

Wirkungen von Schwermetallen auf aquatische Pilze aus mikrobiellen Biozönosen des Mansfelder Landes



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Dipl.-Biologin Petra Jaeckel
geb. am: 12.08.1971, in Bremerhaven

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. -J. Krauß
2. Prof. Dr. F. Bärlocher
3. Dr. habil. D. Neumann

Halle/Saale 20.03.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004155

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004155>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalienverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Haldensickerwässer des Mansfelder Landes	1
1.2	Extrazelluläre Komplexierung, Biosorption und Akkumulation von Schwermetallen	4
1.3	Toxische Wirkung von Schwermetallen auf Pilze.....	5
1.4	Bedeutung von thiolhaltigen Peptiden und Proteinen für die Schwermetalltoleranz von Pilzen	7
1.4.1	Glutathion.....	7
1.4.2	Metallothioneine.....	9
1.4.3	Phytochelatine (MT Familie 99)	11
1.4.4	Kompartimentierung von Cd(II).....	14
1.5	Problemstellung und Ziel der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Isolation von Pilzen aquatischer Standorte	17
2.2	Herkunft der Pilzstämm.....	17
2.3	Medien	19
2.4	Stammhaltung.....	20
2.5	Bestimmung des radialen Wachstums in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur	20
2.6	Wachstumsstudien in Flüssigkultur	21
2.6.1	Kultivierung der Pilze in Flüssigkultur	21
2.6.2	Wachstum in unbelasteter Kultur	21
2.6.3	Wachstum in schwermetallhaltiger Flüssigkultur	22

2.6.4	Bestimmung des I ₅₀ -Wertes (50 %-ige Wachstumsinhibition) für Cd(II), Cu(II) und Zn(II).....	22
2.7	Bestimmung der biosorbierten und akkumulierten Schwermetalle.....	23
2.7.1	Elution des biosorbierten Schwermetalls	23
2.7.2	Myzelaufschluss	23
2.7.3	Schwermetallanalytik	24
2.7.4	Biosorptions- und Akkumulationsversuche	24
2.8	Bildung und Nachweis thiolhaltiger Peptide und Proteine unter Schwermetallbelastung.....	25
2.8.1	Extraktion thiolhaltiger Verbindungen.....	25
2.8.1.1	Extraktion nach GALLEGO et al. (1996)	25
2.8.1.2	Extraktion thiolhaltiger Verbindungen nach GRILL et al. (1991)	25
2.8.2	Enzymatische Bestimmung des GSH-Gehaltes.....	25
2.8.3	Bestimmung des GTSH-Gehaltes	27
2.8.4	Analytik der thiolhaltigen Peptide und Proteine	27
2.8.5	Proteintrennung mittels Gelfiltration.....	28
2.8.6	Massenspektrometrie.....	28
2.8.7	Edman-Sequenzierung.....	29
2.8.8	Bildung thiolhaltiger Peptide und Proteine unter Schwermetallbelastung.....	29
2.9	Statistische Auswertung von Ergebnissen.....	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Wachstumsuntersuchungen	32
3.1.1	Wachstum in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur	32
3.1.1.1	Wachstum der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1	32
3.1.1.2	Wachstum der <i>Phialophora</i> sp.-Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4/P/15	34
3.1.2	Wachstum der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4P/15 in unbelasteter Flüssigkultur.....	36
3.1.3	Schwermetalltoleranz der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4/P/15	37

3.2	Studien zur Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch	
	<i>H. lugdunensis</i>-Stamm H4/2/4	39
3.2.1	Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch <i>H. lugdunensis</i> - Stamm H4/2/4.....	39
3.2.2	Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch <i>V. cf. alboatrum</i> - Stamm H4/P/15.....	41
3.3	GSH- und GTSH-Gehalt der <i>H. lugdunensis</i>-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie	
	<i>V. cf. alboatrum</i>-Stamm H4/P/15 unter Schwermetallbelastung	42
3.3.1	GSH- und GTSH-Gehalt von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4/P/15 unter Cd(II)- oder Zn(II)-Belastung	42
3.3.2	GSH- und GTSH-Gehalt der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer	44
3.3.3	GSH- und GTSH-Gehalt der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration.....	46
3.3.4	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des GSH- und GTSH-Gehaltes der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der log-Phase.....	47
3.4	Induktion von PC₂ und MT`s in den <i>H. lugdunensis</i>-Stämmen H4/2/4 und	
	H8/2/1 durch Cd(II).....	50
3.4.1	Nachweis thiolhaltiger Verbindungen unter Cd(II)-Einfluss	50
3.4.2	Identifizierung von thiolhaltigen Verbindungen mittels Massenspektrometrie und Aminosäure-Sequenzierung.....	51
3.4.2.1	Nachweis eines gemischten Disulfids aus GSH und γ -Glutamylcystein in <i>H. lugdunensis</i> -Stamm H8/2/1.....	51
3.4.2.2	Nachweis von PC ₂	51
3.4.2.3	Nachweis von Metallothioneinen.....	52
3.4.3	Bildung von PC ₂ und MT1_HL in den <i>H. lugdunensis</i> -Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung in Abhängigkeit von der Kulturdauer.....	54
3.4.4	Bildung von PC ₂ und MT1_HL in den <i>H. lugdunensis</i> -Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration	56
3.4.5	Zeit- und Cd(II)-Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von PC ₂ und MT1_HL der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)- Applikation in der log-Phase	57

4	Diskussion	59
4.1	Wachstumsuntersuchungen	59
4.1.1	Bioverfügbarkeit von Schwermetallen	59
4.1.2	Schwermetalltoleranz-Screening in Oberflächenkultur	60
4.1.3	Wachstum der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4/P/15 in unbelasteter Flüssigkultur.....	63
4.1.4	Schwermetalltoleranz der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4/P/15	64
4.2	Studien zur Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch <i>H. lugdunensis</i>-Stamm H4/2/4 und <i>V. cf. alboatrum</i>-Stamm H4/P/15.....	67
4.2.1	Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch <i>H. lugdunensis</i> - Stamm H4/2/4.....	67
4.2.2	Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch <i>V. cf. alboatrum</i> - Stamm H4/P/15.....	70
4.2.3	Vergleich der getesteten Pilzstämmen.....	72
4.3	Wirkungen von Schwermetallen auf den Gehalt thiolhaltiger Peptide und Proteine der <i>H. lugdunensis</i>-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von <i>V. cf. alboatrum</i>-Stamm H4/P/15	74
4.3.1	GSH- und GTSH-Gehalt von <i>V. cf. alboatrum</i> -Stamm H4/P/15 unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung.....	74
4.3.2	Gehalt thiolhaltiger Verbindungen in den <i>H. lugdunensis</i> -Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung.....	75
4.3.2.1	Identifikation eines gemischten Disulfids	75
4.3.2.2	Nachweis von Metallothioneinen.....	76
4.3.2.3	Gehalt thiolhaltiger Peptide und Proteine der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer	77
4.3.2.4	Bildung thiolhaltiger Peptide und Proteine in den <i>H. lugdunensis</i> -Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration	84
4.3.2.5	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von thiolhaltigen Peptiden und Proteinen der <i>H. lugdunensis</i> -Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der log-Phase.....	86

4.3.3	Modell der Cd(II)-Detoxifikation von <i>H. lugdunensis</i> -Stamm H4/2/4 und H8/2/1	88
5	Zusammenfassung	91
6	Ausblick	94
7	Literaturverzeichnis	96

Anhang A, Daten und Abbildungen

Anhang B, Daten der Abbildungen

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
<i>A. bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
ACE	Activator of <i>CUPI</i> Expression
ACN	Acetonitril
Abb.	Abbildung
ADE	Enzyme des Purinsynthesewegs
ADP	Adenosindiphosphat
Ag(I)	Silber
Al(III)	Aluminium
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
apoMT	Metallothionein ohne gebundene SM
<i>A. pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>A. tetracladia</i>	<i>Articulospora tetracladia</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>AtPCSI</i>	Phytochelatase Gen von <i>A. thaliana</i>
bzw.	beziehungsweise
C/ Cys	Cystein
ca.	circa
CD	Circular dichroism
Cd(II)	Cadmium
CdOH ⁺	Cadmium-hydroxid-Ion
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>C. lunata</i>	<i>Curvularia lunata</i>
Co(II)	Cobalt
Ctr1	Copper transporter 1
<i>CUPI</i>	Gen der MT-Synthese
°C	Grad Celsius
d	Tage
Da	Dalton
dest.	destilliert

DTNB	5,5`-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
EDTA-Na ₂	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
E	Glutamat
EEL	Electron Energy Loss
ESI-MSn	Electron Spray Ionisation Tandem Massenspektrometrie
ESI-MS/MS	Electron Spray Ionisation Tandem Massenspektrometrie
γ-EC	γ-Glutamylcystein (γ-Glu-Cys)
fx	Unterfamilie der Metallothioneine
G	Glycin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GSH	Glutathion (reduziert) (γ-Glu-Cys-Gly)
GSH1	γ-Glutamylcystein Synthetase
GSH2	Glutathion Synthetase
GSSG	Glutathion oxidiert
GTSH	Gesamtthiolgehalt
h	Stunde
H ⁺	Proton
HK	Hauptkultur
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid chromatography
HMT	heavy metal tolerance
HMW	high molecular weight
HNO ₃	Salpetersäure
ICP	induktiv-gekoppeltes Plasma
I ₅₀	50 %-ige Wachstumsinhibierung
K	Kontrolle
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
L	Liter
Lsg.	Lösung
LMW	low molecular weight

MA	Malz
MALDI-PSD	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Postsource Decay
MAP	Malz-Pepton-Medium
max.	maximal
min	Minuten
mL	Milliliter
mg	Milligramm
Mg(II)	Magnesium
<i>M. racemosus</i>	<i>Mucor racemosus</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
m/z	Massezahl
n	Nano
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
n. b.	nicht bestimmt
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
(NH ₄)HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
Ni(II)	Nickel
NiCl ₂	Nickelchlorid
nm	nanometer
n. n.	nicht nachweisbar
N	Normal
Pb(II)	Blei
PC	Phytochelatin ((γ-Glu-Cys) _n -Gly)
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
pers.	persönlich
<i>R. arrhizus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
RP	Reversed Phase
rpm	rotations per minute
<i>R. serpentina</i>	<i>Rauwolfia serpentina</i>
s.	siehe

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standardabweichung
SE	Relative Standardabweichung
sec	Sekunde
SM	Schwermetall
SMF	<u>S</u> uppressor of <u>M</u> itochondria <u>I</u> mport <u>F</u> unction
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Tab.	Tabelle
<i>TaPCSI</i>	PC-Synthase Gen von <i>Triticum aestivum</i>
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
TOF	Time Of Flight
t_R	Retentionszeit des HPLC Peaks (min)
U	Units
u.	und
u. a.	unter anderem
UAS	Upstream activating sequence
<i>V. cf. alboatrum</i>	<i>Verticillium cf. alboatrum</i>
<i>V. psalliotae</i>	<i>Verticillium psalliotae</i>
vergl.	vergleiche
VK	Vorkultur
Xaa	andere Aminosäure als Cys
Yaa	andere Aminosäure als Cys und Xaa
YCF1	Yeast Cadmium Factor
z. B.	zum Beispiel
Zn(II)	Zink
Zrt	Zink Transporter
μg	Mikrogramm

Chemikalienverzeichnis

Acetonitril	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Agar-Agar	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Ammoniumhydrogencarbonat	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Cd(II)-chlorid	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Cu(II)-chlorid	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Dihyronicotinamid- adeninucleotidphosphat	Fluka, Neu-Ulm (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm (D)
Glutathion	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
Glutathionreduktase aus Bäckerhefe (100 U mL ⁻¹)	Fluka, Neu-Ulm (D)
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm (D)
konzentrierte Salpetersäure (65 %, suprapur)	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Malzextrakt	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Natriumborhydrat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
Natriumdihydrogenphosphat	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Ni(II)-chlorid	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan (USA)
Trifluoressigsäure	Serva, Heidelberg (D)
Wasserstoffperoxid (30 %, suprapur)	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Zn(II)-chlorid	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
5,5`-Dithio-bis- (2-nitrobenzoesäure)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)

1 Einleitung

1.1 Haldensickerwässer des Mansfelder Landes

In der „Mansfeld-Eislebener Mulde“ Mitteldeutschlands (Abb. 1) wurden über 8 Jahrhunderte Kupferschiefererze gefördert, verhüttet und Rückstände (taubes Gestein, Schlacken, Theisenschlamm) auf Halde deponiert. In dieser Region wurden insgesamt 2,63 Millionen Tonnen Kupfer und 14.213 Tonnen Silber gewonnen (SCHRECK, 1997). Bei der Verhüttung fielen pro Tonne Kupferschiefer 720 kg schwermetallhaltige Schlacke, etwa 45 kg Kupfererz und 23,5 kg Flugstaub an (SCHRECK, 1997).

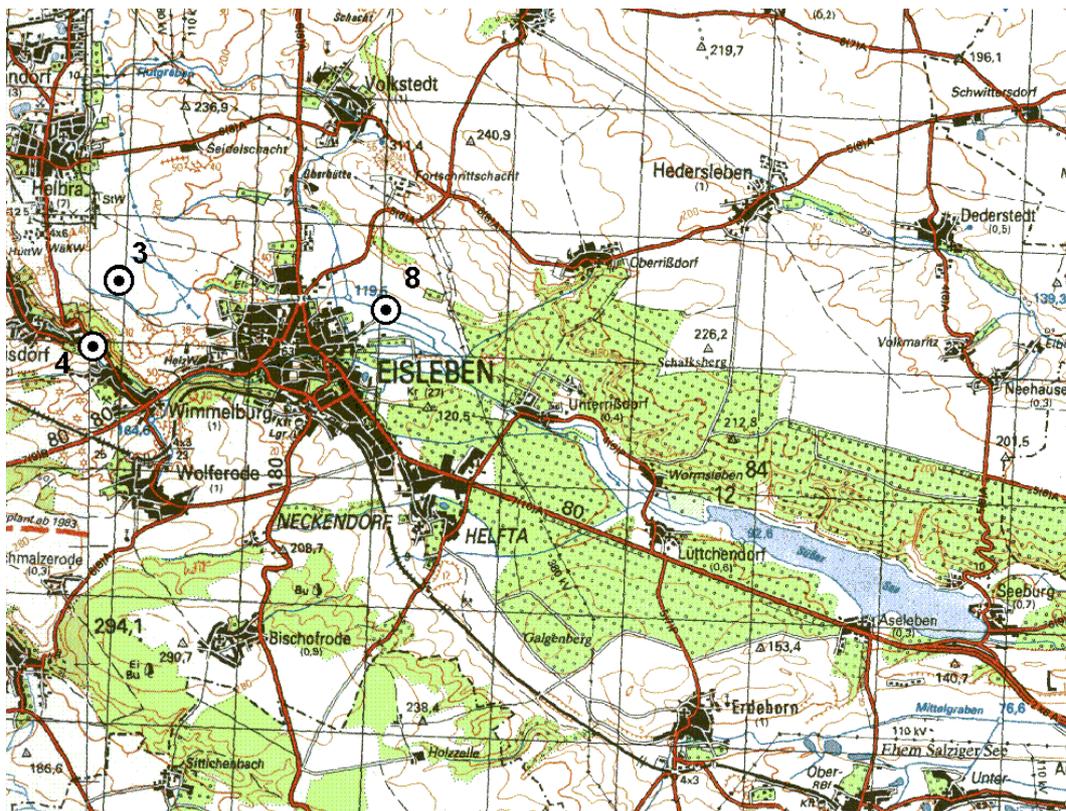


Abb. 1 Probenahmestandorte im Mansfelder Land. H3 = Sammelteich am Sanderschacht Helbra, H4 = Stadtborn Hergisdorf, H8 = Bach Glume-Lutherstadt Eisleben

Durch Auslaugung und Erosion der metallhaltigen Schlämme kommt es zur Freisetzung von Schwermetallen. Besonders hochbelastetes Sickerwasser mit Zn(II)-Gehalten von 2600 mg L^{-1} (39,8 mM) findet sich am Stadtborn Hergisdorf (H4) (s. Tab. 1). Bis 1996

lagerten dort etwa 78.000 Tonnen Theisenschlamm in Entwässerungsbecken auf der Schlackenhalde (SCHRECK, 1997). Durch Niederschläge kam es zur Auswaschung von Zn(II) und anderen Schwermetallen. Das Wasser von H4 weist eine Belastung von 2,8 mg Cd(II) L⁻¹ (0,024 mM) und 13,25 mg Cu(II) L⁻¹ (0,21 mM) auf (Tab. 1). Außerdem sind die Sulfat- und Nitrat-Gehalte (6750 mg L⁻¹ bzw. 76,4 mg L⁻¹) hoch (KRAUSS et al., 1998, 2001). Im Standort H4 kommt es zur Bildung des Sekundärminerals Glaukokerinit, das hohe Zn(II)-, Al(III)- und Sulfat-Gehalte aufweist und sich auf Steinen und pflanzlichen Materialien ablagert. Der Sammelteich am Sanderschacht (Standort H3) weist ebenfalls hohe Sulfat-

Gehalte (1360 mg L⁻¹) auf. Die Schwermetallbelastung des Wassers ist mit Gehalten von 0,13 mg Cd(II) L⁻¹ (0,001 mM), 0,27 mg Cu(II) L⁻¹ (0,004 mM) und 56 mg Zn(II) L⁻¹ (0,85 mM) geringer als in H4 (Tab. 1; KRAUSS et al., 1998, 2001). Im Wasser von Bach Glume (Standort H8) ist Cd(II) nicht nachweisbar und es liegt ein Zn(II)-Gehalt von 1 mg L⁻¹ vor (Tab.1). Der Grund enthält metallhaltige Schlämme, die einen besonders hohen Ni(II)-Gehalt, 720 mg L⁻¹ (12,26 mM), aufweisen.

Tab. 1 Schwermetallkonzentrationen (mg L⁻¹/ mM) von Haldensickerwässern differenter Standorte des Mansfelder Landes (KRAUSS et al., 2001). n. n.= nicht nachweisbar, n. b.= nicht bestimmt

Standort	Cd(II)		Cu(II)		Ni(II)		Pb(II)		Zn(II)	
	Wasser	Sediment	Wasser	Sediment	Wasser	Sediment	Wasser	Sediment	Wasser	Sediment
H3	0,13/ 0,001	63/ 0,56	0,27/ 0,004	10 900/ 172	0,09/ 0,002	76/ 1,29	0,8/ 0,004	49 000/ 236	56/ 0,85	25 960/ 397
H4	2,8/ 0,024	29/ 0,25	13,25/ 0,21	50 200/ 790	2,2/ 0,04	400/ 6,81	1,9/ 0,01	24 500/ 118	2600/ 39,8	16 660/ 255
H8	n. n./ n. n.	9/ 0,08	n. b./ n. b.	n. n./ n. n.	n. b./ n. b.	720/ 12,26	n. b./ n. b.	720/ 3,47	1/ 0,015	65,38/ 47,4

In diesen belasteten Haldensickerwässern wurde das Vorkommen von aquatischen Hyphomyceten untersucht. In den Standorten H3, H4 und H8 konnten bis zu 33 aquatische Hyphomyceten identifiziert und teilweise isoliert werden (KRAUSS, 1998, 2001; SRIDHAR et al., 2000). Neben den aquatischen Hyphomyceten kamen an den Standorten auch terrestrische Pilze vor (KRAUSS et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in den Standorten H3 und H4 zahlreiche schwermetalltolerante terrestrische Pilzisolat, z. B. *Phialophora* sp. und *Verticillium cf. alboatrum*, beides terrestrische Hyphomyceten, gewonnen.

Generell sorgt eine vielfältige Bakterien- und Pilzflora für den Abbau der organischen Substanz in Gewässern. Besonders aquatische Hyphomyceten spielen dabei eine wichtige Rolle (BÄRLOCHER und KENDRICK, 1974). Beim Abbau pflanzlicher Materialien in Gewässern werden zunächst die löslichen Bestandteile, wie Zucker und Aminosäuren

ausgelaugt („Leaching“) (SUBERKROPP und KLUG, 1981). Danach kommt es zur Besiedlung des pflanzlichen Materials durch Mikroorganismen, wobei in der ersten Phase die Pilze dominieren (SUBERKROPP und KLUG, 1976, 1981). Terrestrische Pilze, die die Phyllosphäre der seneszenten Blätter besiedeln, bleiben oft im aquatischen Milieu lebensfähig (BÄRLOCHER, 1992). Doch besonders in der kälteren Jahreszeit und in sauberen, sauerstoffreichen Flüssen haben sie nur einen geringen Einfluss auf den Blattabbau (BÄRLOCHER und KENDRICK, 1974; BÄRLOCHER und KENDRICK, 1981).

Aquatische Hyphomyceten benötigen zum Wachstum moderate Temperaturen und sporulieren nur unter Wasser. Außerdem sind ihre Konidien für das Anheften an Substrate in fließenden Gewässern spezifisch adaptiert (WEBSTER, 1981). Daher dominieren die aquatischen Hyphomyceten den Blattabbau in Gewässern (BÄRLOCHER, 1992). Die aquatischen Hyphomyceten stellen keine Gruppe eng miteinander verwandter Pilze dar, sondern sie repräsentieren Pilze, die sich morphologisch und physiologisch an das aquatische Milieu angepasst haben (DIX und WEBSTER, 1995).

Im Gegensatz zu den ebenfalls am Blattabbau beteiligten Makroinvertebraten besitzen aquatische Hyphomyceten Enzyme, die polymere Substanzen, wie Cellulose oder Lignin, zu niedermolekularen Polymeren abbauen können (SUBERKROPP und KLUG, 1981). Diese „konditionierten“ Blätter können von Makroinvertebraten wesentlich besser abgebaut werden. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Makroinvertebraten Blätter bevorzugen, die mit Pilzen besiedelt sind (BÄRLOCHER und KENDRICK, 1975). Jede Änderung der Pilzgemeinschaft kann die Inkorporation von Blattmaterial in die Nahrungskette beeinflussen, entweder durch Veränderung der Abbaurate oder der Nutzbarkeit für Makroinvertebraten. Eine derartige Änderung der Pilzdiversität und -aktivität kann z. B. durch Schwermetallbelastung hervorgerufen werden (BERMINGHAM, 1996; KRAUSS et al., 1998, 2001; SRIDHAR et al., 2000). Die Lebensfähigkeit der Makroinvertebraten kann durch die Verwertung von schwermetallhaltigen aquatischen Pilzen reduziert werden, was einen verringerten Blattabbau zur Folge haben kann (DUDDRIDGE und WAINWRIGHT, 1980; ABEL und BÄRLOCHER, 1988).

Den aquatischen Hyphomyceten wurde eine hohe Sensitivität gegenüber Umweltbelastungen zugeschrieben (WEBSTER, 1981; BERMINGHAM et al., 1998). So kam es im Vergleich zu einem unbelasteten Abschnitt eines Flusses zu einer 50 %-igen Reduktion der Artenvielfalt, nachdem metall- und sulfathaltige Abwässer eingeleitet worden waren

(BERMINGHAM et al. 1996). Eine Reduktion der Artenzahl in kontaminierten Gewässern konnten auch SRIDHAR et al. (2000) nachweisen. Von den schwermetallbelasteten Gewässern des Mansfelder Landes wies der am stärksten kontaminierte Standort (H4) die geringste Artenzahl an aquatischen Hyphomyceten auf (KRAUSS et al., 1998, 2001; SRIDHAR et al., 2000).

1.2 Extrazelluläre Komplexierung, Biosorption und Akkumulation von Schwermetallen

Bevor Pilze Metalle intrazellulär aufnehmen, kann das Metall extrazellulär präzipitiert und komplexiert werden oder eine Bindung des Metalls an die Pilzzellwand erfolgen (VOLESKY, 1990). Durch die Bildung von H₂S kann eine Komplexierung des Schwermetalls als Metallsulfid in- und außerhalb der Zellwand erfolgen (GADD, 1993). Beispielsweise kam es in *Saccharomyces cerevisiae* unter Cu(II)-Belastung zur Ablagerung von Kupfersulfid auf der Zellwand (LIN et al., 1993). In *Aureobasidium pullulans* wurde Pb(II) durch extrazelluläre polymere Substanzen gebunden (SUH et al., 1998, 1999) und *Verticillium psalliotae* bildete in Cu(II)-haltiger Oberflächenkultur unlösliche Kupferoxalate (MURPHY und LEVY, 1983).

Die Zellwand der Pilze besteht aus diversen Strukturelementen wie Chitin, Chitosan und Glukan. Diese Substanzen besitzen funktionelle Gruppen wie Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Phosphat- und Sulfhydryl-Gruppen, die Schwermetalle in einer metabolismus-unabhängigen Reaktion, die als **Biosorption** bezeichnet wird, binden können (VOLESKY, 1990). Die Zellwand kann eine Schutzfunktion ausüben, da sie als Barriere fungieren kann und die Aufnahme von toxischen Metallen kontrolliert (ONO et al., 1988). Die Biosorption erfolgt schnell und ist überwiegend temperatur-unabhängig (SINGLETON und TOBIN, 1996; HUANG et al., 1990). So war die Cd(II)-Biosorption durch *S. cerevisiae* innerhalb von 2 min abgeschlossen (HUANG et al., 1990). Außerdem ist der Prozess vom pH-Wert abhängig. Die Biosorption der Kationen nahm oft mit sinkendem pH-Wert ab, da die Protonen mit den Metallen um die Bindungsstellen konkurrieren. Die Zn(II)-Biosorption von *Rhizopus arrhizus* war bei einem pH-Wert von 7 maximal und nahm bis zu einem pH-Wert von 4 stark ab (ca. 70 %) (FOUREST und ROUX, 1992). Die Biosorption ist zudem reversibel; so desorbierten z. B. Salpetersäure oder Calciumchlorid die biosorbierten Schwermetalle von *Aspergillus niger* (KAPOOR und VIRARAGHAVAN, 1996).

