lymnaea stagnalis* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 1428-36.
- Lalah, J. O.; Schramm, K. W.; Henkelmann, B.; Lenoir, D.; Behecti, A.; Günther, K. und Kettrup, A., 2003b, The dissipation, distribution and fate of a branched ¹⁴C-nonylphenol isomer in lake water/sediment systems. *Environmental Pollution* **122**, 195-203.
- Larrondo, L. F.; Avila, M.; Salas, L.; Cullen, D. und Vicuna, R., 2003, Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispota* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology* **149**, 1177-1782.
- Liers, C.; Ullrich, R.; Pecyna, M.; Schlosser, D. und Hofrichter, M., 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.
- Litvintseva, A. P. und Henson, J. M., 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.
- Luckenbach, T.; Ilaria, C. und Epel, D., 2004, Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Marine Environmental Research* **58**, 215-219.
- Luis, P.; Kellner, H.; Zimdars, B.; Langer, U.; Martin, F. und Buscot F., 2005, Patchiness and spatial distribution of laccase genes of ectomycorrhizal, saprotrophic, and unknown basidiomycetes in the upper horizons of a mixed forest cambisol. *Microbial Ecology* **50**, 570-579
- Majcherczyk, A.; Johannes, C. und Hüttermann, A., 1999, Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 267-276.

- Marriott, P.; Dunn, M.; Shellie, R. und Morrison, P., 2003, Targeted multidimensional gas chromatography using microswitching and cryogenic modulation. *Analytical Chemistry* **75**, 5532-5538.
- Martin, C.; Moeder, M.; Daniel, X.; Krauss, G. und Schlosser, D., 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.
- Mayer, A. M. und Staples, R. C., 2002, Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551-565.
- Mejanelle, L.; Lopez, J. F.; Gunde-Cimerman, N. und Grimalt, J. O., 2001, Ergosterol biosynthesis in novel melanized fungi from hypersaline environments. *Journal of Lipid Research* **42**, 352-359.
- Meldahl, A.; Nithipatikom, K. und Lech, J., 1996, Metabolism of several ¹⁴C-nonylphenol isomers by rainbow trout. *Xenobiotica*. **26**, 1167-1180.
- Mersch-Sundermann, V.; Kevekordes, S. und Jenter, C., 1998, Testing of SOS induction of artificial polycyclic musk fragrances in *E-coli* PQ37 (SOS chromotest). *Toxicology Letters* **95**, 147-154.
- Moeder, M.; Martin, C.; Schlosser, D.; Harynyuk, J. und Gorecki, T., 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.
- Moeder, M.; Schrader, S.; Winkler, M. und Popp, P., 2000, Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A* **873**, 95-106.
- Mougin, C.; Kollmann, A. und Jolival, C., 2002, Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters* **24**, 139-142.
- Nakata, H., 2005, Occurrence of synthetic musk fragrances in marine mammals and sharks from Japanese coastal waters. *Environmental Science and Technology* **39**, 3430-3434.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B. und Sannia, G., 2000, Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 920-924.
- Park, D., 1972, On the ecology of heterotrophic microorganisms in freshwater. *Transactions of the British Mycological Society* **58**, 291-299.
- Park, J.; Dec, J.; Kim, J. und Bollag, J., 2000, Dehalogenation of xenobiotics as a consequence of binding to humic materials. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**, 405-410.
- Peck, A. und Hornbuckle, K., 2006, Aquatic Processes and Systems in Perspective Environmental sources, occurrence, and effects of synthetic musk fragrances. *Journal of Environmental Monitoring* **8**, 874-879.
- Pursch, M.; Eckerle, P.; Biel, J.; Streck, R.; Cortes, H.; Sun, K. und Winniford, B., 2003, Comprehensive two-dimensional gas chromatography using liquid nitrogen modulation: set-up and applications. *Journal of Chromatography A* **1019**, 43-51.
- Ravelet, C.; Grosset, C.; Krivobok, S.; Montuelle, B. und Alary, J., 2001, Pyrene degradation by two fungi in a freshwater sediment and evaluation of fungal biomass by ergosterol content. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 803-808.
- Reiner, J. L. und Kannan, K., 2006, A survey of polycyclic musks in selected household commodities from the United States. *Chemosphere* **62**, 867-873.