Ein Einsatz der Biosorption von Schwermetallen an die pilzliche Zellwand ist in der Abwässerreinigung denkbar. So wurden durch *A. niger* 75 % des Zn(II) eines industriellen

Abwassers, welches mit 150 mM Zn(II) kontaminiert war, entfernt (AKTHAR und MOHAN, 1995). Nach 90stündiger Kultivierung von *Verticillium marquandii* in einem Stroh-Extrakt-Medium, welches metallhaltige Schlacke (0,07 mM Pb(II) und 15,3 mM Zn(II)) enthielt, waren lediglich 0,05 % des Pb(II) und 80 % des Zn(II) von dem Myzel aufgenommen. Die Fähigkeit von *V. marquandii*, unter einer hohen Zn(II)-Belastung zu wachsen und Zn(II) selektiv aufzunehmen, könnte eine Gewinnung von Zn(II) aus metallhaltigen Abfällen ermöglichen (SLABA und DLUGOŃSKI, 2000).

Die metabolismus-abhängige intrazelluläre Aufnahme von Metallionen (**Akkumulation**) ist langsamer als die Biosorption. Der Transport von monovalenten Kationen kann aufgrund der H⁺-ATPase Aktivität erfolgen, durch die ein Protonengradienten entlang der Plasmamembran aufgebaut wird (GADD, 1993). Der Transport von divalenten Ionen ist ebenfalls von H⁺-ATPase Transportern abhängig. In *S. cerevisiae* konnten die Zn(II)-Transporter Zrt1p und Zrt2p (H⁺-ATPasen), bei denen es sich um Zn(II)-Transporter mit einer hohen und niedrigen Zn(II)-Affinität handelt, nachgewiesen werden (ZHAO und EIDE, 1996a, b). Der Transport von Cu(II) erfolgt in *S. cerevisiae* durch SMF- und Ctr1p-Transporter (COHEN et al., 2000; DANCIS et al., 1994). Cd(II) übt, bis auf die Cd(II)-Carbon Anhydrase der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii*, keine biologische Funktion aus (LANE und MOREL, 2000). Daher ist es unwahrscheinlich, dass es Transporter gibt, die eine Spezifität für Cd(II) besitzen. Cd(II) konkurriert vielmehr mit essentiellen Metallen um deren Transportsystem (GADD und SAYER, 2000). So konnte ein Transport von Cd(II) über den SMF1-Transporter, ein Mn(II)-Transporter, in die Zelle von *S. cerevisiae* erfolgen (LIU et al., 1997).

1.3 Toxische Wirkung von Schwermetallen auf Pilze

Metalle sind am pilzlichen Wachstum, Metabolismus und der Zelldifferenzierung beteiligt. Essentielle Schwermetalle wie Cu(II) und Zn(II) sind Bestandteil vieler Enzyme. Die Superoxid Dismutase von *S. cerevisiae* enthält z. B. Cu(II) und Zn(II) (GRECO et al., 1990). In Abhängigkeit von ihrer Konzentration können essentielle Schwermetalle jedoch auch schädigende Wirkung zeigen. Nicht essentielle Schwermetalle, z. B. Cd(II) und Pb(II), wirken hingegen schon in geringen Dosen toxisch. Cu(II) kann durch die Bildung von Oxyradikalen den Organismus schädigen. So kam es in *S. cerevisiae* vermutlich durch die Bildung von O₂⁻ zu einer Wachstumshemmung unter einer Cu(II)-Belastung von 0,5 mM (GRECO et al., 1990). Die Toxizität von Schwermetallen ist hauptsächlich auf die Komplexbildung mit

Enzymen, insbesondere durch Reaktionen mit Sulfhydrylgruppen, zurückzuführen. Die Enzyme werden dadurch in ihrer Wirkung blockiert oder gehemmt (KÖHLER und VÖLSGEN, 1998). Beispielsweise wurde die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase von *Aspergillus parasiticus* kompetitiv durch Cd(II) oder Zn(II) gehemmt (NIEHAUS und DILTS, 1984).

Außerdem können nicht essentielle Schwermetalle an funktionelle Gruppen der Transportsysteme für essentielle Ionen binden und diese blockieren. So wurde in *Candida glabrata* die Zn(II)-Aufnahme kompetitiv durch Cd(II) gehemmt (FAILLA et al., 1976).

In *S. cerevisiae* kam es durch Cu(II) und Zn(II) zu einer Veränderung der Permeabilität der Plasmamembran und zu einem Efflux von K^+ -Ionen und Glutamat, sowie zu einer Wachstumshemmung (OHSUMI et al., 1988; WHITE und GADD, 1988).

Ebenso kann die Oberflächenladung der Zelle durch Schwermetalleinwirkung verändert werden. Während Zellen normalerweise negativ geladen sind, veränderte sich z. B. in *S. cerevisiae* unter Cd(II)-Belastung die Ladung der Zelloberfläche und es lagen positiv geladene Zellen vor (COLLINS und SOTZKY, 1992). Diese Änderung der Ladung kann physiologische Funktionen der Zelle oder Wechselwirkungen mit anderen Zellen beeinträchtigen.

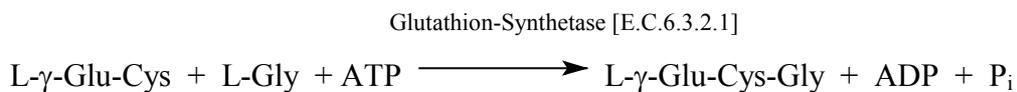
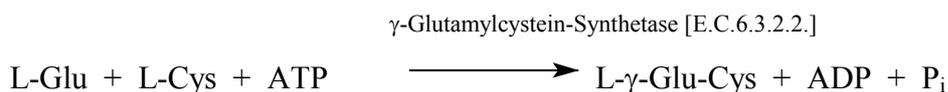
Der Toxizität der Schwermetalle kann aufgrund von biochemischen Eigenschaften und physiologischen und/oder genetischen Adaptionen der Pilze entgegengewirkt werden (GADD, 1993). Nach GADD (1993) ist ein Organismus schwermetalltolerant, wenn ein Wachstum trotz der Schwermetalltoxizität aufgrund der bereits bestehenden Eigenschaften möglich ist, z. B. durch den Besitz undurchlässiger, pigmentierter Zellwände oder extrazellulärer Polysaccharide, die durch Komplexbildung zur Detoxifikation der Schwermetalle beitragen. Dagegen spricht man von Schwermetallresistenz, wenn der Organismus in Anwesenheit von Schwermetallen die Fähigkeit ausbildet, zu überleben, z. B. durch die Synthese intrazellulärer schwermetallbindender Peptide oder Proteine, wie Glutathion, Metallothioneine oder Phytochelatine (GADD, 1993).

1.4 Bedeutung von thiolhaltigen Peptiden und Proteinen für die Schwermetalltoleranz von Pilzen

1.4.1 Glutathion

Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, GSH) kommt in vielen Organismen vor (MEISTER et al, 1988). Die charakteristischen strukturellen Merkmale von Glutathion sind die γ -Isopeptidbindung zwischen Glu und Cys und die für biochemische Funktionen bedeutsame Thiol-(SH)-Gruppe von Cys.

Glutathion ist kein primäres Genprodukt; es wird in zwei energieabhängigen Schritten in Gegenwart von Mg(II) synthetisiert (MEISTER, 1989):



In *S. cerevisiae* konnte eine transkriptionelle Regulation der GSH-Synthese aufgezeigt werden. Unter Cd(II)-Belastung stieg die Transkription von *GSH1* an (VIDO et al., 2001). *In vitro* konnte eine Feedback-Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase von *Schizosaccharomyces pombe* durch Glutathion und somit eine Regulation der Glutathionsynthese nachgewiesen werden (COBLENZ, 1995).

Ein Großteil der niedermolekularen Thiolverbindungen in Pilzen, in *S. cerevisiae* z. B. 95 %, ist Glutathion (ELSKENS et al., 1991; PENNICKX und ELSKENS, 1993). GSH kann viele wichtige Funktionen ausüben. Es dient z. B. als Schwefelspeicher. So wurde Schwefel in Form von GSH gespeichert, wenn *S. cerevisiae* Sulfat als Nährstoff zur Verfügung stand; unter Sulfatmangel fungierte GSH als Schwefelquelle (ELSKENS et al., 1991). Außerdem können Xenobiotika durch GSH detoxifiziert werden. Die GSH S-Transferase katalysiert die Konjugation von organischen Komponenten mit GSH, die in *S. cerevisiae* über den GSH-S-Konjugat-Transporter (YCF1) in die Vakuole transportiert werden können (LI et al., 1996). GSH ist zudem Cofaktor in Enzymen wie der Glutathion-abhängigen Formaldehyd-Dehydrogenase in *S. cerevisiae* (WEHNER et al., 1993)

GSH kann die Zelle vor reaktiven Sauerstoffintermediaten (oxidativer Stress) schützen, indem die Sulfhydrylgruppen des GSHs mit Radikalen reagieren. Dabei entstehen Glutathionylradikale, die GSSG bilden können. In der Hefe *Hansenula mrakii* wurde unter oxidativem Stress, wie der Lipid-Hydroperoxid Bildung, eine membran-gebundene GSH-Peroxidase induziert (INOUE et al., 1995). Die GSH-Peroxidase katalysierte die Reduktion von Hydroperoxid, wobei GSH der Elektronendonator war und als Oxidationsprodukt GSSG entstand. GSSG kann jedoch auch durch nicht-enzymatische Reaktionen mit Radikalen entstehen (MEISTER, 1988). Das Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG wird durch die GSSG-Reduktase aufrecht erhalten (PENNICKX und ELSKENS, 1993). Das Verhältnis zwischen GSH und GSSG wird als GSH-Status der Zelle bezeichnet. Unter Nicht-Stress-Bedingungen lag in *Penicillium chrysogenum* ein GSH/GSSG-Verhältnis von 13 (= 93 % reduziertes Glutathion) vor (EMRI et al., 1997). Unter oxidativem Stress (0,7 M H₂O₂) nahm der Gehalt an GSSG in *P. chrysogenum* zu und das GSH/GSSG-Verhältnis sank auf 4 ab (EMRI et al., 1997). In *Mucor racemosus* wurde in Cd(II)-haltiger Kultur hingegen nur 1/10 des GSSG-Gehaltes der Kontrolle nachgewiesen (MIERSCH et al., 2001). Cu(II)-Exposition hatte in der Makroalge *Enteromorpha prolifera* eine GSSG-Akkumulation zur Folge (RIJSTENBIL et al., 1998).

Schwermetalle können durch die Thiolgruppen des GSH chelatiert werden (DIAZ-CRUZ et al., 1997; RABENSTEIN, 1989). In der Hefe *C. glabrata* konnte erstmals eine *in vivo* Bindung von Cd(II) durch GSH nachgewiesen werden (BARBAS et al., 1992). Zu Beginn der Kultivierung von *C. glabrata* lag das Cd(II) u. a. in Form von Cd(II)-GSH-Komplexen vor und diesen Komplexen wurde eine Rolle in der Cd(II)-Detoxifikation zugesprochen. Außerdem wurden in *C. glabrata* unter Cd(II)-Belastung Cd(II)S-Komplexe gebildet, die von GSH umgeben waren (DAMERON et al., 1989). Die Bedeutung von GSH bei der Bildung dieser Kristallite und ihre Beteiligung in der Cd(II)-Detoxifikation konnte durch GSH-defiziente Mutanten gezeigt werden. Diese Mutanten hatten die Fähigkeit zur Bildung der Cd(II)S-Kristallite verloren und waren gegenüber Cd(II) sensitiv (KISTLER et al., 1986 in PENNINCKX, 2000). In *S. cerevisiae* wird der Bildung von Bis(glutathionato)cadmium eine wichtige Funktion in der Cd(II)-Detoxifikation zugeschrieben (LI et al., 1997, s. auch Kap. 1.4.4).

GSH steht außerdem als Precursor der Phytochelatine, die u. a. in *C. glabrata*, *S. pombe*, *M. racemosus* und *Neurospora crassa* zur Schwermetallchelatierung beitragen, in direkter Beziehung zur Schwermetalldetoxifizierung (KONDO et al., 1984; HAYASHI et al., 1991;

KNEER et al., 1992; MIERSCH et al., 2001) (s. Kap. 1.4.3). So zeigten GSH-defiziente Mutanten von *S. pombe* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cd(II), da eine Phytochelatinsynthese nicht mehr möglich war (COBLENZ und WOLF, 1994).

1.4.2 Metallothioneine

Metallothioneine (MTs) sind eine Gruppe von cystein-reichen Polypeptiden, die Thiolgruppen für die Chelatierung von Schwermetallen enthalten (RAUSER, 1999; BINZ und KÄGI, 1999). Zu den Metallothioneinen gehören Proteine, die einige Eigenschaften des Metallothioneins der Pferdeniere aufweisen. Dies sind z. B. ein niedriges Molekulargewicht, hoher Metallgehalt, geringer Gehalt an aromatischen Aminosäuren, sowie ein hoher Cysteingehalt, wobei die Cysteine in einem charakteristischen Cys-Xaa-Cys- bzw. Cys-Xaa-Yaa-Cys-Muster angeordnet sind (KOJIMA et al., 1999). Metallothioneine sind u. a. an der Metallhomöostase (als Lagerungs- oder Transportform) beteiligt (LERCH, 1980). Außerdem können sie Schwermetalle komplexieren und somit detoxifizieren (DAMERON und HARRISON, 1998).

Lange Zeit unterteilte man die Metallothioneine in 3 Klassen: Klasse I umfasste alle MTs, deren Cys-Position dem der Säugerform entsprach. MTs der Klasse II wiesen eine davon abweichende Cys-Anordnung auf und zur Klasse III gehörten die Phytochelatine (RAUSER, 1999).

BINZ und KÄGI (1999) führten eine neue Klassifizierung der Metallothioneine ein, die die Sequenzhomologie und die phylogenetische Verwandtschaft berücksichtigt. Dieses System unterteilt die MTs in Familien mit evolutionär verwandten Sequenzen, die wiederum aus Unterfamilien (fx) und Untergruppen bestehen. Nach dieser Einteilung gehören die pilzlichen MTs zu den Familien 8-13 und die Phytochelatine zu der MT Familie 99. Das Vorkommen der MTs und PCs in Pilzen ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2 Vorkommen von Metallothionein und Phytochelatin in Pilzen. * nur Gensequenz bekannt

Art	MT	Induktor	PC	Induktor
<i>Agaricus bisporus</i>	+	Cu(II)		
<i>Apergillus niger</i>	+	Cu(II)		
<i>Beauveria bassiana</i>	+	Cu(II), Cd(II)		
<i>Candida glabrata</i>	+	Cu(II)	+	Cd(II)
<i>Candida albicans</i>	+	Cu(II)		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	Cu(II), Cd(II)		
<i>Neurospora crassa</i>	+	Cu(II)	+	Cd(II)
<i>Pichia farinosa</i>	+	Cd(II)		
<i>Podospora anserina</i>	+	*		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	Cu(II)		
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	+	Cd(II)		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	Cu(II)	+	Cd(II), Cu(II), Zn(II)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N301	+	Cu(II), Cd(II)		
<i>Mucor racemosus</i>			+	Cd(II)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			+	Cd(II), Cu(II), Zn(II)
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>			+	Cd(II)
<i>Amylosterum chailletii</i>			+	Cd(II)
<i>Coleosporium tussilaginis</i>			+	Cd(II)
<i>Platyglora peniophorae</i>			+	Cd(II)
<i>Rhodospordium sp.</i>			+	Cd(II)
<i>Sporobolomyces holsaticus</i>			+	Cd(II)
<i>Sporobolomyces roseus</i>			+	Cd(II)
<i>Sarcoscypha austriaca</i>			+	Cd(II)
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>			+	Cd(II)
<i>Schizosaccharomyces malidevorans</i>			+	Cd(II)
<i>Schizosaccharomyces versatilis</i>			+	Cd(II)

In Pilzen wurde Metallothionein erstmals in *N. crassa* unter Cu(II)-Belastung nachgewiesen (LERCH, 1980). Das MT besteht aus 25 Aminosäuren, enthält 7 Cysteine, die in einem Cys-Xaa-Cys-Muster angeordnet sind, kann 6 Cu(I)-Atome binden und wird der Familie 8 (Fungi-I MTs) zugeordnet. In *N. crassa* nimmt es eine multifunktionelle Rolle ein. Es speichert Cu(I)-Ionen und transportiert sie zu kupferhaltigen Enzymen, außerdem wird Cu(I) durch MTs detoxifiziert (LERCH, 1980). Aufgrund der Stabilität des Cu(I)-MT-Komplexes während der Kultivierung von *N. crassa* wird dem MT eine wichtige Rolle in der Homöostase von Cu(I) zugesprochen (MÜNGER et al., 1987). *In vitro* war nicht nur die Bindung von 6 Cu(I), sondern auch von 3 Cd(II), 3 Hg(II) oder 3 Zn(II) durch das MT von *N. crassa* möglich (BELTRAMINI et al., 1984). Die Bindung der ersten 2 divalenten Metallionen erfolgte durch eine Metall-Thiolat Koordination mit einer tetrahedralen Geometrie. Das 3. Metallion wurde vermutlich durch andere Liganden gebunden, da nicht genügend Thiolgruppen vorhanden waren.

Eine Induktion der MT-Synthese erfolgt in Pilzen, wie *Agarius bisporus* oder *C. glabrata*, nur durch Cu(I) oder Ag(I) (GOETGHEBEUR et al., 1995; MÜNGER und LERCH, 1985; MEHRA et al., 1989). Eine Ausnahme bildet ein Cd(II)-resistenter Stamm 301N von *S. cerevisiae*, sowie *Colletotrichum gloeosporioides* und *Beauveria bassiana*, deren MT-

Synthese nicht nur durch Cu(II), sondern auch durch Cd(II) induziert wurde (s. Tab. 2) (INOUE et al., 1989, 1991; TOHOYAMA et al., 1992; HWANG und KOLATTUKUDY, 1995; KAMEO et al., 2000).

Die Expression des Metallothionein-Gens *CUP1* wird in *S. cerevisiae* durch ACE1 reguliert (PEREGO und HOWELL, 1997). ACE1 besteht aus 225 Aminosäuren, wobei der N-terminale Rest basisch und cysteinreich ist. Von den 12 Cysteinen sind 10 im Cys-Xaa-Cys- bzw. Cys-Xaa-Yaa-Cys-Muster angeordnet; 6 bis 7 Cu(I)-Ionen können durch die N-terminale Domäne des ACE1 gebunden werden (FURST et al., 1988 in MACREADIE et al., 1994). Die C-terminale Domäne enthält eine Häufung saurer Aminosäuren und ist funktionell eine Transkriptionsaktivierungsdomäne. Die Aktivität der DNA-bindenden Domäne ist von der Cu(I)- oder Ag(I)-Konzentration abhängig, da diese Ionen an der Faltung der Domänen beteiligt sind (WELCH et al., 1989). Das aktivierte ACE1-Cu(I) Protein bindet an das UAS vor dem Promotor von *CUP1* und induziert die Transkription. Cu(II)-resistente Stämme von *S. cerevisiae* enthalten typischerweise 11-15 Kopien von *CUP1*, Cu(II)-sensitive Stämme hingegen nur eine Kopie (JEYAPRAKAH et al., 1991).

Das Cd(II)-MT des Cd(II)-resistenten Stammes N301 von *S. cerevisiae* besitzt vermutlich ebenfalls *CUP1* als Strukturgen. Die Induktion durch Cd(II) könnte eventuell in einer Mutation in *ACE1*, die eine Bindung von Cu(I) oder Cd(II) ermöglicht, begründet sein oder es liegt ein neuer Induktionsmechanismus vor (TOHOYAMA et al., 1992).

1.4.3 Phytochelatine (MT Familie 99)

Neben der Bildung von thiolhaltigen Proteinen kann es in Pilzen unter Schwermetallexposition zur Bildung thiolhaltiger Peptide kommen. Die ersten Cd(II)-induzierten thiolhaltigen Peptide wurden in der Hefe *S. pombe* (KONDO et al., 1983) und in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* (GRILL et al., 1985) nachgewiesen. Es ist bisher keine endgültige Nomenklatur zur Bezeichnung dieser Peptide vorhanden; KONDO et al. (1983) nennen diese thiolhaltigen Peptide Cadystine; GRILL et al. (1985) sprechen hingegen von Phytochelatinen. In den folgenden Ausführungen wird die Bezeichnung Phytochelatine verwendet.

Phytochelatine bestehen aus den Aminosäuren Glu, Cys und Gly, setzen sich aus 2 bis 11 γ -Glutamylcysteinyl-Einheiten zusammen und bilden folgende Struktur:

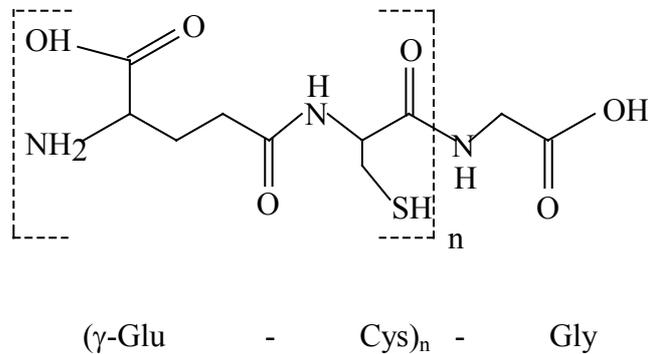


Abb. 2 Struktur der Phytochelatine, n = 2-11.

Neben *S. pombe* wurde u. a. in den Hefen *C. glabrata*, *Schizosaccharomyces octosporus* und *S. cerevisiae*, sowie in den filamentösen Pilzen *N. crassa* und *M. racemosus* die Bildung von Phytochelatinen nach Cd(II)-Belastung nachgewiesen (MEHRA et al., 1988; KNEER et al., 1992; INOUHE et al., 1996; MIERSCH et al., 2001; s. Kap. 1.4.2, Tab. 2).

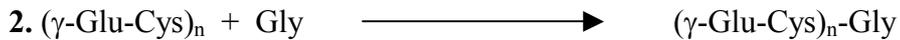
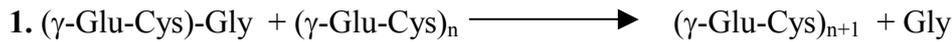
Außer in *R. serpentina* konnten Phytochelatine auch in zahlreichen anderen Pflanzen wie in *Arabidopsis thaliana* und *Silene cucubalus* unter Schwermetallbelastung nachgewiesen werden (GRILL et al., 1989; CLEMENS et al., 1999).

In *S. pombe* gibt es zwei Phytochelatin-Synthesewege (HAYASHI et al., 1991).

1. Die γ -Glu-Cys-Dipeptidyl-Transpeptidase (Phytochelatin-Synthase) [E.C.2.3.2.15] katalysiert, wie bereits von GRILL et al. (1989) in der Pflanze *S. cucubalus* beschrieben, die Polymerisierung von GSH oder die Kettenverlängerung höhermolekularer Phytochelatine:



2. Zunächst erfolgt eine Polymerisation von γ -Glu-Cys und anschließend wird Glycin durch die GSH-Synthetase addiert (HAYASHI et al., 1991; AL-LAHAM et al., 1999). Die Synthese von Phytochelatinen durch die GSH-Synthetase scheint in *S. pombe* jedoch von geringer physiologischer Bedeutung zu sein, da nach Mutationen im Gen der Phytochelatin-Synthase keine entsprechende Phytochelatin-Produktion mehr nachweisbar war (HA et al., 1999).



Zehn Jahre nach der Isolierung der Phytochelatin-Synthase gelang die Identifizierung des Phytochelatin-Synthase-Gens (*PCS1*) in *A. thaliana* und *S. pombe* (CLEMENS et al., 1999; HA et al., 1999; VATAMANUIK, 1999). Die Expression von *AtPCS1* (PC-Synthase Gen von *A. thaliana*) und *TaPCS1* (PC-Synthase Gen von *Triticum aestivum*) erfolgte konstitutiv und *TaPCS1* zeigte eine Cd(II)-induzierte Erhöhung der *PCS* mRNA (CLEMENS et al., 1999). Inwieweit es in *S. pombe* zu einer konstitutiven Expression von *SpPCS* und zu einer Steigerung der Transkription unter Cd(II)-Belastung kommt, wurde bislang nicht untersucht. Eine konstitutive Bildung der Phytochelatin-Synthase wurde in *S. pombe* von HAYASHI et al. (1991) nachgewiesen, da die PC-Synthase unter unbelasteten Kulturbedingungen vorlag. Die Regulation der PC-Synthase konnte in *S. cerevisiae* durch die Synthese von GSH erfolgen, da es unter Cd(II)-Belastung zu einer erhöhten Transkription von *GSH1* kam (VIDO et al., 2001).

Der genaue Induktionsmechanismus der PC-Synthaseaktivität ist bislang nicht bekannt. Beispielsweise erfolgte in *S. pombe* eine Induktion der Phytochelatin-Synthase durch Ag(I), Cd(II), Cu(II), Pb(II) und Zn(II) und in *S. cerevisiae* durch Cu(II) und Zn(II) (GRILL, 1986; KNEER und ZENK, 1992). Eine Möglichkeit für die Aktivierung der PC-Synthase wäre eine Wechselwirkung der Metalle mit der katalytischen Domäne, die Cysteine und Histidine enthält (HA et al., 1999). VATAMANIUK et al. (2000) zeigten, dass die Phytochelatin-Synthase von *A. thaliana* keine freien Schwermetallionen, sondern Cd(II)-(GS)₂ oder GSH-Derivate mit blockierten Thiolgruppen wie S-Methylglutathion für die Aktivität benötigt. Die *in vitro*-Synthese von Phytochelatinen in *S. pombe* konnte hingegen ohne Cd(II) bzw. Schwermetalle erfolgen, der Regulationsmechanismus dieser PC-Synthase ist bislang unbekannt (HAYASHI et al., 1991).

Phytochelatine binden Cd(II), Cu(II) und Zn(II) durch die Thiolgruppen des Cysteins. Cd(II)-PC-Komplexe, beispielsweise in *S. pombe* nachgewiesen, werden als LMW-Komplexe bezeichnet (HAYASHI et al., 1988). Die Bedeutung der PC-Synthase in der Cd(II)-Detoxifikation wurde durch eine Mutante von *S. pombe*, die keine PCs synthetisieren konnte,

gezeigt, da ein Wachstum unter Cd(II)-Belastung nicht möglich war (MUTOH und HAYASHI, 1988).

In *S. pombe* werden die Cd(II)-PC-Komplexe in die Vakuole transportiert, wo unter Einlagerung von Sulfid HMW-Komplexe gebildet werden (ORTIZ et al., 1995; s. Kap. 1.4.4).

1.4.4 Kompartimentierung von Cd(II)

Neben der Komplexierung von Cd(II) durch Phytochelatine und Metallothioneine kann eine Kompartimentierung des Cd(II) in der Vakuole für die Cd(II)-Detoxifikation von Bedeutung sein. In *S. pombe* erfolgt ein Transport von Cd(II)-PC (LMW) über HMT1, einem ABC-Transporter, in die Vakuole (ORTIZ et al., 1992; ORTIZ et al., 1995). Die für die Cd(II)-Detoxifikation wichtige Funktion von HMT1, die Cd(II)-Kompartimentierung in der Vakuole, konnte durch eine Mutante von *S. pombe*, die eine Mutation in *Hmt1* aufwies, gezeigt werden. Trotz der PC-Synthese war diese Mutante sensitiv gegenüber Cd(II) (ORTIZ et al., 1995). In einem Modell für *S. pombe* von OW (1993) wird eine Bildung von HMW (Cd(II)S-PC) in der Vakuole angenommen, die aus LMW und Sulfid gebildet werden. Als Sulfid-Quelle könnte Cysteinsulfinat dienen. Durch Einlagerung von Sulfid wird die Metallbindungskapazität und Komplexstabilität der Cd(II)-PC-Komplexe erhöht (REESE und WINGE, 1988). In *S. pombe* gelang Cd(II) vermutlich auch über einer Cd²⁺/H⁺-Antiporter in die Vakuole (ORTIZ et al., 1995). Die genaue Funktion dieses Transporters in der Cd(II)-Toleranz ist unklar, eventuell wird er zu Beginn der intrazellulären Cd(II)-Aufnahme, wenn der PC-Gehalt noch gering ist, benötigt (ORTIZ et al., 1995).

In *C. glabrata* kam es bereits im Cytoplasma zur Bildung von Cd(II)S-PC-Komplexen, die im Verlauf der Kultivierung in der Vakuole akkumulieren (MEHRA et al., 1994). Es ist bislang nicht bekannt, ob der Transport in die Vakuole über HMT1 erfolgt.

In vitro wurde ein Transport von Cd(II)-(GS)₂ durch YCF1, einem ABC-Transporter, in die Vakuole von *S. cerevisiae* nachgewiesen (LI et al., 1997). RAMSAY und GADD (1997) konnten in *S. cerevisiae* keine Beteiligung der Vakuole an der Cd(II)-Detoxifikation nachweisen; vakuolen-defiziente Mutanten wiesen keine erhöhte Sensitivität gegenüber Cd(II) auf.

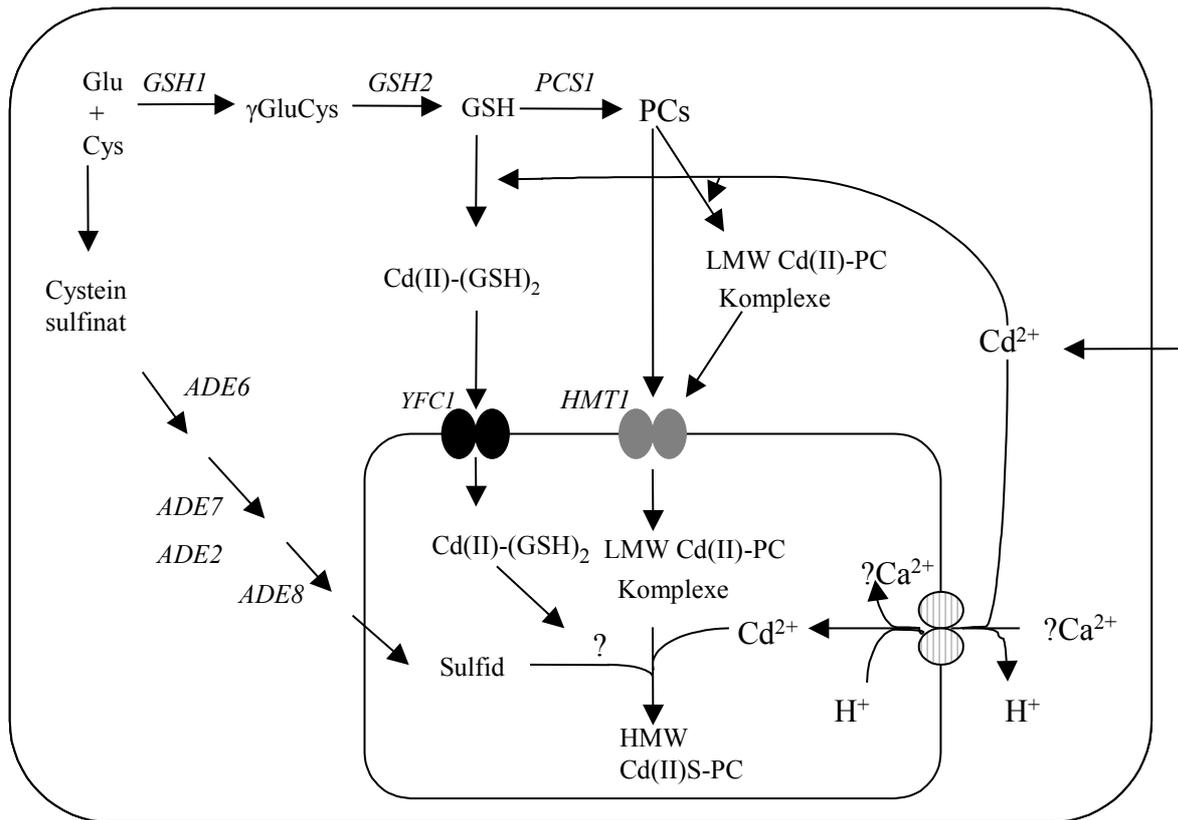


Abb. 3 Cd(II)-Detoxifikation in Pilzen abgewandelt nach COBETT (2000). Die Abbildung zeigt unterschiedliche Funktionen von verschiedenen Pilzen. *ADE2*: Adenylosuccinat Synthetase Gen, *ADE6*: Aminoimidazolribonucleotid Carboxylase Gen, *ADE7*: Succinoaminoimidazol Carboxamid Ribonucleotid Synthetase Gen, *ADE8*: Adenylosuccinat Lyase Gen; *GSH1*: γ -Glutamylcystein Synthetase Gen von *S. pombe*; *GSH2*: Glutathion Synthetase Gen von *S. pombe*; *PCS1*: Phytochelatin Synthase Gen von *S. pombe*; *YFC1*: Yeast Cadmium Factor, Gen für Cd(II)-(GSH)₂-ABC-Transporter von *S. cerevisiae*; *HMT1*: Heavy Metal Tolerance, Gen für Cd(II)-PC-ABC-Transporter von *S. pombe*.

1.5 Problemstellung und Ziel der Arbeit

In belasteten Haldensickerwässern des Mansfelder Landes konnten nicht nur aquatische Hyphomyceten, sondern auch terrestrische Pilze isoliert werden. Ein Wachstum unter Schwermetallstress kann durch „Avoidance“, geringe Biosorption oder Akkumulation von Schwermetallen, aber auch durch die intrazelluläre Komplexierung an schwermetallbindende Peptide oder Proteine ermöglicht werden. Daher war es Ziel dieser Studie die Schwermetalltoleranz, Biosorption und Akkumulation von Schwermetallen und die Schwermetalldetoxifikation von einigen dieser Pilzisolat zu untersuchen.

In Oberflächenkultur wurde die Toleranz von *Heliscus lugdunensis*-Stämmen, isoliert aus einem belasteten und einem gering belasteten Standort, sowie terrestrischen Pilzen aus belasteten Standorten bestimmt und miteinander verglichen.

Des weiteren wurde von ausgewählten Isolaten die Hemmung des Wachstums in schwermetallhaltiger Flüssigkultur (Cd(II), Cu(II) und Zn(II)) untersucht, um genauere Aussagen über die Auswirkung von Schwermetallen auf die Biomassenbildung machen zu können.

Die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch den aquatischen Hyphomyceten *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und den terrestrischen Hyphomyceten *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 wurden bestimmt. Die Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob zwischen Schwermetalltoleranz und der Biosorption bzw. Akkumulation ein möglicher Zusammenhang besteht.

In der Literatur wurde in zahlreichen Pilzen eine Schwermetalldetoxifikation durch thiolhaltige Peptide und Proteine nachgewiesen (KNEER et al., 1992). So können Phytochelatine und Metallothioneine Cd(II) bzw. Cu(II) komplexieren und detoxifizieren. Daher wurde in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 sowie in *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 die Bildung von schwermetallbindender Peptide und Proteine untersucht. Es sollte geprüft werden, inwiefern sich eventuell beobachtbare stammes- und gattungsspezifische Unterschiede im Gehalt an thiolhaltigen Peptiden und Proteinen mit der zuvor festgestellten Schwermetalltoleranz korrelieren lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Isolation von Pilzen aquatischer Standorte

Ausbringung von Blattexplantaten

In Netze eingenähte Erlenblätter wurden 4-5 Wochen in Haldensickerwässern ausgebracht. Die im Gewässer enthaltenen Mikroorganismen, z. B. aquatische Hyphomyceten, bilden einen Biofilm auf den Erlenblättern und besiedeln diese. Nach erfolgter Exposition und Waschung der Blätter wurden diese in sterilem destillierten Wasser 2 Tage bei 20 °C zwecks Sporulation belüftet (KRAUSS et al., 1998, 2001). Zur Bildung von Pilzkolonie wurden einzelne Sporen unter dem Stereomikroskop „gepickt“ und auf MA-Platten (Kap. 2.3) plaziert.

Ausplattierung von Standortwasser

Standortwasser wurde auf Cd(II)-haltigem Medium (Kap. 2.3) ausplattiert. Nach 3wöchiger Kultivierung bei Raumtemperatur wurden einzelne Pilzkolonien isoliert.

2.2 Herkunft der Pilzstämmen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme wurden aus Haldensickerwässern (H3, H4 und H8) des Mansfelder Landes isoliert (KRAUSS et al., 1998, 2001).

Heliscus lugdunensis (aquatischer Hyphomycet)

Stamm	Isolationsort
H4/2/4	Stadtborn Hergisdorf (H4) (KRAUSS et al., 1998, 2001)
H8/2/1	Bach Glume- Lutherstadt Eisleben (H8) (KRAUSS et al., 1998, 2001)

Aquatische Hyphomyceten sind eine Gruppe von Mitosporic fungi (ehemals *Fungi imperfecti*, Deuteromycotina), die unter Wasser sporulieren. Durch mitotische Zellteilung werden asexuelle Konidien (anamorphe Stadien) gebildet. Es wurden von ca. 10 % der aquatischen Hyphomyceten Teleomorphe (perfekte-sexuelle Stadien) nachgewiesen. Diese werden je nach Art der Sporenbildung den Ascomycotina oder Basidiomycotina zugeordnet (WEBSTER, 1959; WEBSTER, 1992). *H. lugdunensis* ist die anamorphe Form von *Nectria*

lugdunensis. Beide Formen werden der Ordnung Hypocreales (Unterreich Ascomycotina, Familie Hypocreaceae) zugeordnet (MARVANOVA, pers. Mitteilung). Teleomorphe Arten entwickeln sich häufig auf feuchten Ästen. Die Sporen der perfekten Stadien der aquatischen Hyphomyceten, die Askosporen oder Basidiosporen, können in die Luft entlassen werden und so eine Rolle bei der Verbreitung dieser Pilze in andere entfernte Gewässer spielen (WEBSTER, 1981).

Phialophora sp. (terrestrischer Hyphomycet)

Stamm	Isolationsort
H3/P/5	Sammelteich am Sanderschacht, Helbra (H3)
H3/P/7	Sammelteich am Sanderschacht, Helbra (H3)
H4/P/12	Stadtborn Hergisdorf (H4)

Die Isolate H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12 wurden im Rahmen dieser Arbeit aus den aquatischen Standorten H3 und H4 nach Ausplattierung von Wasserproben auf Cd(II)-haltigem Agarmedium gewonnen (Kap. 2.1). Die Stämme wurden als *Phialophora* sp., ein terrestrischer Hyphomycet, der zu den *Fungi imperfecti* (Deuteromycotina) gehört identifiziert (MARVANOVA, pers. Mitteilung; SCHAUMANN, pers. Mitteilung). Eine Sporulation von *Phialophora* sp. unter Wasser ist möglich (MARVANOVA, pers. Mitteilung). Die Fruktifikation erfolgt asexuell (anamorph); durch Zellsprossung entstehen blastische Konidien (Blastokonidien, Phialokonidien) (MÜLLER und LOEFFLER, 1992). Als teleomorphe Formen sind *Pyrenopeziza* und *Ascocoryne* bekannt.

Verticillium cf. alboatrum (terrestrischer Hyphomycet)

Stamm	Isolationsort
H4/P/15	Stadtborn Hergisdorf (H4)

H4/P/15 wurde im Rahmen dieser Arbeit aus dem aquatischen Standort H4 nach Ausplattierung einer Wasserprobe auf Cd(II)-haltigem Agarmedium gewonnen (Kap. 2.1). Der Stamm wurde als *Verticillium cf. alboatrum*, ein terrestrischer Hyphomycet, der zu den *Fungi imperfecti* (Deuteromycotina) zählt und zu der Formfamilie Moniliaceae gestellt wird (MÜLLER und LOEFFLER, 1992), identifiziert (MARVANOVA, pers. Mitteilung). Eine Sporulation unter Wasser ist möglich (MARVANOVA, pers. Mitteilung).

Es erfolgt eine anamorphe Fruktifikation; blastische Konidien (Blastokonidien) werden durch Zellsprossung gebildet.

2.3 Medien

Alle aufgeführten Medien wurden 20 Min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Nährböden wurden, soweit nicht anders angegeben, durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Die sterilfiltrierten Schwermetall-Lösungen wurden nach dem Autoklavieren der Medien zugegeben.

Malz-Medium (MA-Medium) (nach ATLAS, 1993)

1 % Malzextrakt
dest. Wasser

Malz-Pepton-Medium (MAP-Medium)

0,5 % Malzextrakt
0,1 % Pepton
dest. Wasser

Schwermetall-Mix-Malz-Medium (SM-Mix-MA-Medium)

1 % Malzextrakt
1 mM ZnCl₂
0,01 mM PbCl₂
0,12 mM CuCl₂
0,025 mM CdCl₂
dest. Wasser

Cd(II)-haltiges Isolationsmedium

1 % Malzextrakt
10 bzw. 5 mM CdCl₂
3 % Agar
dest. Wasser

2.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte in Oberflächenkultur im Dunkeln und bei 20 °C; die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 wuchsen auf Malz-Medium, der *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15, sowie die *Phialophora* sp.-Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12 auf SM-Mix-MA-Medium.

2.5 Bestimmung des radialen Wachstums in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur

Zur Untersuchung der Schwermetalltoleranz von Pilzisolaten aus Haldensickerwässern des Mansfelder Landes auf Oberflächenkultur wurden Cd(II), Cu(II) und Zn(II) als Chloridsalze verwendet. Die Stammlösungen der Schwermetalle wurden in dest. H₂O angesetzt und anschließend sterilfiltriert. Die Zugabe der Schwermetalle erfolgte nach dem Autoklavieren. Tabelle 3 zeigt die eingesetzten Schwermetallkonzentrationen.

Tab. 3 Schwermetallkonzentration der Toleranzversuche in Oberflächenkultur für die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, *Phialophora* sp. Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15.

<i>H. lugdunensis</i>		<i>V. cf. alboatrum/ Phialophora</i> sp.
Cd(II)	Cu(II)/Zn(II)	
[mM]		Cd(II)/Cu(II)/Zn(II)
		[mM]
0,01	0,01	0,01
0,1	0,1	0,1
0,2	-	1
0,3	-	10
0,4	-	
0,5	-	
1	1	

Es wurden zwei *Heliscus lugdunensis*-Stämme, die zum einen in einem hoch kontaminierten Standort (H4: H4/2/4) und zum anderen aus einem weniger belasteten Standort (H8: H8/2/1, s. Tab. 1) isoliert worden waren, hinsichtlich ihrer Schwermetalltoleranz untersucht. Es sollten eventuelle standortabhängige Unterschiede in der Toleranz aufgezeigt werden. Da neben aquatischen Hyphomyceten zahlreiche terrestrische Pilzisolat aus den Oberflächenwässern des Mansfelder Landes gewonnen werden konnten, wurden diese in die Toleranzstudien mit einbezogen.

In Vorversuchen zeigten die *Phialophora*-Stämme und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 im Vergleich zu den aquatischen Hyphomyceten eine hohe Toleranz, daher wurden unterschiedliche Schwermetallkonzentrationen gewählt.

Zur Beimpfung der Testplatten dienten Agarstücke von 7 mm Durchmesser, die mit einem abgeflamten Korkbohrer aus einer Vorkultur ausgestochen wurden. Die MA-Medium Vorkultur der *H. lugdunensis*-Stämme war 14 Tage, die SM-MIX-MA-Medium Vorkultur der *Phialophora* sp.-Stämme und von *V. cf. alboatrum* war 28 Tage alt.

In einer Versuchsreihe wurden von jeder Konzentration und jedem Pilz 3 Parallelplatten, dessen Mitte mit einem bewachsenen Agarstück (\varnothing 7 mm) inokuliert war, angesetzt. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei 14 °C. Nach 18 Tagen wurden der Koloniedurchmesser bestimmt. Es kam zur Aufnahme von 2 Versuchsreihen.

2.6 Wachstumsstudien in Flüssigkultur

2.6.1 Kultivierung der Pilze in Flüssigkultur

Zur Anzucht der Pilze in Flüssigkultur wurden zunächst 75 bzw. 40 mL (Stamm H4/P/15) MA-Medium mit 1 bzw. 0,5 mL Myzelhomogenat beimpft (Vorkultur I: VK I). Zur Herstellung des Homogenats wurden 15 pilz-bewachsene Agarstückchen (\varnothing 7 mm) einer Stammplatte mit dem Ultra Turrax[®]T25 in 15 mL MA-Medium homogenisiert. Nach 7tägiger Kultivierung wurde VK I homogenisiert und frisches Malz-Medium (75 bzw. 40 mL) mit 0,1 mL dieses Homogenats beimpft (Vorkultur II: VK II). Nach 4tägiger Kultivierung wurde VK II homogenisiert und die Hauptkultur, MAP-Medium (pH 5,4-5,8), mit 0,07 mg dieses Homogenats inokuliert. Die Kultivierung dieser Hauptkultur (HK) erfolgte im Dunkeln, bei 14 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 rpm, in 100 mL Erlenmeyerkolben, die 75 mL Medium für die *H. lugdunensis*-Stämme bzw. 40 mL Medium für *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 enthielten. Die Kulturdauer variierte nach Aufgabenstellung. Nach erfolgter Kultivierung wurde die Pilzbiomasse abfiltriert (Whatmann 40), mit 30 mL destilliertem Wasser gewaschen und bei 80 °C über Nacht getrocknet und anschließend ausgewogen.

2.6.2 Wachstum in unbelasteter Kultur

Die Bestimmung des Wachstums in unbelasteter Flüssigkultur erfolgte in einem MAP-Medium (Kap. 2.3). Die Kulturkolben wurden mit homogenisiertem Myzel (0,07 mg TG, s. Kap. 2.6.1) inokuliert.

Die Pilze wurden bei 14 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 rpm für einen Zeitraum von 1-10 Tage kultiviert und täglich wurde das Trockengewicht bestimmt (Kap. 2.6.1). Es wurden 2-3 Versuchsreihen mit je 3 Parallelen durchgeführt.

2.6.3 Wachstum in schwermetallhaltiger Flüssigkultur

Da die Hemmung der Biomassenproduktion durch Schwermetalle in Oberflächenkultur nicht ermittelt werden kann, wurde von den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 das Wachstum in schwermetallhaltiger Flüssigkultur untersucht.

Die eingesetzten Schwermetallkonzentrationen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4 Schwermetallkonzentration der Toleranzversuche für *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und H8/2/1, sowie *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15.

<i>H. lugdunensis</i> - Stamm H4/2/4 und H8/2/1			<i>V. cf. alboatrum</i> - Stamm H4/P/15		
Cd(II)	Cu(II) [mM]	Zn(II)	Cd(II)	Cu(II) [mM]	Zn(II)
0,0125	0,0125	0,0125	0,025	0,025	0,025
0,025	0,025	0,025	0,1	0,1	0,1
0,05	0,05	0,05	0,3	0,3	0,3
0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5
	0,2	0,2	0,7	0,7	0,7
	0,3	0,3	1	1	1
					10
					20

Die Pilze wurden 5 Tage bei 14 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 rpm kultiviert und anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt (Kap. 2.6.1). Es wurden 2-3 Versuchsreihen durchgeführt. Pro Versuchsreihe und SM-Konzentration wurden 3 Parallelen angesetzt.

2.6.4 Bestimmung des I₅₀-Wertes (50 %-ige Wachstumsinhibition) für Cd(II), Cu(II) und Zn(II)

Das Wachstum der Pilze der vorliegenden Studie wurde in Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration in einem x/y-Diagramm ausgewertet und es wurde graphisch die Schwermetallkonzentration, die eine 50 %-ige Wachstumshemmung zur Folge hat, ermittelt.

2.7 Bestimmung der biosorbierten und akkumulierten Schwermetalle

2.7.1 Elution des biosorbierten Schwermetalls

Zur Bestimmung der Zellwandbiosorption von Schwermetallen wurde eine modifizierte Methode nach BROWN und WELLS (1988) angewandt. Dazu wurde die Kultur filtriert (Millipore Nitrocellulose 0,45 μM HA) und die auf dem Filter verbliebene Biomasse mit 100 mL destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das am Myzel biosorbierte Schwermetall 3mal mit 100 mL 20 mM NiCl_2 eluiert und anschließend mit 100 mL destilliertem Wasser nachgewaschen. Die Einwirkungszeit der einzelnen Waschlösungen betrug 5 min. Das Ni(II) (NiCl_2) tauscht das an der Zellwand biosorbierte Cd(II) aus.

Myzel, das bei Zn(II)-Konzentrationen > 10 mM kultiviert wurde, wurde zuerst 3mal mit 200 mL destilliertem Wasser gewaschen und anschließend einer 4maligen Waschung mit 20 mM NiCl_2 unterzogen; die darauffolgende Waschung mit destilliertem Wasser wurde mit 100 mL durchgeführt.

Das gewaschene Myzel wurde 24 h bei 80 °C getrocknet.

2.7.2 Myzelaufschluss

Zur Bestimmung der akkumulierten Schwermetallmenge wurde das -wie in Kap. 2.7.1 beschrieben- gewaschene und getrocknete Myzel in einer Mikrowelle (Fa. CEM, MDS 2100) aufgeschlossen. 20-60 mg getrocknetes Myzel wurde in Aufschlussgefäßen mit 2 mL H_2O_2 (suprapur) und 4 mL HNO_3 (suprapur) versetzt und unter folgenden Bedingungen aufgeschlossen:

Stufe	Druck	Zeit	max. Temp.
	[bar]	[min]	[°C]
1	1,30	1	-
2	2,75	1	180
3	5,58	10	180

Anschließend wurden die Proben in Abhängigkeit von der eingesetzten Schwermetallkonzentration mit destilliertem Wasser auf 35-50 mL aufgefüllt.