- Rimkus, G. G., 1999, Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters* **111**, 37-56.
- Rimkus, G. G. und Wolf, M., 1996, Polycyclic musk fragrances in human adipose tissue and human milk. *Chemosphere* **33**, 2033-2043.
- Riva, S., 2006, Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnology* **24**, 219-226.
- Romani, A. M.; Fischer, H.; Mille-Lindblom, C. und Tranvik, L. J., 2006, Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities. *Ecology* **87**, 2559-2569.
- Rothman, A. M., 1982, High-performance liquid chromatographic method for determining ethoxymer distribution of alkylphenoxy polyoxyethylene surfactants. *Journal of Chromatography A* **253**, 283-288.
- Russ, A. V., R.; Schuphan, I.; Schmidt, B., 2005, Synthesis of branched *para*-nonylphenol isomers: Occurrence and quantification in two commercial mixtures. *Chemosphere* **60**, 1624-1635.
- Ryan, D. R.; Leukes, W. D. und Burton, S. G., 2005, Fungal bioremediation of phenolic wastewaters in an airlift reactor. *Biotechnology Progress* **21**, 1068-1074.
- Saito, T.; Hong, P.; Kato, K.; Okazaki, M.; Inagaki, H.; Maeda, S. und Yokogawa, Y., 2003, Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family *Chaetomiaceae*) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 520-526.
- Saito, T.; Kato, K.; Yokogawa, Y.; Nishida, M. und Yamashita, N., 2004, Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **98**, 64-66.
- Salvo, V. S.; Gallizia, I.; Moreno, M. und Fabiano, M., 2005, Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Marine Pollution Bulletin* **50**, 553-559.
- Sanchez-Prado, L.; Lourido, M.; Lores, M.; Llompert, M.; Garcia-Jares, C. und Cela, R., 2004, Study of the photoinduced degradation of polycyclic musk compounds by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 1186-1192.
- Sariaslani, F. S.; Harper, D. B. und Higgins, I. J., 1974, Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*. *The Biochemical Journal* **140**, 31-45.
- Schlosser, D.; Grey, R. und Fritsche, W., 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.
- Schlosser, D.; Solé, M.; Wesenberg, D.; Geyer, R. und Krauss, G.: 2008. 'Responses of fungi to organic pollutants. In: Novel techniques and ideas in mycology', in *Fungal Diversity Research Series*, K. R. Sridhar; F. Bärlocher und K. D. Hyde (eds.), Fungal Diversity Press, Hong Kong. **in press**
- Schmidt, B.; Patti, H.; Niewersch, C. und Schuphan, I., 2003, Biotransformation of [ring-U-¹⁴C]4-n-nonylphenol by *Agrostemma githago* cell culture in a two-liquid-phase system. *Biotechnology Letters* **25**, 1375-1381.
- Schreurs, R. H.; Quaedackers, M. E.; Seinen, W. und van der Burg, B., 2002, Transcriptional activation of estrogen receptor ERalpha and ERbeta by polycyclic musks is cell type dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology* **183**, 1-9.

- Schwaiger, J.; Mallow, U.; Ferling, H.; Knoerr, S.; Braunbeck, T.; Kalbfus, W. und Negele, R. D., 2002, How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology* **59**, 177-189.
- Schwaiger, J.; Spieser, O. H.; Bauer, C.; Ferling, H.; Mallow, U.; Kalbfus, W. und Negele, R. D., 2000, Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* **51**, 69-78.
- Seinen, W.; Lemmen, J. G.; Pieters, R. H.; Verbruggen, E. M. und van der Burg, B., 1999, AHTN and HHCB show weak estrogenic - but no uterotrophic activity. *Toxicology Letters* **111**, 161-168.
- Servos, M. R., 1999, Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada* **34**, 123-177.
- Shearer, C. A.; Descals, E.; Kohlmeyer, B.; Kohlmeyer, J.; Marvanova, L.; Padgett, D.; Porter, D.; Raja, H. A.; Schmit, J. P.; Thorton, H. A. und Voglymayr, H., 2007, Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers Conserv* **16**, 49-67.
- Simonich, S. L.; Federle, T. W.; Eckhoff, W. S.; Rottiers, A.; Webb, S.; Sabaliunas, D. und de Wolf, W., 2002, Removal of Fragrance Materials during U.S. and European Wastewater Treatment. *Environ.Sci.Technol.* **36**, 2839-2847.
- Siqueira, J. O.; Nair, M. G.; Hammerschmidt, R. und Safir, G. R., 1991, Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. *Critical Reviews in Plant Science* **10**, 63-121.
- Soares, A.; Guieysse, B. und Mattiasson, B., 2006, Influence of agitation on the removal of nonylphenol by the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera* sp BOL 13. *Biotechnology Letters* **28**, 139-143.
- Soares, A.; Jonasson, K.; Terrazas, E.; Guieysse, B. und Mattiasson, B., 2005, The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 719-725.
- Soden, D. M. und Dobson, A. D. W., 2001, Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* **147**, 1755-1763.
- Solé, M.; Fetzter, I.; Wennrich, R.; Sridhar, K. R.; Harms, H. H. und Krauss, G., 2008, Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for assessing anthropogenic stress. *Science of the Total Environment* **389**, 557-565.
- Sommer, C.: 2004. 'The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry', in *The Handbook of Environmental Chemistry*, G. G. Rimkus (ed.), Vol. 3: Anthropogenic Compounds, pp. 1-16.
- Somogyi, L. P. und Kishi, A., 2001, *Aroma Chemicals and the Flavor and Fragrance Industry*. Chemical Economics Handbook SRI International, Menlo Park, CA.
- Spieser, O. H.; Schwaiger, J.; Ferling, H.; Negele, R. D., 2000, 'An introduction to behavioral monitoring effects of nonylphenol and ethinylestradiol on swimming behavior of juvenile carp', in *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Butterworth, F. M.; Gunatilaka, G.; Gosebatt, M. E. (ed.) Vol. 2, Plenum press, New York, pp. 93-112.
- Sridhar, K. R. und Bärlocher, F., 2000, Initial colonization, nutrient supply, and fungal activity on leaves decaying in streams. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1114-1119.
- Sridhar, K. R.; Bärlocher, F.; Wennrich, R.; Krauss, G.-J. und Krauss, G., 2007, Fungal biomass and diversity in sediments and on leaf litter in heavy metal and organically