2.7.3 Schwermetallanalytik

Die Schwermetallkonzentrationen der Waschlösungen, des Mediums sowie des Myzelaufschlusses wurden im ICP-Spektrometer Plasmaquant 110 oder mittels AAS (Fa. Solar, ATI UNICUM 929) bestimmt. Die Gehalte an Schwermetallionen wurden mittels Eichkurven im Bereich 0,25-1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bestimmt.

2.7.4 Biosorptions- und Akkumulationsversuche

Es wurde die Abhängigkeit der Biosorption und Akkumulation von der Cd(II)- und Zn(II)-Konzentration bestimmt. Die mit Ni(II) eluierbare Menge an Cd(II) oder Zn(II) wird als biosorbiert und die im Myzel verbliebene, intrazellulär vorliegende Menge an Cd(II) oder Zn(II) als akkumuliert bezeichnet.

Die aus dem selben Standort (H4) isolierten Pilze *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15, deren Schwermetalltoleranz stark differierte, wurden untersucht. Die verwendeten Schwermetallkonzentrationen sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Schwermetalle wurden zum Zeitpunkt der Inokulation appliziert, die Kultivierung erfolgte 5 Tage bei 14 °C und 120 rpm.

Außerdem wurde die Pilzbiomasse ermittelt. Von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 wurde des weiteren der GSH- und GTSH-Gehalt, wie in Kapitel 2.8.2. und 2.8.3 beschrieben, bestimmt.

Tab. 5 Schwermetallkonzentrationen der Biosorptions- und Akkumulationsversuche von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15.

<i>H. lugdunensis</i> - Stamm H4/2/4		<i>V. cf. alboatrum</i> - Stamm H4/P/15	
Cd(II) [mM]	Zn(II) [mM]	Cd(II) [mM]	Zn(II) [mM]
0,0125	0,0125	0,025	0,025
0,025	0,025	0,1	0,3
0,05	0,1	0,5	10
0,1	0,2	1	20
	0,3		

Für *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 wurde die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) in einem 0,05 mM Cd(II)-haltigen Medium bestimmt. Die Kultivierung erfolgte wie bei Stamm H4/2/4.

Es wurden 2 Versuchsreihen mit je 3 Parallelen durchgeführt.

Die insgesamt wiedergefundene Schwermetallmenge (Biosorption + Akkumulation + Wasser + Medium) betrug ungefähr 100 ± 15 %. Aufgrund des unterschiedlichen Wachstums der Pilzstämme wird die biosorbierte und akkumulierte Schwermetallmenge pro mg Trockengewicht angegeben.

2.8 Bildung und Nachweis thiolhaltiger Peptide und Proteine unter Schwermetallbelastung

2.8.1 Extraktion thiolhaltiger Verbindungen

2.8.1.1 Extraktion nach GALLEGO et al. (1996)

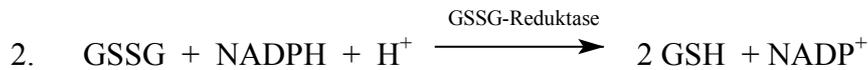
Für die Bestimmung des GSH- und Gesamtthiol (GTSH)-Gehaltes wurde das bei -80 °C gelagerte Myzel nach GALLEGO (1996) extrahiert. Das unter flüssigem Stickstoff gemörserte Myzel wurden in einem Verhältnis von 1,5 mL 1 N HCl : 50 mg Myzel extrahiert. Nach 15minütiger Zentrifugation (11 000 g) bei 4 °C in einer Eppendorf Kühlzentrifuge 5804 R war der Zellrückstand von dem thiolhaltigen Überstand getrennt. Der Überstand (= Extrakt) wurde bis zur Messung auf Eis gelagert und am selben Tag für die GSH- und GTSH-Bestimmung verwendet.

2.8.1.2 Extraktion thiolhaltiger Verbindungen nach GRILL et al. (1991)

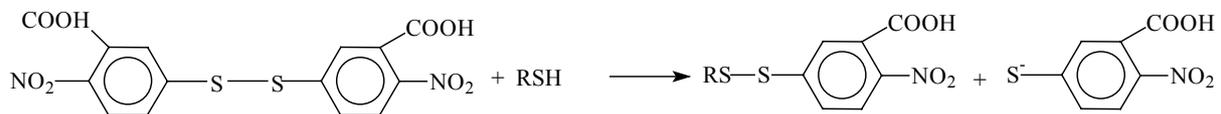
Die Extraktion der thiolhaltigen Peptide und Proteine erfolgte nach GRILL et al. (1991). Das Myzel wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und 100-200 mg Myzel wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit 1 N NaOH ($1 \text{ mg NaBH}_4 \text{ mL}^{-1} \text{ NaOH}$) versetzt. Die Suspension wurde homogenisiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 11 000 g bei 4 °C wurde der Überstand mit 3,6 N HCl ($70 \mu\text{L}$ pro $250 \mu\text{L}$ Überstand) angesäuert (pH 2). Nach 15minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (5 min, 4°C, 11 000 g) konnte der klare Überstand (= Extrakt) für die Bestimmung der thiolhaltigen Peptide und Proteine verwendet werden. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Zentrifugation, wie unter Kap. 2.8.4 beschrieben.

2.8.2 Enzymatische Bestimmung des GSH-Gehaltes

Der enzymatischen Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts (GSSG und GSH) liegt folgende Reaktion zugrunde:



Die Reaktion von GSH mit DTNB (Reaktion 1) wird mit der enzymatischen Reduktion des oxidierten GSHs durch die GSSG-Reduktase (Reaktion 2) gekoppelt. Die Bildung von TNB kann bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert werden (modifiziert nach ANDERSON 1985).



5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoessäure) (DTNB)

5-Thio-2-nitrobenzoessäure (TNB)

Abb. 4 Reaktion von DTNB mit Thiolen unter Freisetzung von TNB

Puffer:

Lsg. A	143 mM NaH ₂ PO ₄
Lsg. B	143 mM Na ₂ HPO ₄
Lsg. C	1 Lsg. A + 5,25 Lsg. B + 6,3 EDTA-Na ₂ ; pH 7,5

Reaktionsansatz:

NADPH + H ⁺	450 μM in Lsg. C	700 μL
DTNB	6 mM in Lsg. C	100 μL
dest. H ₂ O		665 μL
Extrakt		25 μL
GSSG-Reduktase	20 U mL ⁻¹	10 μL

Nach Mischung von NADPH + H⁺, DTNB und destilliertem Wasser wurde der Extrakt (s. Kap. 2.8.1.1) hinzugefügt, 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms GSSG-Reduktase gestartet. Die Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta E/410 \text{ nm}$) wurde über einen Zeitraum von 120 sec am Spectrophotometer U-2001 ermittelt.

Der GSH-Gehalt wurde mittels einer Eichkurve in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 $\mu\text{g GSH mL}^{-1}$ ermittelt.

2.8.3 Bestimmung des GTSH-Gehaltes

Der GTSH-Gehalt wurde mit Hilfe der Reaktion von SH-haltigen Verbindungen mit DTNB bestimmt, wobei TNB bei 410 nm detektiert werden kann. Es wurden die in Kapitel 2.8.1.1 beschriebenen Extrakte analysiert.

Reaktionsansatz:

DTNB	300 μM in KH_2PO_4 (50 mM, pH 8)	3,9 mL
Extrakt		0,1 mL

Verbindungen mit freien SH-Gruppen werden durch DTNB oxidiert und das TNB konnte bei 410 nm detektiert werden. Der GTSH-Gehalt wurde anhand einer Eichkurve in einem Konzentrationsbereich von 10-100 $\mu\text{g GSH mL}^{-1}$ bestimmt.

2.8.4 Analytik der thiolhaltigen Peptide und Proteine

Die Analytik der thiolhaltigen Peptide und Proteine erfolgte nach GRILL et al. (1991) mittels Reversed Phase HPLC und Online-Nachsäulenderivatisierung mit DTNB. Es wurden die in Kapitel 2.8.1.2 beschriebenen Extrakte verwendet.

Bei der Reaktion von DTNB mit SH-Gruppen kommt es zur Freisetzung von TNB, das als gelber Farbstoff bei 410 nm detektiert werden kann (ELLMAN, 1959).

HPLC-Bedingungen:

Säule:		C-18 (SuperPac PEP S, Pharmacia), 5 μm , 4 x 250 mm
Mobile Phase:	A	H ₂ O, pH 3 mit TFA
	B	ACN
Gradient:		2-20 % B in A in 20,0 min; 20,1-25,0 min 20 % B, 25,1-30,0 min 2 % B
Fluss:		1 mL min ⁻¹

Nachsäulenderivatisierung:

DTNB		300 μM in 500 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8
Fluss		0,4 mL min ⁻¹
Reaktionsschleife		1 mL, entsprechend 44 sec Reaktionszeit
Detektion		410 nm

2.8.5 Proteintrennung mittels Gelfiltration

Das Myzel wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert, 15 min in 1 N NaOH (1 mg NaBH₄ mL⁻¹ NaOH) extrahiert (Verhältnis Myzel: NaOH = 1: 2) und anschließend 10 min bei 11 000 g zentrifugiert. Die Proteine des Überstandes wurden mit Hilfe einer Superdex[®]Peptide HR 10/30 Säule (Pharmacia Biotech) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Mobile Phase:		50 mM (NH ₄)HCO ₃ pH 7,9
Fluss:		0,8 mL min ⁻¹
Detektion bei 215 nm.		

2.8.6 Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurden PC₂ und MTs mittels präparativer HPLC unter Verwendung einer RP 18 (SuperPac Pep-S, Pharmacia) Säule getrennt (s. Kap. 2.8.5). Die Flussrate betrug 1 mL min⁻¹. Die Trennung der Fraktionen erfolgte anhand des Peptidmusters bei 215 nm.

Die Aufnahme der ESI-MSn Spektren der thiolhaltigen Peptide und Proteine erfolgte mit einem Ionentrapp Spektrometer (ESQUIRE-LC, Bruker Daltonik, Bremen). Die Proben wurden mit einer Kolbenpumpe (Cole/Parmer Instrument Company) mit einer Flussrate von 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ injiziert. Für MSn-Experimente wurden die entsprechenden Ionen mit einem Massenfenster von bis zu 4 Da isoliert.

MALDI-PSD Massenspektrometrie wurde mit einem Reflectron TOF Massenspektrometer (REFLEX II, Daltonik, Bremen) durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV und die Reflektronspannung betrug 22,5 kV. Die Reflektronspannung wurde in 14 Schritten reduziert, um MALDI-PSD Spektren zu erhalten.

Die Proben wurden mit einer gesättigten Lösung aus Zimtsäure, gelöst in 0,1 % Trifluoressigsäure/Acetonitril (2:1), behandelt.

2.8.7 Edman-Sequenzierung

Für die Aminosäuresequenzierung wurden die MTs mittels präparativer HPLC unter Verwendung einer RP 18 (SuperPac Pep-S, Pharmacia) Säule getrennt (s. Kap. 2.8.5). Die Flussrate betrug 1 mL min^{-1} . Die Trennung der Fraktionen erfolgte anhand des Peptidmusters bei 215 nm.

Die Edman-Sequenzierung der MTs erfolgte mit einem Aminosäuresequenzer (Applied Biosystems 476A Protein Sequencer, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. Es erfolgt eine Derivatisierung der Proteine mit Phenylisothiocyanat zu PTIC-Proteinen und anschließend kommt es zu einer Abspaltung und Umwandlung der Aminosäuren zu Phenylthiohydantoin-(PTH)-Aminosäuren. Es wurden 40 μL der entsprechenden Fraktionen verwendet. Die Sequenzierung erfolgte in 15 (t_R 20) bzw. in 20 (t_R 18) Schritten.

2.8.8 Bildung thiolhaltiger Peptide und Proteine unter Schwermetallbelastung

Belastung zum Zeitpunkt der Inokulation

- Von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 wurde der GSH- und GTSH-Gehalt in Abhängigkeit von der Cd(II)- oder Zn(II)-Konzentration bestimmt. Es erfolgte eine 5tägige Kultivierung unter einer Belastung von 0,025, 0,1, 0,5 und 1 mM Cd(II) oder 0,025, 0,3, 10 und 20 mM Zn(II). Die GSH- und GTSH-Gehalte wurden wie in Kapitel 2.8.2 und 2.8.3 beschrieben, bestimmt.
- Zur Bestimmung des GSH-, GTSH-, PC₂- und MT-Gehaltes der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer wurde die Kultur zum Zeitpunkt der Inokulation mit 0,05 mM Cd(II) belastet. Aufgrund der geringen Biomassenbildung erfolgte die erste Messung erst nach 3tägiger Kultivierung. Die Kulturdauer betrug 3, 4, 5, 6 und 12

Tage. Da es nicht zu einer täglichen Ernte kam, kann nur einer relativer maximaler Gehalt, im folgenden jedoch als maximaler Gehalt bezeichnet, angegeben werden.

Die Abhängigkeit der GSH-, GTSH-, PC₂- und MT-Gehalte der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 von der Cd(II)-Konzentration wurde nach 5tägiger Kultivierung unter 0,0125, 0,025, 0,05 und 0,1 mM* Cd(II)-Belastung, wie in Kapitel 2.8.1 bis 2.8.4 beschrieben, bestimmt. Von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 wurde außerdem der GSH- und GTSH-Gehalt unter 0,0125, 0,025, 0,1, 0,2, und 0,3 mM Zn(II) untersucht.

Cd(II)-Belastung nach 3tägiger Kultivierung

Nach 3tägiger Kultivierung der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in unbelasteter Kultur wurde 0,1 bzw. 0,5 mM Cd(II) appliziert. Nach anschließender 1, 3 bzw. 9tägiger Kultivierung unter Cd(II)-Belastung wurden die GSH-, GTSH-, PC₂- und MT-Gehalte, wie in Kapitel 2.8.1 bis 2.8.4 beschrieben, bestimmt.

Das Myzel wurde mit 300 mL destilliertem Wasser gewaschen und bei -80 °C eingefroren. Die Bestimmung der PC₂- und MT-Gehalte erfolgte innerhalb von 1-3 Tagen, die GSH- und GSTH-Bestimmung innerhalb von 2 Wochen. Zu jedem Messpunkt wurden die Gehalte an GSH, GTSH, PC₂ und MT in einer Kontrollkultur bestimmt. Außerdem wurde zu jedem Zeitpunkt das Wachstum, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, ermittelt. Alle Versuchsreihen wurden zweimal mit jeweils 3 Parallelen durchgeführt.

2.9 Statistische Auswertung von Ergebnissen

Die Bestimmung der Standardabweichungen erfolgte mit Hilfe einer computergestützten Tabellenkalkulation (MS Excel 2000).

Die Korrelation zwischen zwei Parametern wurde durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten r mittels MS Excel 2000 bestimmt. Die Korrelation zwischen zwei Reihen ist erst dann nachgewiesen, wenn sich der Korrelationskoeffizient r gesichert von Null unterscheidet. Daraus ergeben sich die Grenzwerte $r(p,f)$ zur Prüfung des errechneten Korrelationskoeffizienten auf lineare Abhängigkeit zweier Größen (DOERFFEL, 1990). Die Wahrscheinlichkeit p wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Anzahl der Freiheitsgrade ergab sich aus $f = m - 2$, wobei m die Anzahl der Wertepaare darstellt.

* nur Stamm H4/2/4

Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei Messwerten erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte durch den t-Test (DOERFFEL, 1990). Vor der Durchführung dieses Prüfverfahrens mussten die Standardabweichungen s_1 und s_2 auf einen signifikanten Unterschied untersucht werden (F-Test).

F-Test:
$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{wobei } s_1 > s_2$$

Bei $F < F(p, f_1, f_2)$, wobei die Wahrscheinlichkeit p auf $p < 0,05$ und die Anzahl der Freiheitsgrade durch $f = n - 1$ (n : Anzahl der Messungen) festgelegt wurde, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen und der t-Test kann durchgeführt werden (DOERFFEL, 1990).

t-Test:
$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 f_1 + s_2^2 f_2}{f_1 + f_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

Erhält man $t > t(p, f_g)$, wobei die Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$ und die Anzahl der Freiheitsgrade $f_g = n_1 + n_2 - 2$, ist der Unterschied zwischen den zu vergleichenden Werten signifikant, bei $t < t(p, f_g)$ ist die Differenz nicht signifikant. Die Grenzen für $F(p, f_1, f_2)$ und $t(p, f_g)$ wurden DOERFFEL (1990) entnommen.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsuntersuchungen

Zu Beginn der Untersuchungen stand im Vordergrund aquatische und terrestrische Pilze, die aus Haldensickerwässern des Mansfelder Landes isoliert worden waren, bezüglich ihrer Schwermetalltoleranz *in vitro* zu untersuchen. Daher wurde ein Toleranz-Screening von *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1, *Phialophora* sp.-Stämmen H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur durchgeführt. Für die weiterführenden Studien wurden die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 ausgewählt und vergleichend bezüglich ihres Wachstums in unbelasteter und belasteter Flüssigkultur untersucht.

3.1.1 Wachstum in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur

3.1.1.1 Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1

Die Anzucht und Aufarbeitung der Pilze erfolgte wie in Kapitel 2.5 beschrieben. In Tabelle 6 ist das prozentuale Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. In Tabelle 7 wird das prozentuale Wachstum im Vergleich zur Kontrolle unter Cd(II)-, Cu(II)- und Zn(II)-Belastung (0,01; 0,1 u. 1 mM) gezeigt.

Tab. 6 Oberflächenwachstum [%] der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Cd(II)-haltiger Kultur im Vergleich zur Kontrolle. (K = 100 %), 18 d, 14 °C.

Cd(II) [mM]		0,01	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1
H4/2/4	MW	95,4	80,6	45,2	24,6	15,2	11,2	1,0
	SD	2,3	1,2	1,4	6,4	5,2	1,6	0,0
H8/2/1	MW	101,1	99,3	69,9	50,7	37,8	27,6	7,3
	SD	2,4	3,8	2,0	4,1	1,8	2,5	1,0

Ab einer Konzentration von 0,01 mM Cd(II) trat eine signifikante Hemmung des Wachstums von Stamm H4/2/4 auf. Die Hemmung nahm mit steigender Cd(II)-Konzentration zu und bei 1 mM Cd(II) lag eine nahezu vollständige Hemmung (99,0 %) des Wachstums vor (Tab. 6).

In einem Konzentrationsbereich von 0,01-0,1 mM Cu(II) wurde das Wachstum von Stamm H4/2/4 nicht gehemmt (Tab. 7). Erst ab einer Konzentrationen > 0,1 mM trat eine Hemmung auf und unter 1 mM Cu(II) betrug das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle $30,7 \pm 2,8$ %. Ein signifikante Inhibition des Wachstums lag ab einer Belastung von 0,01 mM Zn(II) vor. Unter 1 mM Zn(II) betrug das Wachstum $16,5 \pm 1,0$ %. Eine 50 %-ige Wachstumshemmung wurde bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,2 mM und bei Konzentrationen zwischen > 0,1 und < 1mM Cu(II) bzw. Zn(II) erreicht (Tab. 6 u. 7).

Tab. 7 Oberflächenwachstum [%] der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 im Vergleich zur Kontrolle. (K = 100 %), 18 d, 14 °C.

H4/2/4		0,01	0,1	1
		[mM]		
Cd(II)	MW	95,4	80,6	1,0
	SD	2,3	1,2	0,0
Cu(II)	MW	102,3	104,1	30,7
	SD	1,2	2,3	2,8
Zn(II)	MW	97,4	85,4	16,5
	SD	1,5	1,9	1,0

H8/2/1		0,01	0,1	1
		[mM]		
Cd(II)	MW	101,1	99,3	3,3
	SD	2,4	3,8	0,5
Cu(II)	MW	101,5	99,3	30,7
	SD	1,2	2,1	8,5
Zn(II)	MW	99,3	92,6	18,2
	SD	1,5	1,9	1,0

Stamm H8/2/1 wies erst ab einer Cd(II)-Konzentration von 0,2 mM eine Hemmung des Wachstums auf, die mit steigender Cd(II)-Konzentration weiter zunahm. Unter 1 mM Cd(II) lag nur noch ein geringfügiges Wachstum von $7,3 \pm 1,0$ % vor (Tab. 6).

Eine Inhibition des Wachstums durch Cu(II) lag ab einer Konzentration von > 0,1 mM vor und bei 1 mM Cu(II) betrug das Wachstum $30,7 \pm 8,5$ % (Tab. 7). Unter Zn(II)-Belastung lag ab einer Konzentration von 0,1 mM Zn(II) eine Wachstumshemmung (7,4 %) vor. Bei einer Konzentration von 1 mM Zn(II) kam es zu einem Wachstum von $18,2 \pm 1,0$ % (Tab. 7). Das Wachstum war bei einer Konzentration von 0,3 mM Cd(II) und in einem Bereich von > 0,1 und < 1 mM Cu(II) bzw. Zn(II) um 50 % gehemmt.

In Cd(II)-haltiger Oberflächenkultur war das Wachstum von Stamm H4/2/4 im Vergleich zu Stamm H8/2/1 etwas geringer.

Bei einer Konzentration von 1 mM Cu(II) bzw. Zn(II) wiesen die Stämme H4/2/4 und H8/2/1 keine signifikanten Unterschiede im Wachstum auf. Die Hemmung des Wachstums durch jeweils 1 mM Cd(II), Cu(II) und Zn(II) nahm in beiden *H. lugdunensis*-Stämmen in folgender Reihenfolge ab: **Cd(II) > Zn(II) > Cu(II)**.

3.1.1.2 Wachstum der *Phialophora* sp.-Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

In Abbildung 5 ist das Wachstum der *Phialophora* sp.-Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie von *V. cf. alboatrum* Stamm H4/P/15 dargestellt (s. Anhang B, Tab. 1, 2, 3, 4).

Der *Phialophora* sp.-Stamm H3/P/5 wies bei einer Konzentration von 0,1 mM Cd(II) eine signifikante Stimulation des Wachstums auf, zu einer Hemmung des Wachstums um 57,3 % kam es bei einer Cd(II)-Konzentration von 1 mM (Abb. 5). Eine Inhibition des Wachstums um 16,4 % wurde bei 1 mM Cu(II) erreicht. Eine Wachstumsförderung lag bei 0,1 mM Zn(II) vor, eine signifikante Hemmung wurde bei einer Konzentration von 1 mM erreicht und es lag ein Wachstum von $84,5 \pm 9,4$ % vor. Eine 50 %-ige Hemmung des Wachstums lag bei 1 mM Cd(II) und 10 mM Cu(II) bzw. Zn(II) vor. In einem Konzentrationsbereich von 1-10 mM nahm die Hemmung des Wachstum in folgender Reihenfolge ab: **Cd(II) \geq Cu(II) = Zn(II)**.

Bei Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 mM Cd(II), Cu(II) bzw. Zn(II) wies *Phialophora* sp.-Stamm H3/P/7 keine signifikante Hemmung des Wachstums auf (Abb. 5). Eine 50 %-ige Wachstumshemmung lag bei <1 mM Cd(II), 10 mM Cu(II) bzw. > 10 mM Zn(II) vor. Die Wachstumshemmung nahm in einem Bereich von 1-10 mM in folgender Reihenfolge ab: **Cd(II) $>$ Cu(II) $>$ Zn(II)**.

Der *Phialophora* sp.-Stamm H4/P/12 zeigte ab 0,1 mM Cd(II) eine signifikante Wachstumshemmung, die bei 1 mM im Vergleich zur Kontrolle 55,4 % betrug (Abb. 5). Bei einer Cu(II)-Belastung von 0,1 bis 1 mM kam es zu einer signifikanten Wachstumsförderung. Eine 50 %-ige Wachstumshemmung lag erst bei einer Konzentration von ungefähr 10 mM Cu(II) vor (Abb. 5). Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich war eine signifikante Wachstumsförderung durch Zn(II) nachweisbar. Die Hemmung des Wachstums nahm in folgender Reihenfolge ab: **Cd(II) $>$ Cu(II)**.

Der *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 zeigte bereits ab einer Konzentration von jeweils 0,01 mM Cd(II), Cu(II) und Zn(II) eine signifikante Wachstumshemmung von 2-5 % (Abb. 5). Eine 50 %-ige Reduktion des Wachstums lag bei 1 mM Cd(II), < 1 mM Cu(II) und < 10 mM

Zn(II) vor. Die Hemmung des Wachstums nahm bei einer SM-Konzentration von 10 mM in folgender Reihenfolge ab: Cd(II) > Cu(II) > Zn(II).

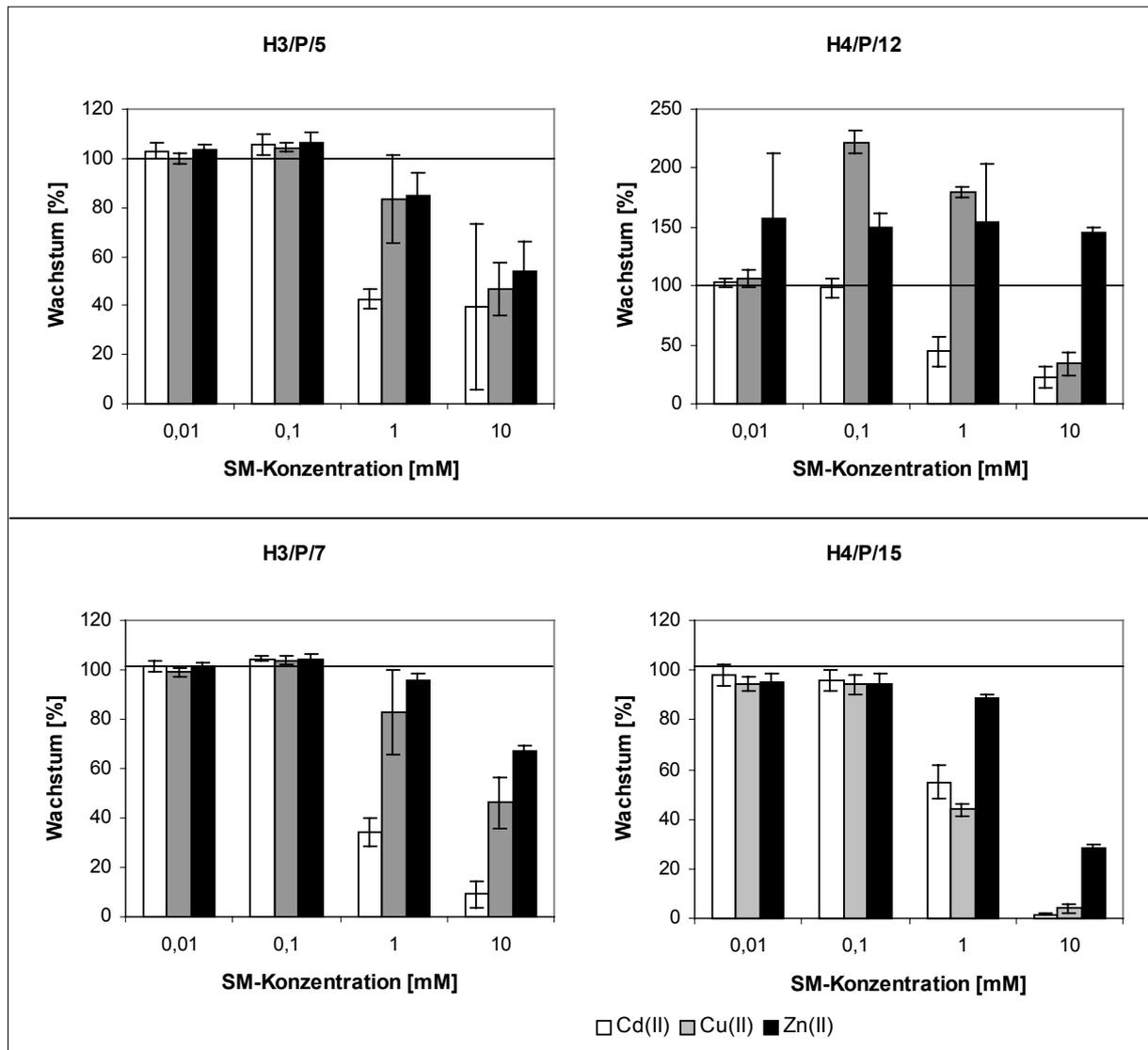


Abb. 5 Wachstum der *Phialophora* sp.-Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12 und von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). 14 °C, 18 d, Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

Insgesamt ergibt die vergleichende Auswertung von Kapitel 3.1.1, dass die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 eine 50 %-ige Wachstumshemmung bereits bei ≤ 1 mM SM aufwiesen; dagegen zeigten die *Phialophora*-Stämme H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie *V. cf. alboatrum* Stamm H4/P/15 eine 50 %-ige Wachstumshemmung erst zwischen 1-10 mM SM. Bei *Phialophora*-sp. Stamm H4/P/12 wurde sogar eine signifikante Stimulation des Wachstums in Cu(II)- und Zn(II)-haltiger Oberflächenkultur festgestellt.

3.1.2 Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4P/15 in unbelasteter Flüssigkultur

Das Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4P/15 in unbelasteter Flüssigkultur ist in Abbildung 6 dargestellt (s. Anhang B, Tab. 5). Die Kultivierung der Pilze erfolgte wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben.

Am Ende der logarithmischen Phase nach 8 Tagen wies Stamm H4/2/4 eine maximale Biomasse von $2,2 \pm 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ auf. Stamm H8/2/1 erreichte nach 7 Tagen eine maximale Biomasse von $1,9 \pm 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (Abb. 6). Die logarithmische Phase von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4P/15 endete nach 6 Tagen mit einer Biomasse von $3,1 \pm 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$. Die Wachstumskurve aller Stämme zeigte keine lag-Phase.

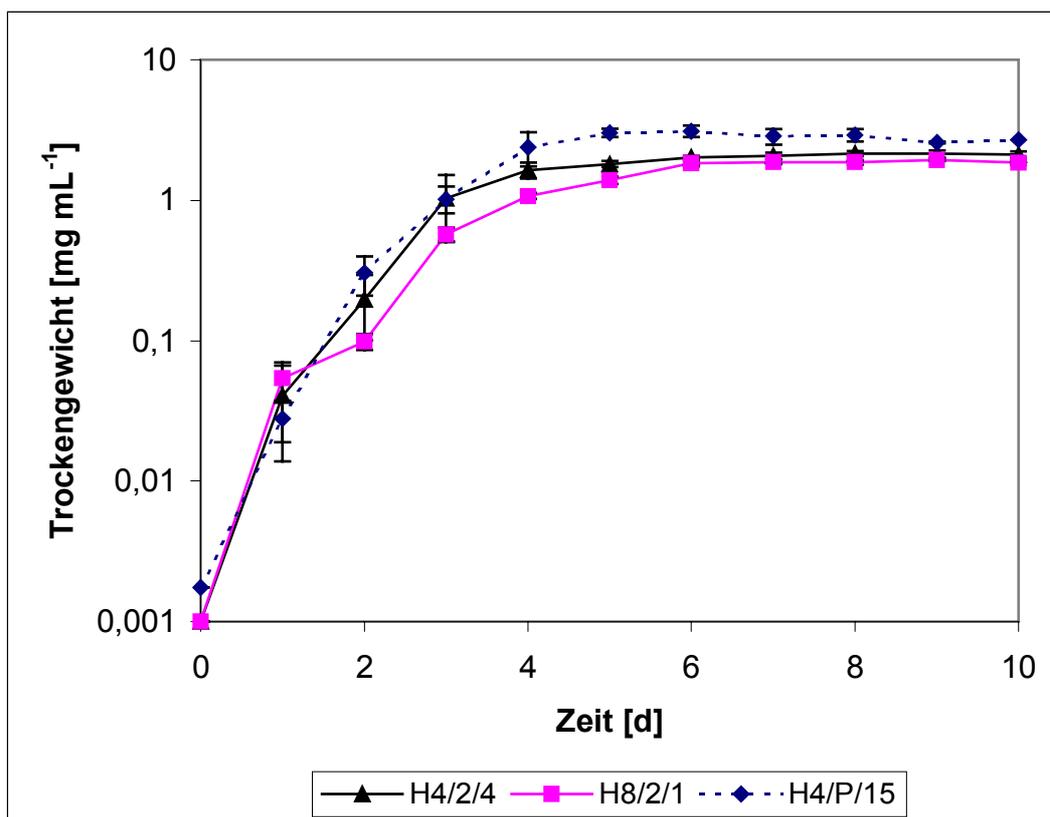


Abb. 6 Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie des *V. cf. alboatrum*-Stammes H4P/15 in Flüssigkultur. 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 bzw. 3 (Stamm H4/2/4) Versuchsreihen mit je $n = 3$, SD: 0,1-0,7.

Im Vergleich zu der maximalen Biomasse von Stamm H8/2/1 bildete Stamm H4/2/4 eine um 15,7 % höhere maximale Biomasse. Die maximale Biomasse von *V. cf. alboatrum*-Stamm

H4/P/15 war um 40,9 bzw. 63,1 % höher als die von Stamm H4/2/4 bzw. H8/2/1 und lag 1 bis 2 Tage früher vor.

3.1.3 Schwermetalltoleranz der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

In Abbildung 7 (s. Anhang B, Tab. 6) ist das prozentuale Wachstum beider *H. lugdunensis*-Stämme in schwermetallhaltiger Flüssigkultur im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) dargestellt. Die Anzucht erfolgte wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben.

Stamm H4/2/4 wurde bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,05 mM um 19,2 % gehemmt. Die Hemmung nahm bis zu einer Konzentration von 0,1 mM Cd(II) zu (50,7 %) und bei 0,2 mM Cd(II) war kein Wachstum mehr nachweisbar (Abb. 7). Cu(II) und Zn(II) übten ab 0,2 mM eine signifikante Wachstumshemmung aus (21,3 bzw. 14,4 %). Die Hemmung des Wachstums durch Cu(II) bzw. Zn(II) war nicht signifikant verschieden. Bei einer Konzentration von 0,4 mM Cu(II) bzw. Zn(II) betrug das Wachstum von H4/2/4 im Vergleich zur Kontrolle nur noch $13,3 \pm 8,1$ bzw. $11,4 \pm 12,0$ %. Eine 50 %-ige Wachstumshemmung trat bei 0,1 mM Cd(II), 0,3 mM Cu(II) und 0,3 mM Zn(II) auf (Abb. 7).

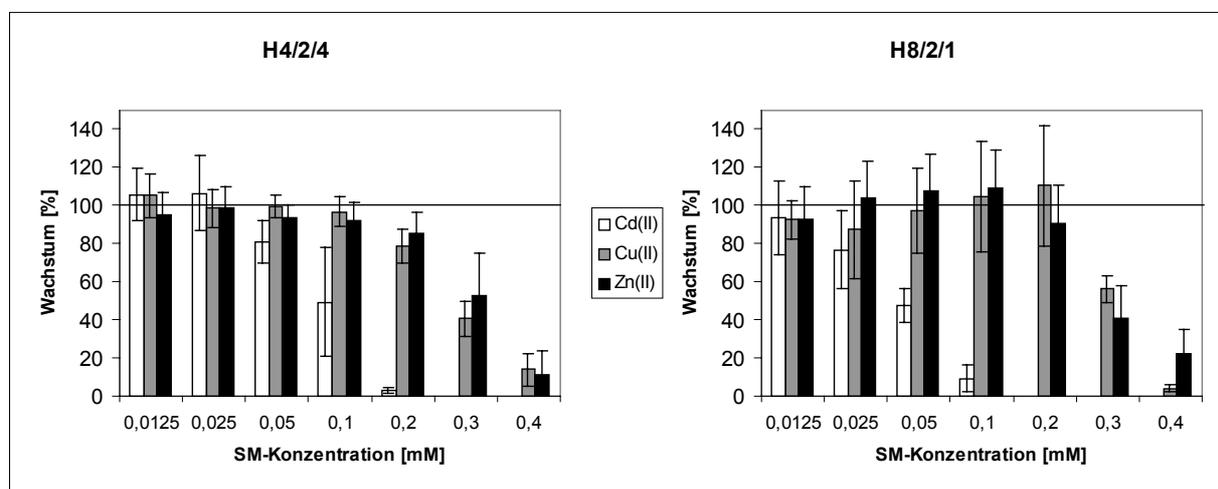


Abb. 7 Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in schwermetallhaltiger Flüssigkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). 14 °C, 120 rpm, 5d, Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit je n = 3.

Stamm H8/2/1 wies ab einer Cd(II)-Konzentration von 0,0125 mM eine signifikante Wachstumshemmung auf (Abb. 7). Das Wachstum nahm bis zu 0,05 mM Cd(II) ab und betrug $47,6 \pm 8,7$ %. Unter 0,1 mM Cd(II) lag nur noch ein geringfügiges Wachstum von $9,1 \pm 7,0$ % vor. Im Konzentrationsbereich von 0,0125 bis 0,2 mM Cu(II) bzw. Zn(II)

unterschied sich das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 0,3 mM Cu(II) und Zn(II) lag ein Wachstum von $56,2 \pm 6,9$ bzw. $40,9 \pm 17,1$ % vor. Bei 0,4 mM Cu(II) bzw. Zn(II) wurde im Vergleich zur Kontrolle ein Wachstum von $3,9 \pm 1,7$ bzw. $22,4 \pm 12,7$ % erreicht. Eine 50 %-ige Wachstumshemmung lag bei 0,05 mM Cd(II) und 0,3 mM Cu(II) und zwischen 0,2 und 0,3 mM Zn(II) vor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in ihrer Schwermetalltoleranz nur in Bezug auf Cd(II) unterschieden. Während Stamm H4/2/4 bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,1 mM $49,3 \pm 28,3$ % der Biomasse der Kontrollkultur aufwies, wuchs Stamm H8/2/1 nur noch geringfügig ($9,1 \pm 7,0$ %). Die Hemmung des Wachstum nahm folgendermaßen ab: **Cd(II) > Cu(II) \geq Zn(II)**.

Das prozentuale Wachstum von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 im Vergleich zur Kontrolle in schwermetallhaltiger Flüssigkultur ist in Abbildung 8 dargestellt (s. Anhang B, Tab. 7 u. 8). Die Anzucht erfolgte wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben.

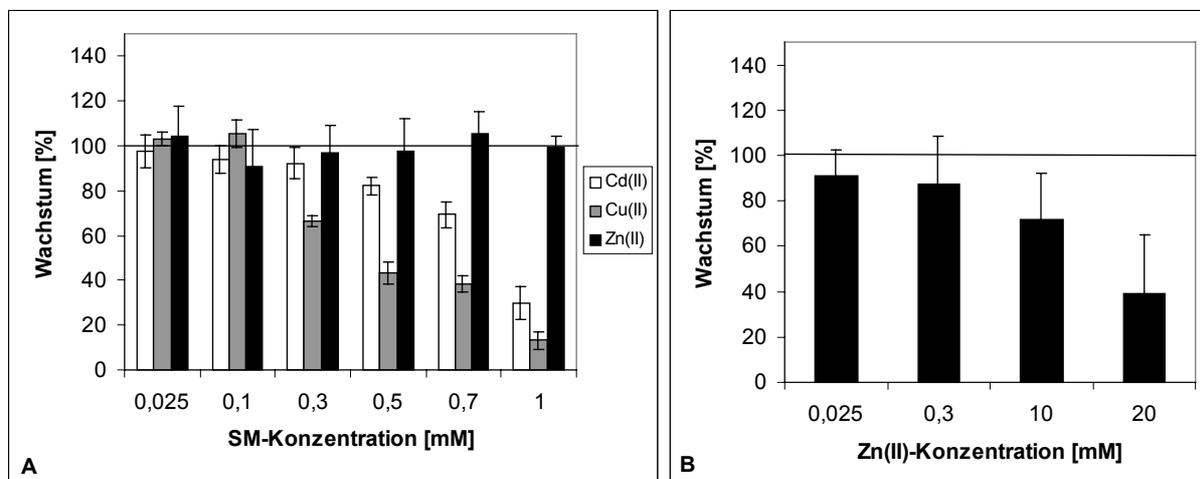


Abb. 8 Wachstum von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in schwermetallhaltiger Flüssigkultur (K = 100 %). 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 (A) bzw. 4 (B) Versuchsreihen mit je n = 3.

Das Wachstum von Stamm H4/P/15 wurde erst ab einer Konzentration von 0,5 mM Cd(II) signifikant gehemmt und betrug $82,2 \pm 4,1$ %. Bei 1 mM Cd(II) lag ein Wachstum von $29,6 \pm 7,3$ % vor (Abb. 8 A). Dagegen wurde das Wachstum durch 0,025 mM Cu(II) gefördert und nahm ab 0,3 mM Cu(II) signifikant ab. Bei einer Konzentration von 1 mM Cu(II) wies Stamm H4/P/15 nur $13,2 \pm 3,9$ % der Biomasse der Kontrolle auf. Die geringste Wachstumshemmung übte Zn(II) aus. Da bis 1 mM Zn(II) keine Hemmung des Wachstums

auftrat (Abb. 8 A), wurde in einem weiteren Versuch das Wachstum unter höheren Zn(II)-Konzentrationen untersucht (Abb. 8 B). Bei einer Konzentration von 10 mM betrug das Wachstum noch $71,8 \pm 20,7$ %. Das Wachstum nahm bis 20 mM Zn(II) signifikant ab und wies $39,3 \pm 25,5$ % der Biomasse der Kontrolle auf. Eine 50 %-ige Wachstumshemmung lag zwischen 0,7 und 1 mM Cd(II), bei 0,5 mM Cu(II) und zwischen 10 und 20 mM Zn(II) vor.

Im Vergleich zu den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 war das Wachstum von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unter bis zu 10fach höheren Cd(II) bzw. 2,5fach höheren Cu(II)-Konzentrationen möglich. Besonders auffällig war die hohe Toleranz gegenüber Zn(II), mit einem 39,3 %-igem Wachstum bei einer Zn(II)-Konzentration von 20 mM.

3.2 Studien zur Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4

3.2.1 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4

In Abbildung 9 ist die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) bzw. Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 dargestellt (s. Anhang B, Tab. 9 u. 10). Die Kultivierung der Pilze und die Bestimmung der Biosorption und Akkumulation erfolgte wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben.

Die Biosorption von Cd(II) nahm mit steigender Cd(II)-Konzentration signifikant zu (Abb. 9). Unter einer Cd(II)-Belastung von 0,0125 mM wurde $2,2 \pm 0,8$ nmol Cd(II) mg^{-1} TG biosorbiert, unter 0,1 mM Cd(II) lag eine um 740,9 % höhere Cd(II)-Biosorption, $18,5 \pm 4,5$ nmol Cd(II) mg^{-1} TG, vor. Es bestand eine positive Korrelation zwischen der Cd(II)-Konzentration im Medium und der Cd(II)-Biosorption ($r = 0,99$).

Die Akkumulation von Cd(II) nahm ebenfalls mit zunehmender Cd(II)-Konzentration im Medium zu. Bei 0,1 mM Cd(II) betrug die Akkumulation $11,8 \pm 4,9$ nmol Cd(II) mg^{-1} TG und war damit um 461,9 % höher als bei 0,0125 mM Cd(II). Zwischen der Cd(II)-Konzentration des Mediums und der Akkumulation von Cd(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bestand eine Korrelation ($r = 0,97$).

Bei einer Cd(II)-Belastung von 0,1 mM waren von dem wiedergefundenen Cd(II) (Biosorption + Akkumulation + Wasser + Medium = $98,9 \pm 7,3$ %) 33,7 % von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 aufgenommen worden. Es galt: Biosorption > Akkumulation.

Die Biosorption von Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 nahm ab 0,025 mM Zn(II) signifikant mit der Konzentration zu. Die Biosorption betrug bei 0,3 mM Zn(II) $60,4 \pm 16,4$ nmol Zn(II) mg^{-1} TG und war um 1489,5 % höher als bei einer Zn(II)-Konzentration von 0,0125 mM. Der Korrelationskoeffizient der Zn(II)-Konzentration des Mediums und der Biosorption von Zn(II) lag bei $r = 0,99$.

Auch hinsichtlich der Zn(II)-Akkumulation ergab sich eine konzentrationsabhängige Zunahme. Bei 0,3 mM Zn(II) war die Zn(II)-Akkumulation um 1091,6 % höher als bei 0,0125 mM und betrug $85,8 \pm 16,5$ nmol Zn(II) mg^{-1} TG. Die Zunahme der Zn(II)-Akkumulation korrelierte mit dem Anstieg der Zn(II)-Konzentration im Medium ($r = 0,99$).

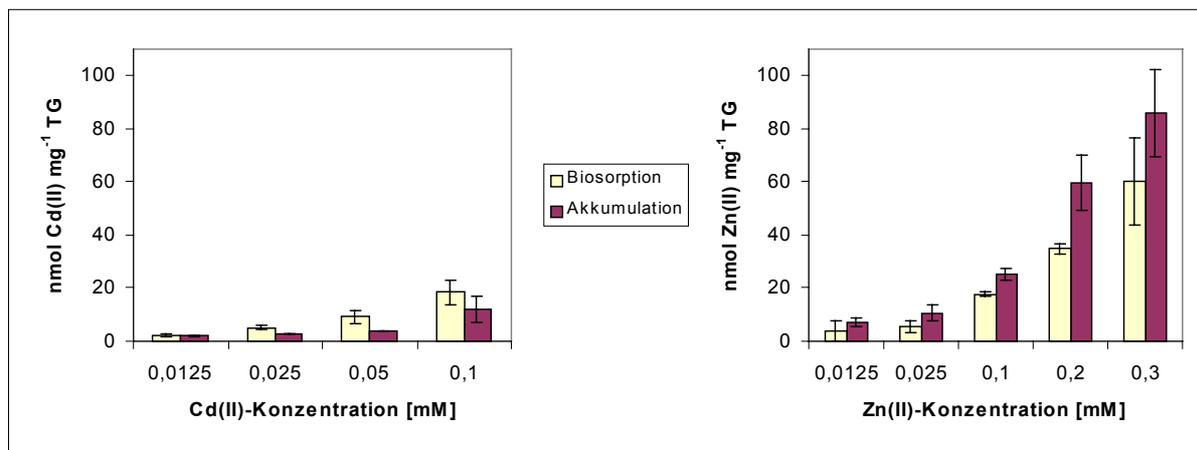


Abb. 9 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) oder Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der SM-Konzentration. SM-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je $n = 3$.

Unter einer Zn(II)-Belastung von 0,1 mM waren 59,3 % von dem wiedergefundenen Zn(II) (= $93,8 \pm 16,3$ %) von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 aufgenommen worden. Die Biosorption von Zn(II) war kleiner als die Akkumulation.

Bei einer SM-Konzentration von 0,1 mM im Medium war die Biosorption von Cd(II) und Zn(II) nicht signifikant verschieden. Die Akkumulation von Zn(II) war jedoch um 112,7 % höher als die akkumulierte Menge an Cd(II).

3.2.2 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

In Abbildung 10 ist die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) oder Zn(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 dargestellt (s. Anhang B, Tab. 11 u. 12). Die Kultivierung der Pilze und die Bestimmung der Biosorption und Akkumulation erfolgte wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben.

Eine Biosorption von Cd(II) war erst ab einer Konzentration von 0,1 mM nachweisbar und lag bei $1,2 \pm 0,3 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ TG}$. Bei Erhöhung der Cd(II)-Belastung von 0,5 auf 1 mM kam es zu einem Anstieg der Biosorption um 854,0 % und es wurde ein Wert von $35,3 \pm 7,0 \text{ nmol Cd(II) mg}^{-1} \text{ TG}$ erreicht (Abb. 10). Es bestand keine Korrelation zwischen der Cd(II)-Konzentration im Medium und der Biosorption ($r = 0,92$).

Die Akkumulation von Cd(II) war bis zu einer Konzentration von 0,5 mM Cd(II) sehr gering ($1,0 \pm 0,4 \text{ nmol Cd(II) mg}^{-1} \text{ TG}$). Bis 1 mM Cd(II) stieg sie um 1150,0 % an und betrug dann $22,5 \pm 6,9 \text{ nmol Cd(II) mg}^{-1} \text{ TG}$ (Abb. 10). Es lag keine Korrelation zwischen der Cd(II)-Konzentration des Mediums und der Akkumulation von Cd(II) vor ($r = 0,89$).

Bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,1 mM waren nur 4,8 % des wiedergefundenen Cd(II) (= $95,8 \pm 4,3 \%$) von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 aufgenommen worden. Ab einer Cd(II)-Konzentration von 0,1 mM war die Biosorption größer als die Akkumulation.

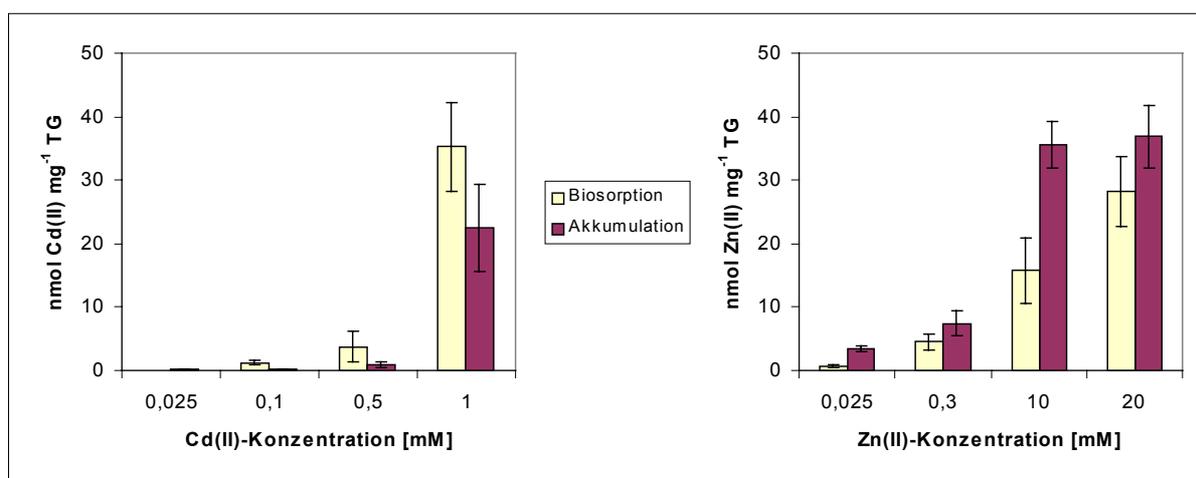


Abb. 10 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) bzw. Zn(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Abhängigkeit von der SM-Konzentration. SM-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je $n = 3$.