- contaminated waters of Central Germany. *Fundamental and Applied Limnology (Arch. Hydrobiol.)* **in press**.
- Stapleton, P. C. und Dobson, A. D. W., 2003, Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 167-172.
- Steinberg, P.; Fischer, T.; Arand, M.; Park, E.; Elmadfa, I.; Rimkus, G.; Brunn, H. und Dienes, H. P., 1999, Acute hepatotoxicity of the polycyclic musk 7-acetyl-1,1,3,4,4, 6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthaline (AHTN). *Toxicology Letters* **111**, 151.
- Suberkropp, K., 2001, Fungal growth, production, and sporulation during leaf decomposition in. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5063-5068.
- Tabira, Y.; Nakai, M.; Asai, D.; Yakabe, Y.; Tahara, Y.; Shinmyozu, T.; Noguchi, M.; Takatsuki, M. und Shimohigashi, Y., 1999, Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *European Journal of Biochemistry* **262**, 240-245.
- Takeo, M.; Prabu, S. K.; Kitamura, C.; Hirai, M.; Takahashi, H.; Kato, D. und Negoro, S., 2006, Characterization of alkylphenol degradation cluster in *Pseudomonas putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenols and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 352-261.
- Tanghe, T.; Dhooge, W. und Verstraete, W., 2000, Formation of the metabolic intermediate 2,4,4-trimethyl-2-pentanol during incubation of a *Sphingomonas* sp. strain with the xeno-estrogenic octylphenol. *Biodegradation* **11**, 11-19.
- Ternes, T. A.; Herrmann, N.; Bonerz, M.; Knacker, T.; Siegrist, H. und Joss, A., 2004, A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research* **38**, 4075-4084.
- Tetsch, L.; Bend, J. und Hölker, U., 2006, Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**, 183-194.
- Thiele, B.; Heinke, V.; Kleist, E. und Guenther, K., 2004, Contribution to the structural elucidation of 10 isomers of technical *p*-nonylphenol. *Environmental Science and Technology* **38**, 3405-3411.
- Thurston, C. F., 1994, The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Tsutsumi, Y.; Haneda, T. und Nishida, T., 2001, Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* **42**, 271-276.
- Vallini, G.; Frassinetti, S.; D'Andrea, F.; Catelani, G. und Agnolucci, M., 2001, Biodegradation of 4-(1-nonyl)phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquatextoris*: identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. *International Biodeterioration & Biodegradation* **47**, 133-140.
- Webster, J.; Rayner, A. D. M.; Brasier, C. M. und Moore, D.: 1987. 'Convergent evolution and the functional significance of spore shape in aquatic and semi-aquatic fungi', in, *Evolutionary Biology of the Fungi. British Mycological Society Symposium 12*, University Press, Cambridge, pp. 191-201.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I. und Agathos, S. N., 2003, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* **22**, 161-187.
- Wheeler, T. F.; Heim, J. R.; LaTorre, M. R. und Janes, A. B., 1997, Mass spectral characterization of *p*-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* **35**, 19-30.

- Winkler, M.; Kopf, G.; Hauptvogel, C. und Neu, T., 1998, Fate of artificial musk fragrances associated with suspended particulate matter (SPM) from the River Elbe (Germany) in comparison to other organic contaminants. *Chemosphere* **37**, 1139-1156.
- Wollenberger, L.; Breitholtz, M.; Ole Kusk, K. und Bengtsson, B. E., 2003, Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Sci Total Environ* **305**, 53-64.
- Wong, M. K. M.; Goh, T. K.; Hodgkiss, I. J.; Hyde, K. D.; Ranghoo, V. M.; Tsui, C. K. M.; Ho, W. H.; Wong, W. S. W. und Yuen, T. K., 1998, Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation* **7**, 1187-1206.
- Wormuth, M.; Scheringer, M. und Hungerbühler, K., 2005, Linking the use of scented consumer products to consumer exposure to polycyclic musk fragrances. *Journal of Industrial Ecology* **9**, 237-258.
- 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.
- Xu, F., 1997, Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 924-928.
- Ying, G.-G.; Williams, B. und Kookana, R., 2002, Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environment International* **28**, 215-226.
- Yoshida, H., 1883, Chemistry of lacquer (urushi). *Journal of the Chemical Society* **43**, 472-486.
- Yoshitake, A.; Katayama, Y.; Nakamura, M.; Limura, Y.; Kawai, S. und Morohoshi, N., 1993, N-Linked carbohydrate chains protect laccase-III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology* **139**, 179-185.
- Yu, C.-P.; Ahuja, R.; Sayler, G. and Chu, K.-H., 2005, Quantitative molecular assay for fingerprinting microbial communities of wastewater and estrogen-degrading consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1433-1444.