Es erfolgte eine konzentrationsabhängige Biosorption von Zn(II). Die Biosorption erhöhte sich bei einer Belastung von 0,3 mM bis 20 mM Zn(II) um 526,6 % und erreichte einen Wert von $28,2 \pm 5,6$ nmol Zn(II) mg^{-1} TG (Abb. 10). Die Biosorption korrelierte mit der Zn(II)-Konzentration im Medium und der Wachstumshemmung ($r = 0,99$ bzw. $r = -0,98$).

Die Akkumulation nahm in einem Bereich von 0,025 und 10 mM Zn(II) um 914,3 % zu und erreichte einen Wert von $35,5 \pm 3,7$ nmol Zn(II) mg^{-1} TG (Abb. 10). Bis 20 mM stieg die Akkumulation nicht mehr signifikant an. Die Akkumulation korrelierte nicht mit der Zn(II)-Konzentration im Medium und der Wachstumshemmung ($r = 0,91$ bzw. $r = -0,84$).

Während die Biosorption bis zu einer Konzentration von 20 mM Zn(II) zunahm, war die Akkumulation im Bereich zwischen 10 bis 20 mM nicht signifikant verschieden. Die Akkumulation war größer als die Biosorption. Unter einer Zn(II)-Belastung von 10 mM waren von dem wiedergefundenen Zn(II) ($= 111,6 \pm 7,5$ %) lediglich 0,8 % durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 aufgenommen worden.

Insgesamt zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 0,025 mM Cd(II) bzw. Zn(II) nur in der Zn(II)-haltigen Kultur eine Biosorption nachweisbar war; die Akkumulation von Zn(II) war um 1650,0 % höher als die Cd(II)-Akkumulation. Bei einer Konzentration von 0,5 mM Cd(II) und 10 mM Zn(II) war das Wachstum von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 im Vergleich zur Kontrolle um ca. 20 % reduziert (s. Kap. 3.1.3) und die Biosorption und Akkumulation von Zn(II) waren um 327,0 bzw. 3450,0 % höher als die von Cd(II).

3.3 GSH- und GTSH-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unter Schwermetallbelastung

3.3.1 GSH- und GTSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unter Cd(II)- oder Zn(II)-Belastung

In Abbildung 11 ist der GSH- und GTSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Cd(II) und Zn(II)-haltiger Kultur dargestellt (s. Anhang B, Tab. 13 u. 14). Die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.8.8 beschrieben.

Der GSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 nahm im Vergleich zur Kontrolle bei einer Cd(II)-Konzentration von 1 mM signifikant zu und war mit einem Gehalt von $9,9 \pm 0,6$ nmol GSH mg^{-1} TG um 182,8 % höher als der der Kontrolle (Abb. 11).

Der GTSH-Gehalt nahm ab 0,5 mM Cd(II) signifikant zu. Bei 1 mM Cd(II) lag mit $33,6 \pm 2,3$ nmol GSH-Äquivalenten mg^{-1} TG ein um 220,0 % höherer Gehalt als in der Kontrolle vor.

Bei Erhöhung der Konzentration von 0,5 mM auf 1 mM Cd(II) kam es zu einer 1150,0 % höheren Akkumulation (s. Kap. 3.2.2) und einem 115,2 bzw. 162,5 %-igem Anstieg des GSH- bzw. GTSH-Gehaltes. Die GSH- und GTSH-Gehalte korrelierten mit der Akkumulation von Cd(II) ($r = 0,98$ bzw. $0,99$).

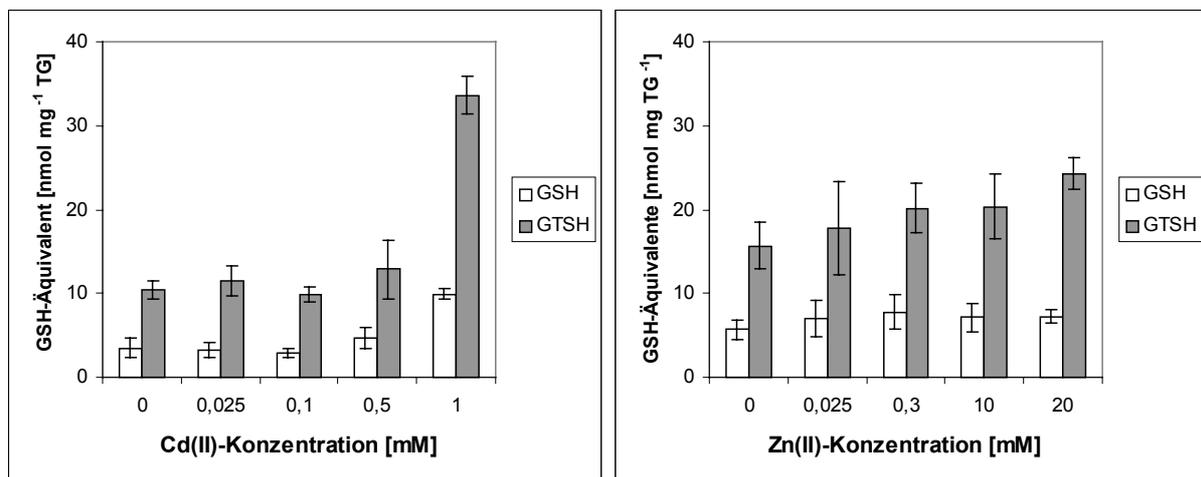


Abb. 11 GSH- und GTSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Abhängigkeit von der Cd(II)- bzw. Zn(II)-Konzentration im Medium. SM-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je $n = 3$.

Der GSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 bei 0,025 mM Zn(II) war mit $6,9 \pm 2,2$ nmol GSH mg^{-1} TG um 21,0 % höher als der der Kontrolle. Ein maximaler GSH-Gehalt von $7,8 \pm 2,0$ nmol GSH mg^{-1} TG und somit ein 36,8 % höherer Gehalt als in der Kontrolle lag bei 0,3 mM Zn(II) vor; er nahm bis 20 mM Zn(II) signifikant ab und erreichte einen Gehalt von $7,2 \pm 0,8$ nmol GSH mg^{-1} TG.

Der GTSH-Gehalt war bei 0,025 mM Zn(II) ($17,8 \pm 5,6$ nmol GSH-Äquivalente mg^{-1} TG) um 13,4 % höher als der GTSH-Gehalt der Kontrolle. Bis zu einer Zn(II)-Konzentration von 20 mM nahm der GTSH-Gehalt signifikant zu und betrug dann $24,3 \pm 1,9$ nmol GSH-Äquivalente mg^{-1} TG.

Die GSH- bzw. GTSH-Gehalte korrelierten nicht mit der Akkumulation von Zn(II).

3.3.2 GSH- und GTSH-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Um Aussagen zur Veränderung des GSH- und GTSH-Gehaltes unter Cd(II)-Stress während der Kultivierung der *H. lugdunensis*-Stämme machen zu können, wurden in einem Zeitraum von 3-12 Tagen die GSH- und GTSH-Gehalte im Myzel bestimmt (Abb. 12, Anhang B, Tab. 15-18). Die Kultivierung der Pilze erfolgte gemäß Kapitel 2.8.8. Zum Zeitpunkt der Inokulation wurde 0,05 mM Cd(II) appliziert und der GSH- und GTSH-Gehalt, wie in Kapitel 2.8.2 und 2.8.3 beschrieben, bestimmt.

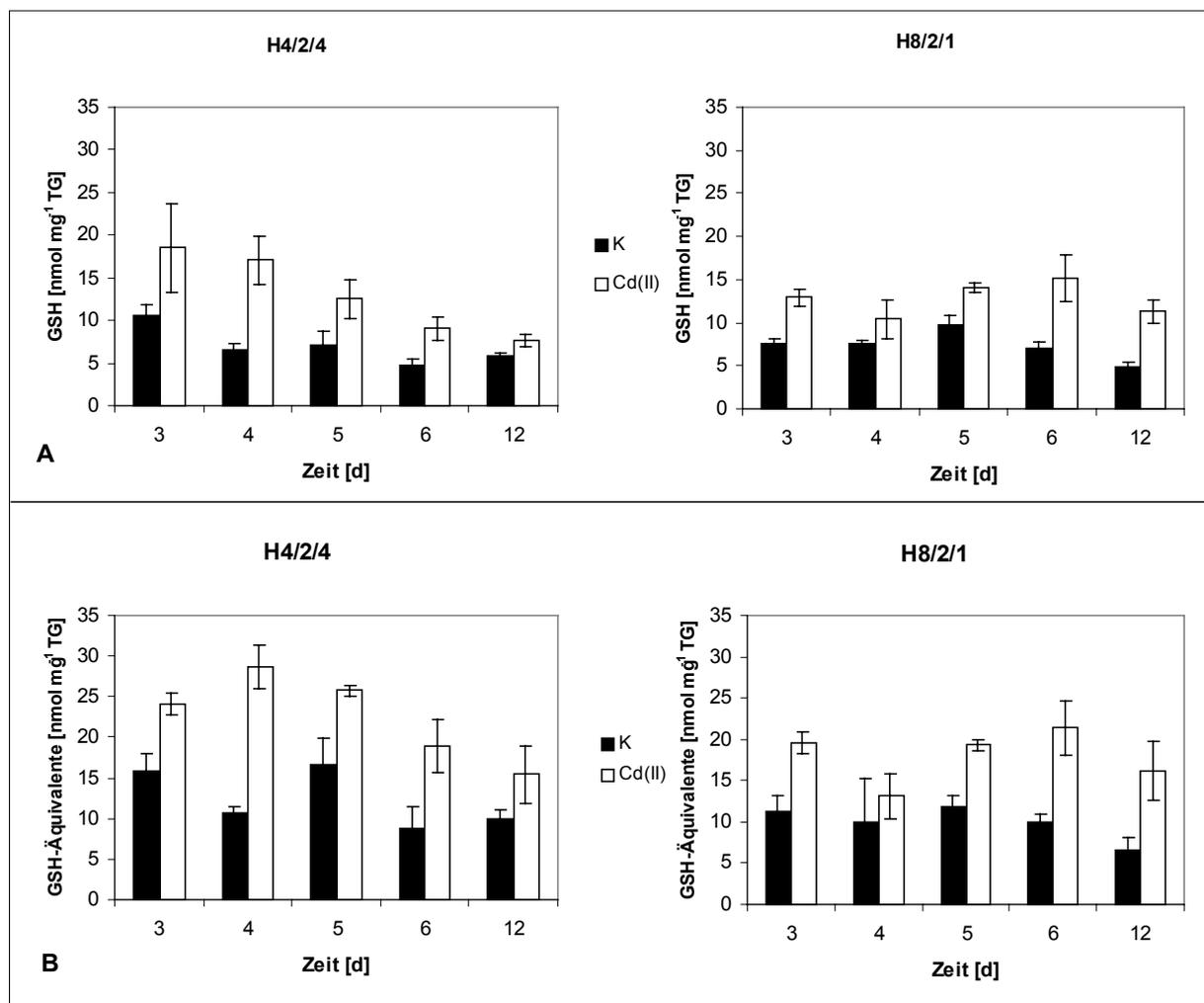


Abb. 12 GSH (A)- und GTSH (B)-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in unbelasteter und Cd(II)-haltiger (0,05 mM) Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

Stamm H4/2/4 erreichte in dem untersuchten Zeitraum von 3-12 Tagen sowohl in der unbelasteten als auch in der Cd(II)-haltigen Kultur am 3. Tag einen maximalen GSH-Gehalt; im Vergleich zur Kontrolle ($10,5 \pm 1,4$ nmol GSH mg^{-1} TG) war der GSH-Gehalt der belasteten Kultur ($18,5 \pm 5,3$ nmol GSH mg^{-1} TG) um 76,2 % erhöht (Abb. 12). Der GSH-Gehalt der Kontrolle sank bis zum 4. Kultivierungstag um 38,1 % ($6,5 \pm 0,7$ nmol GSH mg^{-1} TG) und erreichte nach 12tägiger Kultivierung einen Wert von $5,8 \pm 0,5$ nmol GSH mg^{-1} TG. Der GSH-Gehalt der Cd(II)-haltigen Kultur nahm bis zum 12. Tag um 41,1 % ab ($7,6 \pm 0,7$ nmol GSH mg^{-1} TG) und war nur noch um 31,0 % höher als der GSH-Gehalt der Kontrollkultur.

Bezüglich des GTSH-Gehaltes lag nach 4tägiger Kultivierung von H4/2/4 unter Cd(II)-Belastung ein maximaler GTSH-Gehalt ($28,6 \pm 2,7$ nmol GSH-Äquivalente mg^{-1} TG) vor, der 164,8 % höher war als der GTSH-Gehalt der Kontrolle ($10,8 \pm 0,6$ nmol GSH-Äquivalente mg^{-1} TG) (Abb. 12). Mit zunehmender Kulturdauer sank der GTSH-Gehalt unter Cd(II)-Belastung signifikant und betrug am 12. Tag mit $15,4 \pm 3,5$ nmol GSH-Äquivalenten mg^{-1} TG nur noch 53,8 % des maximalen Gehaltes. Der GTSH-Gehalt der Kontrolle nahm nur bis zum 6. Tag signifikant ab und blieb dann nahezu konstant.

Der Stamm H8/2/1 hatte unter Cd(II)-Belastung am 6. Tag einen maximalen GSH-Gehalt von $15,2 \pm 2,6$ nmol GSH mg^{-1} TG; er sank dann bis zum 12. Tag um 25,6 % (Abb. 12). Die unbelastete Kultur erreichte hingegen am 5. Tag ihren maximalen GSH-Gehalt mit $9,8 \pm 1,1$ nmol GSH mg^{-1} TG, der bis zum 12. Tag um 50,0 % abnahm.

Der GTSH-Gehalt der Cd(II)-haltigen Kultur erreichte am 6. Tag mit $21,4 \pm 3,2$ nmol GSH-Äquivalenten mg^{-1} TG ein Maximum und nahm bis zum 12. Tag um 24,3 % ab. Der GTSH-Gehalt der Kontrolle schwankte bis zum 6. Tag zwischen 10-11,9 nmol GSH-Äquivalenten mg^{-1} TG und nahm vom 6. bis zum 12. Tag um 33,0 % ab. Die belastete Kultur hatte nach 12tägiger Kultivierung einen 130,6 bzw. 141,8 % höheren GSH- bzw. GTSH-Gehalt als die Kontrolle.

In Tabelle 8 ist der Zeitpunkt der maximalen GSH- und GTSH-Gehalte unter Cd(II)-Belastung (0,05 mM) dargestellt, sowie deren prozentuale Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle.

Tab. 8 Zeitpunkt [d] der maximalen GSH- und GTSH-Gehalte unter Cd(II)-Belastung und deren prozentuale Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle.

	H4/2/4		H8/2/1	
	Kulturdauer	Erhöhung	Kulturdauer	Erhöhung
GSH	3	76,2	6	117,1
GTSH	4	164,8	6	114,0

Vergleichend zeigt sich, dass der maximale GSH- und GTSH-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in der Cd(II)-haltigen Kultur im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 164,8 bzw. 117,1 % erhöht waren. Während der GSH- und GTSH-Gehalt der Cd(II)-haltigen Kultivierung von Stamm H4/2/4 schon ab dem 3. bzw. 4. Tag sanken, wies Stamm H8/2/1 erst zwischen dem 6. und 12. Kulturtag eine Abnahme des GSH- und GTSH-Gehaltes auf. Am 3. Kulturtag war der GSH-Gehalt von Stamm H4/2/4 um 43,4 % höher als von Stamm H8/2/1 (Abb. 12). Der GTSH-Gehalt war bis zum 5. Tag in Stamm H4/2/4 höher als in Stamm H8/2/1 (5. Tag: 33,7 %); bis zum 12. Tag nahm in beiden Stämmen der GTSH-Gehalt ab und beide GTSH-Gehalte unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

3.3.3 GSH- und GTSH-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration

Die Abhängigkeit der GSH- und GTSH-Gehalte der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 von der Cd(II)-Konzentration im Medium ist in Abbildung 13 (s. Anhang B, Tab. 19/20) dargestellt. Die Pilze wurden, wie in Kapitel 2.8.8 beschrieben, zum Zeitpunkt der Inokulation mit Cd(II) belastet und 5 Tage kultiviert.

In Stamm H4/2/4 nahmen sowohl der GSH- als auch der GTSH-Gehalt ab einer Cd(II)-Konzentration von 0,0125 mM im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu (Abb. 13). Der GSH- bzw. GTSH-Gehalt korrelierte sowohl mit der Cd(II)-Konzentration im Medium ($r = 0,91$ bzw. $0,95$) als auch mit der intrazellulär vorliegenden Cd(II)-Konzentration ($r = 0,95$ bzw. $0,99$) (s. Kap. 3.2.1). Bei einer Konzentration von 0,1 mM Cd(II) betrug die GSH- bzw. GTSH-Gehalte $17,9 \pm 4,1$ bzw. $38,1 \pm 9,1$ nmol GSH Äquivalente mg^{-1} TG und waren im Vergleich zur Kontrolle um 120,9 bzw. 128,1 % höher.

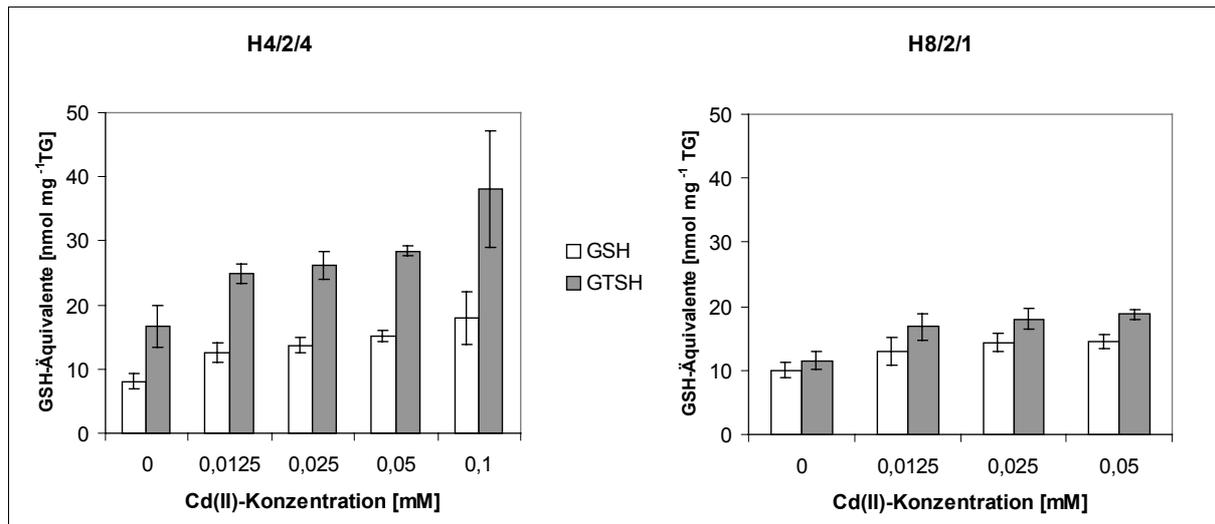


Abb. 13 GSH- und GTSH-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration im Medium. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je n = 3, 0= Kontrolle.

In Stamm H8/2/1 kam es ebenfalls bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,0125 mM zu einem signifikanten Anstieg der GSH- und GTSH-Gehalte, jedoch korrelierte der GSH- bzw. GTSH-Gehalt nicht mit der Cd(II)-Konzentration im Medium ($r = 0,84$ bzw. $0,83$) (Abb. 13). Stamm H8/2/1 wuchs nur bis zu einer Cd(II)-Konzentration von 0,05 mM. Bei dieser Cd(II)-Konzentration lag ein GSH- bzw. GTSH-Gehalt von $14,6 \pm 1,1$ bzw. $18,7 \pm 0,7$ nmol GSH Äquivalente mg^{-1} TG vor. Das war um 46,0 bzw. 61,2 % höher als der GSH- bzw. GTSH-Gehalt der Kontrolle.

Im Vergleich der beiden Stämme war der GSH-Gehalt in Stamm H4/2/4 und Stamm H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung nahezu gleich, wohingegen der GSH-Gehalt der Kontrolle von Stamm H8/2/1 um 23,4 % höher war als der von Stamm H4/2/4. Der GTSH-Gehalt von Stamm H4/2/4 war sowohl unter unbelasteten Bedingungen als auch mit steigender Cd(II)-Konzentration um ungefähr 45 % höher als der von Stamm H8/2/1.

3.3.4 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des GSH- und GTSH-Gehaltes der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der log-Phase

Abbildung 14 zeigt die konzentrations- und zeitabhängige Bildung von GSH und GTSH nachdem 0,1 bzw. 0,5 mM Cd(II) während der log-Phase (t_3) der wachsenden Kultur von Stamm H4/2/4 und H8/2/1 appliziert wurde (s. Anhang B, Tab. 21-24). Es werden nur die Kulturtage nach der Belastung angegeben.

Nach eintägiger Cd(II)-Belastung von H4/2/4 betrug der GSH-Gehalt bei 0,1 bzw. 0,5 mM Cd(II) $20,9 \pm 1,2$ bzw. $28,8 \pm 5,8$ nmol GSH mg^{-1} TG. Im Vergleich zur Kontrolle lag bei 0,1 bzw. 0,5 mM Cd(II) ein um 216,6 % bzw. 336,4 % höherer GSH-Gehalt vor. Der GSH-Gehalt der Cd(II)-belasteten Myzelien nahm im weiteren Verlauf der Kultivierung signifikant ab. Nach 9tägiger Belastung lag der GSH-Gehalt für 0,1 mM bzw. 0,5 mM Cd(II) bei $7,4 \pm 0,7$ bzw. $9,8 \pm 1,6$ nmol GSH mg^{-1} TG. Er wies damit nur noch bei einer Cd(II)-Belastung von 0,5 mM einen signifikant höheren Wert (um 50,8 %) als die Kontrolle auf. Der GSH-Gehalt der Kontrolle von Stamm H4/2/4 schwankte um einen durchschnittlichen Wert von $5,6$ nmol GSH mg^{-1} TG.

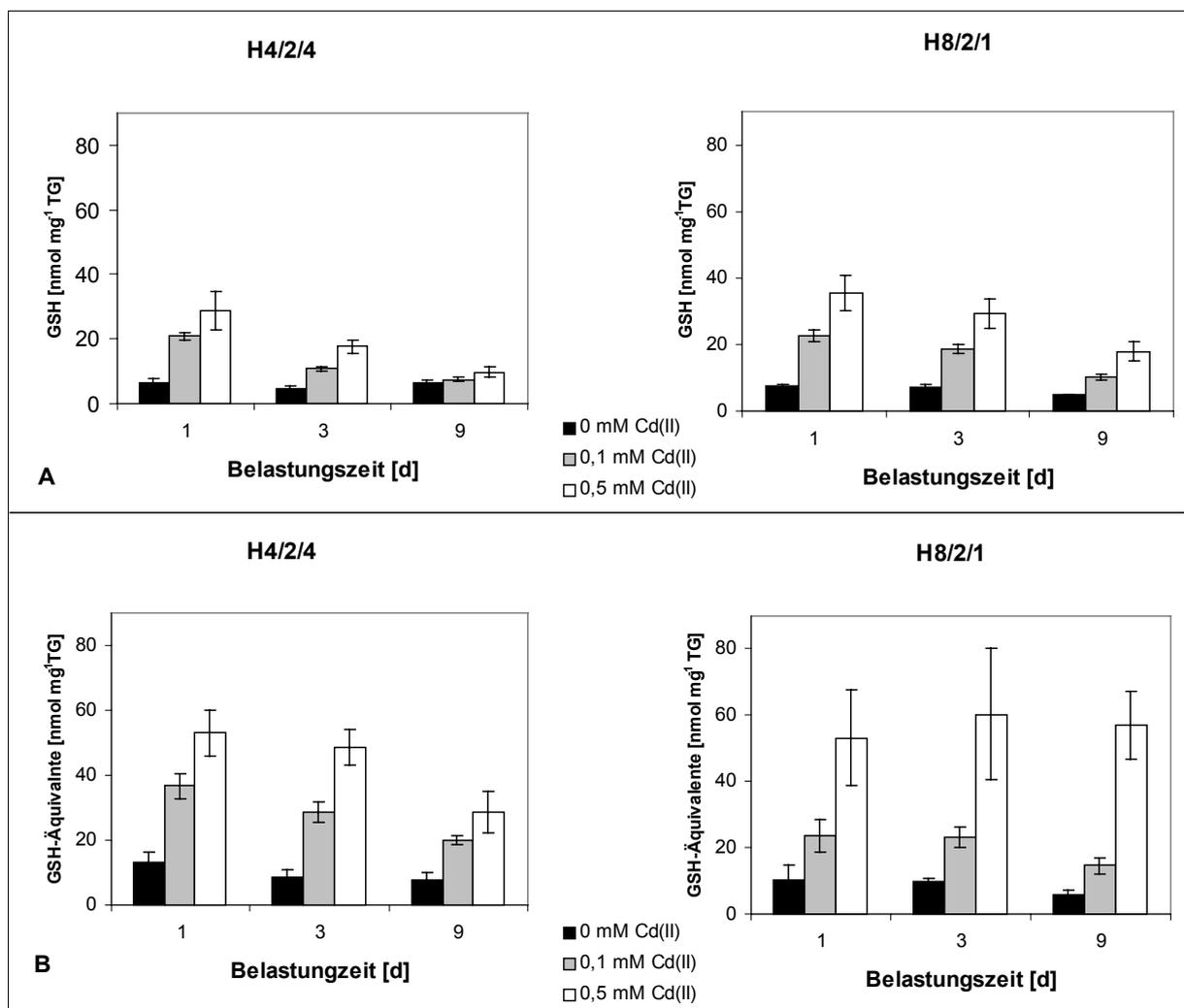


Abb. 14 GSH (A)- und GSH-Äquivalente (B)-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3d). 14° C, 120 rpm, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je n = 3, 0= Kontrolle.

Nach eintägiger Cd(II)-Belastung von Stamm H4/2/4 war ein maximaler GTSH-Gehalt erreicht, der im Vergleich zur Kontrolle bei 0,1 mM Cd(II) um 180,1 % und bei 0,5 mM Cd(II) um 304,6 % erhöht war (Abb. 14). Der GTSH-Gehalt der unbelasteten und belasteten Kulturen sank bis zum 9. Belastungstag signifikant.

Der GSH-Gehalt von Stamm H8/2/1 nahm mit steigender Cd(II)-Konzentration signifikant zu (Abb. 14). Ein Maximum des GSH-Gehaltes wurde nach eintägiger Cd(II)-Belastung mit Werten von $22,4 \pm 1,8$ (0,1 mM Cd(II)) und $35,3 \pm 5,3$ (0,5 mM Cd(II)) nmol GSH mg⁻¹ TG erreicht. Somit war der GSH-Gehalt bei einer Belastung von 0,1 mM bzw. 0,5 mM um 194,7 bzw. 364,5 % höher als der GSH-Gehalt der Kontrolle ($7,6 \pm 0,3$ nmol GSH mg⁻¹ TG). Sowohl in der unbelasteten als auch in der belasteten Kultur sank der GSH-Gehalt innerhalb von 9 Tagen signifikant ab.

Der GTSH-Gehalt von Stamm H8/2/1 nahm mit steigender Cd(II)-Konzentration zu. Nach eintägiger Cd(II)-Belastung betrug der GTSH-Gehalt bei 0,1 bzw. 0,5 mM Cd(II) $23,7 \pm 5$ bzw. $53,2 \pm 14,4$ nmol GSH Äquivalente mg⁻¹ TG und war um 130,1 % bzw. 416,5 % höher als der GTSH-Gehalt der Kontrolle ($10,3 \pm 4,3$ nmol GSH Äquivalente mg⁻¹ TG). Der GTSH-Gehalt der Kontrolle und der mit 0,1 mM Cd(II) belasteten Kultur sank bis zum 9. Tag signifikant, wohingegen keine signifikante Abnahme in der Kultur mit einer Cd(II)-Belastung von 0,5 mM zu beobachten war.

In Tabelle 9 ist die prozentuale Erhöhung der maximalen GSH- und GTSH-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Ein maximaler GSH- und GTSH-Gehalt wurde nach eintägiger Cd(II)-Belastung erreicht; ein Ausnahme bildet der GTSH-Gehalt von Stamm H8/2/1 bei 0,5 mM Cd(II) (Maximum: 3. Tag).

Tab. 9 Prozentuale Erhöhung des maximalen GSH- und GTSH-Gehaltes unter Cd(II)-Belastung im Vergleich zur Kontrolle.

	H4/2/4		H8/2/1	
	0,1 mM Cd(II)	0,5 mM Cd(II)	0,1 mM Cd(II)	0,5 mM Cd(II)
GSH	216,6	336,4	194,7	364,5
GTSH	180,1	304,6	130,1	521,6

Die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme des GSH- und GTSH-Gehaltes unter Cd(II)-Belastung. In Stamm H8/2/1 lag ein höherer GSH-Gehalt vor als in Stamm H4/2/4. In beiden Stämmen nahm der GSH-Gehalt jedoch innerhalb der 9tägigen Kultivierung unter Cd(II)-Belastung signifikant ab. Mit

Ausnahme des GTSH-Gehaltes von H8/2/1 bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,5 mM, nahm der GTSH-Gehalt in beiden Stämmen in Abhängigkeit von der Kulturdauer unter Cd(II)-Belastung ab.

3.4 Induktion von PC₂ und MT's in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 durch Cd(II)

3.4.1 Nachweis thiolhaltiger Verbindungen unter Cd(II)-Einfluss

Nach Kultivierung der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Cd(II)-haltiger Kultur konnten im Myzel 4 Ellman-positive Verbindungen nachgewiesen werden. Im HPLC-Chromatogramm waren vier deutliche Peaks bei einer Retentionszeit von 4, 8, 18 und 20 Min zu sehen. In Abbildung 15 ist ein typisches HPLC-Elutionsprofil dargestellt.

Die HPLC-Profile beider *H. lugdunensis*-Stämme ergaben unter Cd(II)-Belastung ähnliche Peakmuster.

Die Identifizierung der HPLC-Peaks erfolgte mittels Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MSn) und MALDI-PSD. Es wurden die HPLC-Peaks mit t_R 4, 8, 18 von Stamm H8/2/1 und mit t_R 20 von Stamm H4/2/4 fraktioniert und analysiert.

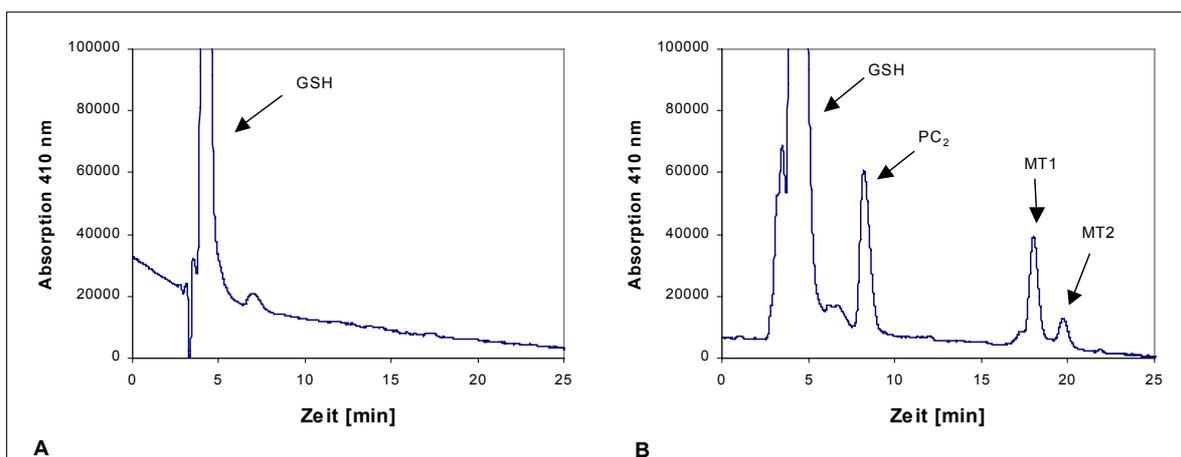


Abb. 15 HPLC-Chromatogramm Ellman-positiver Verbindungen in *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 der Kontrolle (A) und bei Cd(II)-Applikation (0,1 mM) in der log-Phase (t_3) und anschließender 3tägiger Kultivierung (B).

3.4.2 Identifizierung von thiolhaltigen Verbindungen mittels Massenspektrometrie und Aminosäure-Sequenzierung

3.4.2.1 Nachweis eines gemischten Disulfids aus GSH und γ -Glutamylcystein in *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1

In der Fraktion des HPLC-Peaks mit der Retentionszeit von 4 min (in Abb. 15 als GSH Peak bezeichnet) konnte nicht nur GSH (s. Anhang A, Abb. 1) nachgewiesen werden, sondern es wurde auch ein Molekülpeak von m/z 556 detektiert und mit ESI-MS/MS sequenziert (Abb. 16).

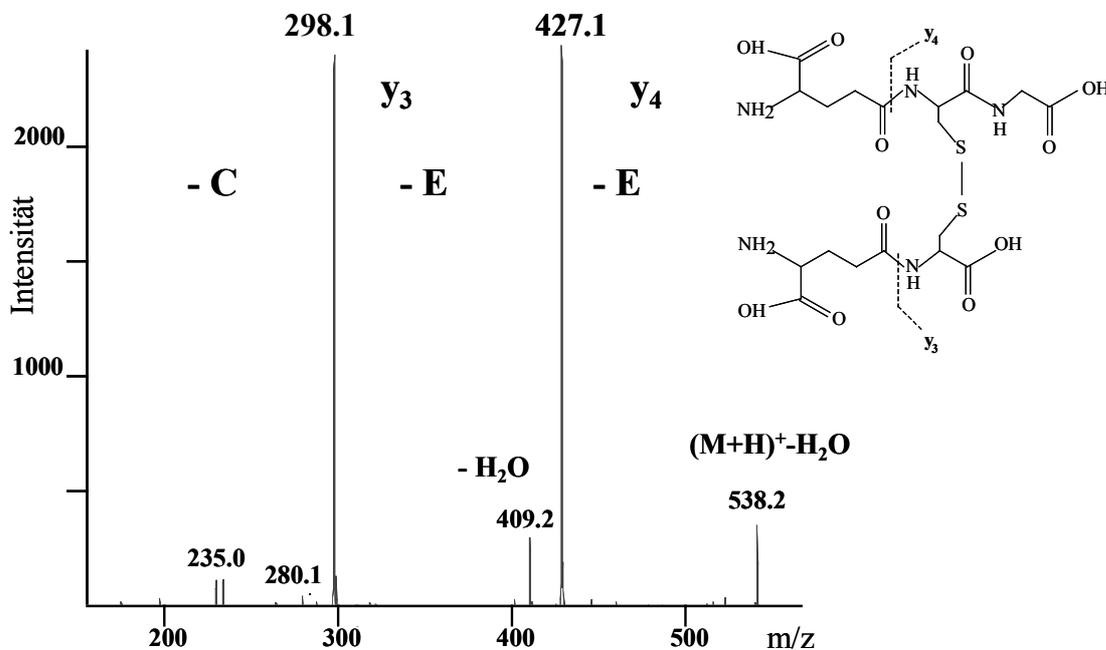


Abb. 16 ESI-MS/MS Spektrum des Molekülpeaks mit m/z 556.

Das Peptid besteht aus ECG und EC, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

3.4.2.2 Nachweis von PC₂

Die Analyse der Fraktion mit t_R 8 mittels Massenspektrometrie ergab einen Molekülpeak mit m/z 540, der in der Literatur für PC₂ [M + H]⁺ bekannt ist (KNEER et al., 1992). Um die Struktur und die Aminosäuresequenz der unbekanntes Ellman-positiven Substanz zu erhalten, wurde das Tandem-Massenspektrum von m/z 540 aufgenommen. Wie in Abbildung 17 zu sehen, zeigt das MS-MS m/z -Werte, die dem Fragmentierungsmuster des rechts oben

dargestellten PC₂ entsprechen. Vom C-Terminus werden die Fragmente y₂ = 179, y₃ = 308,1 y₄ = 411,2 und vom N-Terminus die Fragmente B₂ = 233, B₃ = 363, B₄ = 465,1 gebildet. Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte nach ROEPSTORFF und FOHLMAN (1984).

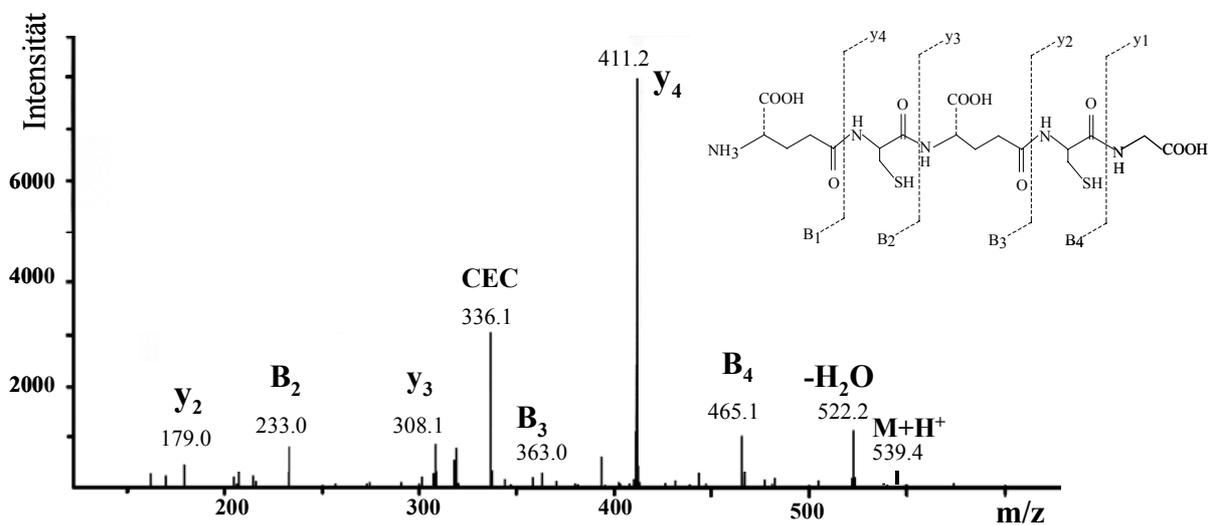


Abb. 17 ESI-MS/MS Spektrum des Molekülpeaks m/z 540 von PC₂. Das Fragmentationsmuster ist oben rechts dargestellt.

Die Substanz mit einer Retentionszeit von 8 min (s. Abb. 15, Kap. 3.4.1) hat einen m/z -Wert von 540 und besteht aus Glutamat (E), Cystein (C) und Glycin (G) in einem Verhältnis von 2:2:1. Peptide dieser Struktur sind in der Literatur bereits als Phytochelatine beschrieben worden (GRILL et al., 1985). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit in *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 die Bildung von Phytochelatin unter Cd(II)-Belastung nachgewiesen werden. Da es sich aus zwei γ -EC-Einheiten zusammensetzt, wird es PC₂ genannt. Phytochelatine werden nach KÄGI und BINZ (1999) der Familie 99 der Metallothioneine zugeordnet.

3.4.2.3 Nachweis von Metallothioneinen

Den HPLC-Peaks t_R 18 und 20 konnten mittels Massenspektrometrie niedermolekulare Proteine mit einem m/z -Wert von 2330 und 2475 zugeordnet werden. Diese Proteine wurden mit ESI-MSⁿ und MALDI-PSD vom C-terminalen Ende sequenziert (Kap. 2.8.6, s. Anhang A, Abb. 2 u. 3). Die N-terminalen Aminosäuren wurden durch Edman-Sequenzierung bestimmt (Kap. 2.8.7). Es ergab sich folgende Aminosäuresequenz (SCHIERHORN et al., 2001):

MT1_HL: SPCTCSTCNCAGACNSCSCTSCSH M_r: 2330

MT2_HL: MSPCTCSTCNCAGACNTCSCTSCSH M_r: 2475

Diese Proteine wurden als Metallothioneine identifiziert und da sie in *H. lugdunensis* (MT1: Stamm H8/2/1, MT2: Stamm H4/2/4) vorkommen als MT1_HL und MT2_HL bezeichnet. MT1_HL setzt sich aus 24 Aminosäuren zusammen, MT2_HL enthält eine zusätzliche Aminosäure, das Methionin. Außerdem kam es zu einem Austausch des 4. carboxyterminalen Serins durch Threonin.

Die Proteine haben ein niedriges Molekulargewicht (MT1_HL: 2330, MT2_HL: 2475), bestehen aus 7 bzw. 8 verschiedenen Aminosäuren, zeichnen sich durch einen hohen Cysteingehalt (8 Cysteine entsprechen 32 bzw. 33 %) aus und enthalten 6-7 Serinreste (20 bzw. 25 %). Die 4 Cysteine in der C-terminalen Domäne sind in einem Muster Cys-Xaa-Xaa-Cys angeordnet. Im N-terminalen Bereich ergeben 4 Cysteine ein Cys-Xaa-Cys Muster. Die beiden Domänen werden durch 3 Aminosäuren miteinander verbunden.

Nicht angesäuerte Myzelextrakte wurden mittels Gelfiltration fraktioniert und anschließend ein MALDI-PSD Spektrum der Fraktion III aufgenommen (s. Anhang B, Abb. 4), um eine mögliche Bindung von Cd(II) an MT1_HL aufzuzeigen. In Abbildung 18 ist das MALDI-PSD Spektrum von MT1_HL eines ungesäuerten Pilzextraktes zu sehen. Der Molekülpeak m/z 2321,5 weist MT1_HL nach, wobei die Cysteine Disulfidbrücken ausbilden. y₇ und y₁₄ sind Fragmente von MT1_HL. Im Spektrum sind zusätzlich Proteinkomplexe mit einem (m/z 2432,48) bzw. 2 (m/z 2543,9) Cd(II) detektierbar.

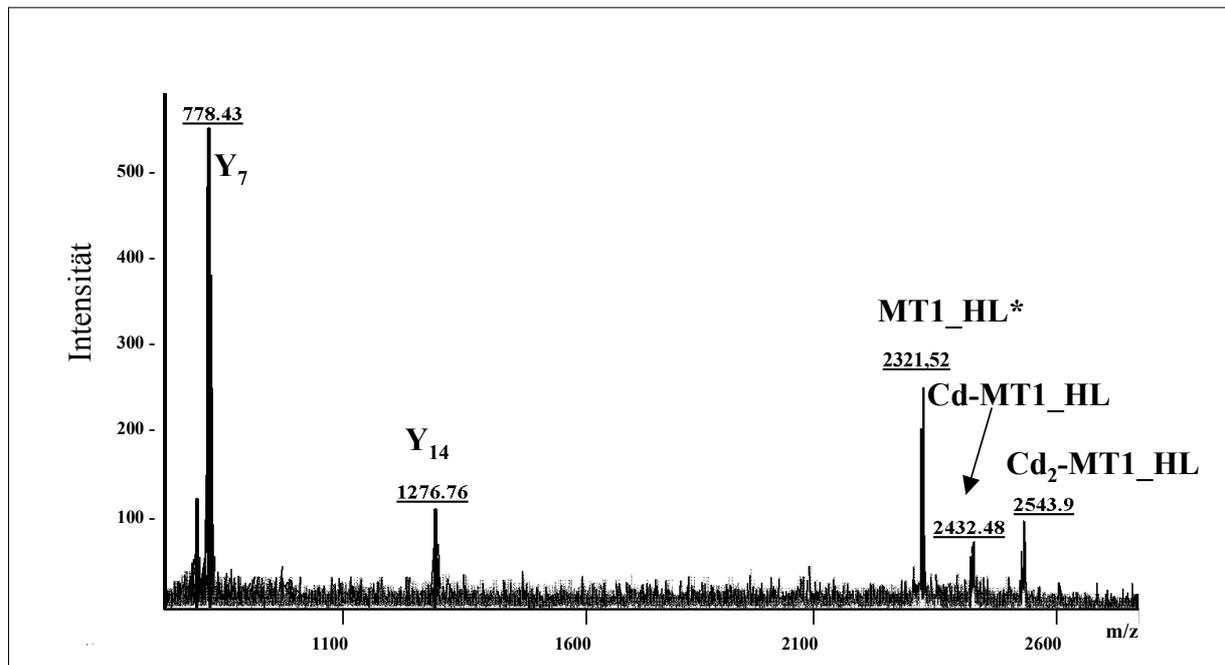


Abb. 18 MALDI-PSD Spektren nach Fraktionierung des MT1_HL-Peaks mittels Gelfiltration. Der Pilzextrakt wurde nicht angesäuert, um den Protein-Cd(II) Komplex zu erhalten. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 5 d, 14 °C. * Cysteine bilden Disulfidbrücken.

Es war bislang nur möglich die Fraktionen mit der t_R 8 (PC₂) und t_R 18 (MT1_HL) von Stamm H8/2/1 und die Fraktion mit der t_R 20 (MT2_HL) von Stamm H4/2/4 mittels MS zu untersuchen. Die Peaks der HPLC-Chromatogramme beider Stämme zeigten jedoch gleiche Retentionszeiten, so dass der Retentionszeit von 8 und 18 min von Stamm H4/2/4 PC₂ und MT1_HL und der Retentionszeit von 20 min von Stamm H8/2/1 MT2_HL zugeordnet wurde. Die Bildung von PC₂ und MT1_HL wird in den folgenden Kapiteln dargestellt, auf die Darstellung der MT2_HL-Bildung wird hingegen verzichtet, da dieses Protein nur in Spuren vorkam. Bis auf wenige Ausnahmen war MT2_HL bei jeder Messung nachweisbar und es konnten keine stammesspezifischen Unterschiede in der Bildung nachgewiesen werden.

3.4.3 Bildung von PC₂ und MT1_HL in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Die Kultur der *H. lugdunensis*-Stämme wurde zum Zeitpunkt der Inokulation mit einer Cd(II)-Konzentration von 0,05 mM belastet (s. Kap. 2.8.8). Die Bildung von PC₂ und MT1_HL wurde, wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben, bestimmt und ist in Abbildung 19 dargestellt (s. Anhang B, Tab. 25 u. 26).

In Stamm H4/2/4 wurde nach 4 Tagen PC₂ (48882 ± 4854 Area mg⁻¹ TG) gebildet. Während der darauffolgenden 8tägigen Kultivierung nahm der Gehalt an PC₂ signifikant ab und betrug nach insgesamt 12 Tagen nur noch 62,9 % des Wertes vom 4. Tag.

Die Bildung von MT1_HL war nach 3 Tagen nachweisbar; sie nahm bis zum 4. Tag signifikant zu und erreichte einen MT1_HL-Gehalt von 1316875 ± 685129 Area mg⁻¹ TG (Abb. 19). Innerhalb der folgenden 8tägigen Kultivierung sank der MT1_HL-Gehalt signifikant ab und betrug am Ende nur noch 14,5 % des Gehaltes vom 4. Tag.

Stamm H8/2/1 bildete kein PC₂ (Abb. 19). Es kam zur Bildung von MT1_HL, dessen Gehalt nach 3tägiger Kultivierung 859453 ± 88425 Area mg⁻¹ TG betrug und sich im Verlauf der Kultivierung nicht signifikant veränderte.

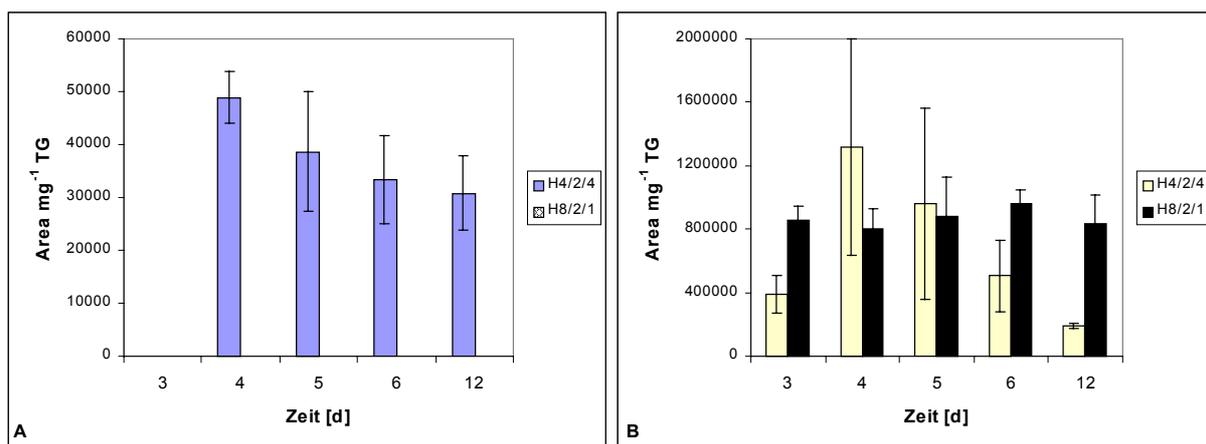


Abb. 19 Bildung von PC₂ (A) und MT1_HL (B) durch die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer (0,05 mM Cd(II)). 14 °C, 120 rpm, Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

In Gegensatz zu Stamm H4/2/4 bildete H8/2/1 unter diesen Kulturbedingungen kein PC₂. Der MT1_HL-Gehalt von Stamm H8/2/1 war nach 4tägiger Kultivierung um 38,9 % geringer als der von Stamm H4/2/4. In Stamm H8/2/1 kam es jedoch nicht zu einer Abnahme des Gehaltes von MT1_HL, so dass nach 12tägiger Kultivierung der MT1_HL-Gehalt von Stamm H8/2/1 um 338,9 % höher war als der von Stamm H4/2/4.

3.4.4 Bildung von PC₂ und MT1_HL in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration

Abbildung 20 zeigt die Abhängigkeit der PC₂- und MT1_HL-Bildung in Stamm H4/2/4 und H8/2/1 von der Cd(II)-Konzentration im Medium (s. Anhang B, Tab. 27 u. 28). Cd(II) wurde zum Zeitpunkt der Inokulation appliziert, die Kultivierung und die Bestimmung der thiolhaltigen Verbindungen erfolgte, wie in Kapitel 2.8.4 und 2.8.8 beschrieben.

Bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,0125 mM betrug in Stamm H4/2/4 der Gehalt an PC₂ 25979 ± 12595 Area mg⁻¹ TG (Abb. 20). Der Gehalt stieg bis zu einer Cd(II)-Konzentration 0,1 mM um 172,7 % an (70846 ± 40648 Area mg⁻¹ TG).

Auch der Gehalt an MT1_HL stieg mit zunehmender Cd(II)-Konzentration signifikant an und erreichte bei einer Konzentration von 0,1 mM einen MT1_HL-Gehalt von 8573974 ± 4718353 Area mg⁻¹ TG, so dass ein um 2079,3 % höherer MT1_HL-Gehalt vorlag als unter 0,0125 mM Cd(II). Mit steigender Cd(II)-Konzentration im Medium kam es zu einem linearen Anstieg des intrazellulären Cd(II) (s. Kap. 3.2.1). Der PC₂- und der MT1_HL-Gehalt korrelierten mit der ansteigenden intrazellulären Cd(II)-Konzentration (PC₂ $r = 0,95$; MT1_HL $r = 0,99$).

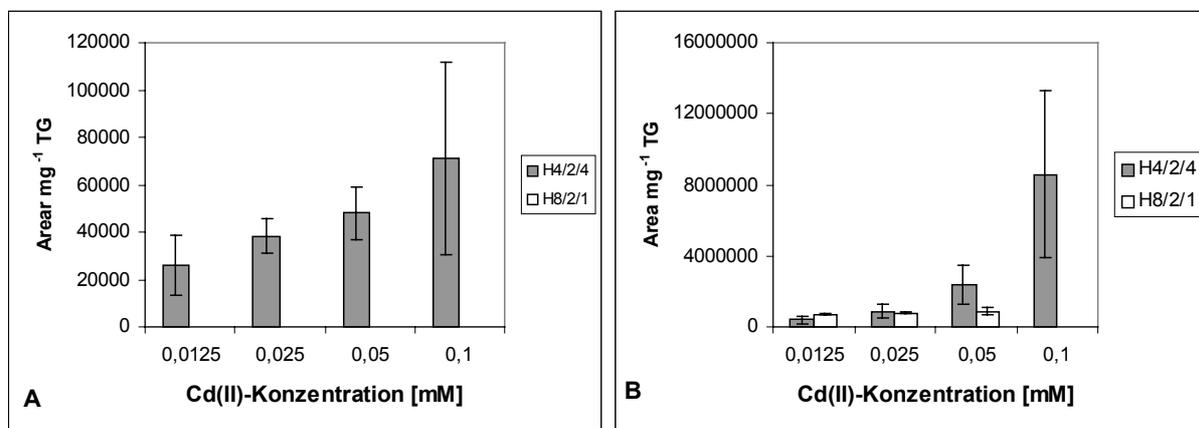


Abb. 20 Gehalt an PC₂ (A) und MT1_HL (B) der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration. 14 °C, 120 rpm, 5 d, Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

Stamm H8/2/1 bildete weder bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,05 mM noch bei geringeren Cd(II)-Konzentrationen PC₂ (Abb. 20). Bei 0,0125 mM Cd(II) lag ein MT1_HL-Gehalt von 717896 ± 76626 Area mg⁻¹ TG vor, der bis zu 0,05 mM Cd(II) signifikant um 23 % anstieg (883539 ± 244671 Area mg⁻¹ TG).

Im Gegensatz zu H8/2/1 bildete H4/2/4 PC₂. Der Gehalt an MT1_HL in beiden Stämmen war erst bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,05 mM signifikant verschieden.

3.4.5 Zeit- und Cd(II)-Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von PC₂ und MT1_HL der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der log-Phase

Abbildung 21 zeigt die Bildung von PC₂ und MT1_HL durch Stamm H4/2/4 und H8/2/1, wenn die Zugabe von Cd(II) nach 3tägiger unbelasteter Kultivierung erfolgte (s. Anhang B, Tab. 29 u. 30). Die Bestimmung der thiolhaltigen Verbindungen und die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.8.4 und 2.8.8 beschrieben. Es werden nur die Tage nach der Cd(II)-Dotierung dargestellt.

Bei Zugabe von 0,1 oder 0,5 mM Cd(II) nach 3tägiger Vor-Kultivierung von Stamm H4/2/4 in unbelastetem Medium stieg die Konzentration von PC₂ signifikant mit zunehmender Cd(II)-Konzentration an. Des weiteren nahm der PC₂-Gehalt vom 1. bis zum 3. Belastungstag (also 4.-6. Kulturtag) signifikant zu, erreichte ein Maximum bei 0,1 mM von 239154 ± 47042 Area mg⁻¹ TG und bei 0,5 mM von 608566 ± 156415 Area mg⁻¹ TG und sank danach signifikant bis zum 9. Tag um 51,3 bzw. 23,8 % (Abb. 21).

Der Gehalt an MT1_HL von H4/2/4 bei 0,1 mM und 0,5 mM Cd(II) unterschied sich nach eintägiger Cd(II)-Belastung nicht signifikant. Nach 3tägiger Belastung war der MT1_HL-Gehalt bei 0,1 mM Cd(II) mit einem Wert von 384332 ± 79903 Area mg⁻¹ TG um 782,4 % angestiegen und veränderte sich im weiteren Verlauf nicht signifikant. Bei 0,5 mM Cd(II) lag nach eintägiger Belastung ein MT1_HL-Gehalt von 47196 ± 17573 Area mg⁻¹ TG vor, der bis zum 3. Tag um 55,0 % anstieg und dann bis zum 9. Tag konstant blieb.

Während Stamm H8/2/1 nach Zugabe von Cd(II) zum Zeitpunkt der Inokulation kein PC₂ bildete (s. Kap. 3.4.3 und 3.4.4), war nach Zugabe von Cd(II) zu einer logarithmisch wachsenden Kultur die Bildung von PC₂ nachweisbar (Abb. 21). Unter 0,1 mM Cd(II) verdoppelte sich der Gehalt an PC₂ vom 1. zum 3. Belastungstag auf 55550 ± 10169 Area mg⁻¹ TG und blieb dann konstant. Bei 0,5 mM Cd(II) betrug der PC₂-Gehalt nach eintägiger Belastung 413150 ± 292768 Area mg⁻¹ TG und war damit um 1737,0 % höher als der PC₂-Gehalt bei 0,1 mM. Im Verlauf der Belastung nahm der PC₂-Gehalt bei 0,5 mM Cd(II) um 284,7 % zu. Nach 9tägiger Belastung war der PC₂-Gehalt um 3662,1 % höher als bei 0,1 mM Cd(II).

Der Gehalt an MT1_HL erreichte bei 0,1 mM Cd(II) nach 3tägiger Belastung sein Maximum mit einem Gehalt von 1068887 ± 197468 Area mg^{-1} TG und war 178,3 % höher als der maximale MT1_HL-Gehalt bei 0,5 mM Cd(II), der nach 9tägiger Belastung vorlag. Während bei 0,1 mM Cd(II) der MT1_HL-Gehalt nach 9 Tagen gesunken war, stieg der MT1_HL-Gehalt bei 0,5 mM Cd(II) ebenfalls bis zum 3. Tag an und veränderte sich bis zum 9. Tag nicht signifikant.

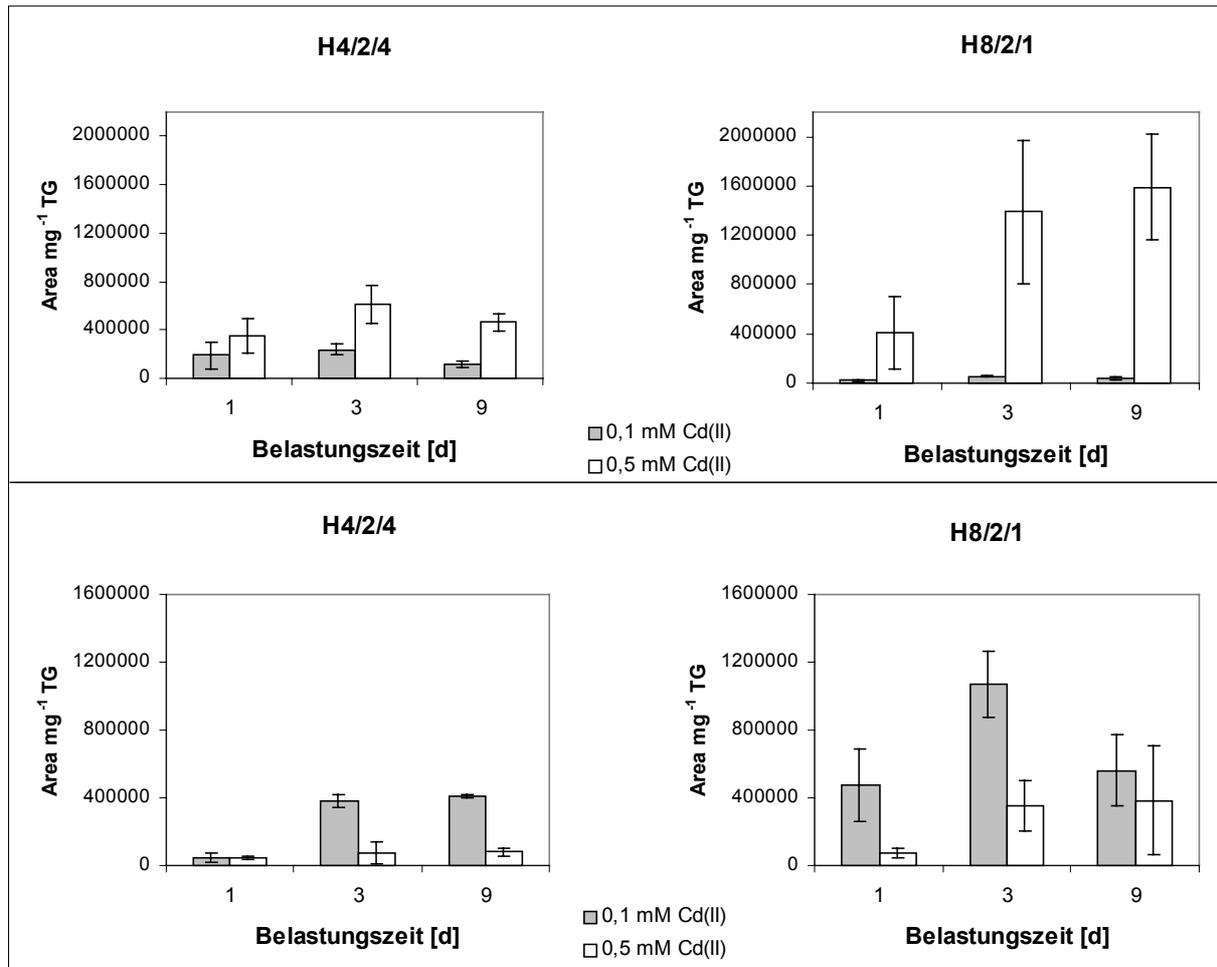


Abb. 21 PC₂ (A)- und MT1_HL (B)-Gehalt der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase. 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte von zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

In beiden *H. lugdunensis*-Stämmen kam es zu einer signifikanten Zunahme des PC₂-Gehaltes und Abnahme des MT1_HL-Gehaltes mit steigender Cd(II)-Konzentration. Bei einer Belastung von 0,1 mM Cd(II) war der maximale PC₂-Gehalt von Stamm H4/2/4 um 330,5 % höher als der von Stamm H8/2/1, bei 0,5 mM Cd(II) war der maximale PC₂-Gehalt hingegen von Stamm H8/2/1 höher (161,2 %). Der MT1_HL-Gehalt von Stamm H8/2/1 war bis zu 178,1 % höher als der von Stamm H4/2/4.

4 Diskussion

4.1 Wachstumsuntersuchungen

4.1.1 Bioverfügbarkeit von Schwermetallen

Die Bioverfügbarkeit und die Wirkung eines Metalls kann durch die Zusammensetzung des Mediums, in dem die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgt, verändert werden. Medien können Substanzen, wie Hefeextrakt, Pepton oder Aminosäuren, enthalten, die Metallionen binden (RAMAMOORTHY und KUSHNER, 1975). Daher kann sich die Toxizität eines Metalls für einen Organismus mit dem Medium ändern (HUGHES und POOLE, 1991). Mit Hilfe von Ionen-selektiven Elektroden zeigten RAMAMOORTHY und KUSHNER (1975), dass Pepton eine geringe bzw. keine Bindungskapazität für Cu(II) bzw. Cd(II) aufweist. So reduzierte z. B. Pepton (0,5 %) im Gegensatz zu Hefeextrakt (0,5 %) die Toxizität von Ni(II) gegenüber *C. glabrata* nicht (BABICH und STOTZKY, 1983).

Die Komplexierung des Metalls kann sich während der Kultivierung ändern, da es zu einem Verbrauch der komplexierenden Substanzen kommen kann (BEVERIDGE et al., 1997).

Auch andere Faktoren beeinflussen die Bioverfügbarkeit eines Metalls. So kann es im Medium bei einem sauren bzw. basischen pH-Wert zur Bildung von Oxiden bzw. Hydroxiden kommen, die ausfallen (HUGHES und POOLE, 1991). Die Toxizität von Cd(II) nahm zudem z. B. für *A. niger* mit steigendem pH-Wert (pH 5-9) zu (BABICH und STOTZKY, 1977). Vermutlich wird das gebildete CdOH^+ von den Zellen leichter aufgenommen als Cd(II) (GADD, 1993). Mit sinkendem pH-Wert kann es zur Abnahme der SM-Toxizität kommen, da die Konkurrenz zwischen den H^+ -Ionen und den Metallionen um freie Bindungsstellen an der Zellwand zunimmt (GADD, 1993).

Phosphate, Chloride, Arsenate und Sulfate können z. B. durch Ausfällung von Metallkationen die Toxizität eines Schwermetalls verringern (HUGHES und POOLE, 1991). Steigende Chlorid-Konzentrationen verringerten in *A. niger* und *Rhizopus stolonifer* vermutlich aufgrund der Bildung von CdCl_2 -Komplexen die Toxizität von Cd(II) (BABICH und STOTZKY, 1982 in COOLINS und STOTZKY, 1989).

Auch Kationen können die Bioverfügbarkeit von Metallen beeinflussen. So verminderte die Anwesenheit von Ca(II) die Toxizität von Cd(II) gegenüber aquatischen Hyphomyceten (ABEL und BÄRLOCHER, 1984).

Mit Hilfe von Modellierungen kann die freie Verfügbarkeit eines Metalls und somit dessen Wirksamkeit berechnet werden. Dies war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

In Tabelle 10 ist die Vielfalt der Kulturbedingungen einiger Schwermetalltoleranz-Studien an Pilzen dargestellt.

Tab. 10 Medien und Kulturbedingungen in Schwermetalltoleranz-Studien.

Autor		Medium	Inokulation/ Cd(II)-Applikation	Kultivierung
MIERSCH et al., 1997	<i>Heliscus lugdunensis</i> <i>Flagellospora curvularia</i> <i>Anguillospora filiformis</i>	0,5 % Malzextrakt 0,1 % Pepton	homog. Agarstückchen/ t ₀	20 °C, 100 rpm, 11 d
GROß, 2000	<i>Heliscus lugdunensis</i>	0,5 % Malzextrakt 0,1 % Pepton	homog. Agarstückchen/ t ₃	14 °C, 120 rpm, 5 d
PIERAU, 1999	<i>Heliscus lugdunensis</i>	0,5 % Malzextrakt 0,1 % Pepton	homog. Agarstückchen/ t ₃ bzw. 4	10 °C, 120 rpm, 8 bzw. 10 d
THRONEBERRY, 1973	<i>Verticillium cf. alboatrum</i>	Czapek-Dox	Conidien	25 °C, 100 rpm, 7 d
RAMA RAO et al., 1997a	<i>Curvularia lunata</i>	2 g Glucose; 0,3 g KH ₂ PO ₄ ; 0,2 g NH ₃ NO ₄ ; 0,1 g Ammonium Tartrat 0,05 g MgSO ₄ *7 H ₂ O; 0,01 g NaCl ₂ ; 0,01 g CaCl ₂ ; 20 µg Zink; 20 µg Mangan; 8 µg Kupfer; 2 µg Eisen; 2 µg Molybden; 0,5 µg Biotin; 100 mL dest. H ₂ O, pH 4,8-5	Conidiosporen 10 ⁷ / t ₀	5 d
RAMA RAO et al., 1997b	<i>Neurospora crassa</i>	s. RAMA RAO et al., 1997a	keine Angaben/ t ₀	28°C, 3 d
LEVINE und MARZLUF, 1989	<i>Neurospora crassa</i>	Fries' Minimal Medium (FMM)	Conidien/ t ₀	30 °C, 200 rpm
MURPHY und LEVI, 1983	<i>Verticillium psalliotae</i>	20 g Malz; 15 g Agar; 1 L H ₂ O (Obflächenkultur)	14 mm Agarstück	25 °C, 21 d

Aufgrund der variierenden Kulturbedingungen und der damit einhergehenden unterschiedlichen Komplexierung der Schwermetalle kann ein Vergleich der Schwermetalltoleranz der unterschiedlichen Pilze nur bedingt erfolgen. Der Einsatz von Standard-Medien, um eine bessere Vergleichbarkeit der Schwermetalltoleranz zu erreichen, ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da Organismen unterschiedliche Nährstoffansprüche haben.

4.1.2 Schwermetalltoleranz-Screening in Oberflächenkultur

Aquatischen Hyphomyceten wurde eine hohe Sensitivität gegenüber Schadstoffen zugesprochen (DIX und WEBSTER, 1995; MALTBY and BOOTH, 1991). Dennoch konnten

aquatische Hyphomyceten aus kontaminierten Gewässern des Mansfelder Landes isoliert werden (KRAUSS, 1998, 2001). In dem hoch kontaminierten Standort H4 (s. Tab. 1) wurden auf natürlich vorkommenden und exponierten Blättern, sowie in Schaum 17 verschiedene Arten aquatischer Hyphomyceten nachgewiesen (SRIDHAR et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden aus Gewässern des Mansfelder Landes isolierte aquatische und terrestrische Hyphomyceten in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur bezüglich ihrer Schwermetalltoleranz untersucht. Für die Stämme H4/2/4 und H8/2/1 des aquatischen Hyphomyceten *H. lugdunensis* wurde eine I_{50} -Konzentration von 0,2 bzw. 0,3 mM Cd(II) und ein Wachstum bis 1 mM Cu(II) und Zn(II) nachgewiesen (Tab. 6). Somit ist ein Wachstum in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur möglich.

ABEL und BÄRLOCHER (1984) wiesen für *H. lugdunensis* eine I_{50} -Konzentration von 0,42 mM Cd(II)-Belastung nach, die um 100 % bzw. 40 % höher war als die von Stamm H4/2/4 bzw. Stamm H8/2/1 der vorliegenden Studie. ABEL und BÄRLOCHER (1984) verwendeten Medien mit nur 0,3 % Malzextrakt, 0,07 % Pepton und Mineralsalzen. Im Vergleich zu der vorliegenden Studie lag das Cd(II) vermutlich unterschiedlich komplexiert vor, was die Toleranz beeinflusst haben könnte. Die Fähigkeit von aquatischen Hyphomyceten in Cd(II)-haltiger Oberflächenkultur (bis 0,9 mM) zu wachsen, konnte jedoch auch in der Studie von ABEL und BÄRLOCHER (1984) gezeigt werden (vergl. Tab. 6). Des weiteren wurde in Untersuchungen von MIERSCH et al. (1997) ein Wachstum aquatischer Hyphomyceten in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur nachgewiesen (I_{50} : 0,15-0,4 mM Cd(II) oder Cu(II)). Es wurden dieselben Medien wie in der vorliegenden Studie eingesetzt.

H. lugdunensis-Stamm H4/2/4 wurde von einem stark kontaminierten Standort, der Zn(II)-Konzentrationen bis zu 39,8 mM aufwies, und *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 von einem gering kontaminierten Gewässer isoliert (Tab. 1). Trotz der hohen Zn(II)-Belastung *in situ*, wurde das Wachstum von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 im Vergleich zur Kontrolle durch 1 mM Zn(II) zu 83,5 % gehemmt und unterschied sich nicht signifikant von der Wachstumshemmung von Stamm H8/2/1 bei 1 mM Zn(II) (Tab. 7).

Insgesamt zeigte sich in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur im Vergleich zu Stamm H8/2/1 keine höhere Schwermetalltoleranz für Stamm H4/2/4. Stamm H8/2/1 wuchs hingegen in Oberflächenkultur unter einer signifikant höheren Cd(II)-Belastung als Stamm H4/2/4 (Tab. 6).

Die in dieser Arbeit aus aquatischen Habitaten (H3, H4) isolierten terrestrischen Pilzstämme von *Phialophora* sp. und *V. cf. alboatrum* hatten I_{50} -Werte von bis zu 10 mM und wuchsen im Vergleich zu den *H. lugdunensis*-Stämmen der vorliegenden Arbeit noch unter bis zu 10fach höheren Schwermetallkonzentrationen (Abb. 5; Anhang B, Tab. 1-4). Demzufolge sind die *Phialophora* sp.-Stämme und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 schwermetalltoleranter als die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1.

In der Literatur ist ebenfalls eine hohe Schwermetalltoleranz von *Phialophora* und *Verticillium* in Oberflächenkultur beschrieben. So wurde das Wachstum von *Phialophora verrucosa*, isoliert von schwermetallkontaminierten Blättern, bis Konzentrationen von 0,02 mM Cd(II), 0,28 mM Cu(II) bzw. 4 mM Zn(II) nicht gehemmt (SMITH, 1977). Eine sehr hohe Zn(II)-Toleranz wies *Verticillium* sp., isoliert aus gering schwermetallkontaminiertem Boden, mit einer 50 %-igen Wachstumshemmung bei 20 mM Zn(II) auf (JORDAN und LECHVALIER, 1975). *V. psalliotae* wuchs noch in 20 mM Cu(II)-haltiger Oberflächenkultur und war somit Cu(II)-toleranter als der in dieser Arbeit getestete Stamm von *V. cf. alboatrum* (MURPHY und LEVI, 1983).

Radiales Koloniewachstum wird zur Einschätzung der Schwermetalltoleranz verwendet, doch Myzelwachstum erfolgt nicht nur auf der Agaroberfläche, sondern auch im Agar und in der Luft (Luftmyzelien). Die scheinbare Stimulation des Wachstums von *Phialophora* sp.-Stamm H3/P/5 bei 0,1 mM Cd(II), sowie die Wachstumsförderung von *Phialophora* sp.-Stamm H4/P/12 von bis zu 122,1 % bei Cu(II)- bzw. Zn(II)-Konzentrationen von 1 bzw. 10 mM könnte eventuell durch die Bildung eines im Vergleich zur Kontrolle „dünnere“, aber wüchsigeren Myzels erklärt werden. Visuell konnte für *Phialophora* sp.-Stamm H4/P/12 im Vergleich zur Kontrolle ein „dünnere“ Myzelwachstum unter Schwermetallbelastung beobachtet werden.

Eine genaue Differenzierung der Pilze als sensitiv, tolerant oder resistent ist bisher nicht eindeutig erfolgt. BABICH und STOTZKY (1977) teilten die von ihnen in Oberflächenkultur getesteten 22 Pilze, Phycomyceten, Ascomyceten, Basidiomyceten und *Fungi imperfecti*, folgendermaßen ein: Pilze, die bis zu einer Konzentration von $10 \mu\text{g Cd(II) mL}^{-1}$ ($\approx 0,09 \text{ mM}$) wuchsen, wurden als **sensitiv**, diejenigen mit Wachstum bis zu $100 \mu\text{g Cd(II) mL}^{-1}$ ($\approx 0,9 \text{ mM}$) als mäßig **resistent** bezeichnet. **Resistente** Pilze wuchsen bis zu Cd(II)-Konzentrationen von $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\approx 9 \text{ mM}$). Nach GADD (1993) kann einem Pilz anhand von Wachstumsversuchen nicht eindeutig Toleranz oder Resistenz zugesprochen werden.

GADD (1993) bezeichnet einen Organismus als **resistent**, wenn eine direkte Reaktion, z. B. Synthese schwermetallbindender Peptide wie Phytochelatin, auf Schwermetallstress erfolgt. Doch da eine Vielzahl von direkten und indirekten Reaktionen, ein Überleben unter Schwermetallstress ermöglicht, ist eine eindeutige Einteilung schwierig zu finden.

4.1.3 Wachstum der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in unbelasteter Flüssigkultur

Die Anzucht der Pilze in Flüssigkultur erfolgte in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (homogene batch-Kultur) (Kap. 2.6.2). Das Wachstum dieser Kultur kann in drei Phasen unterteilt werden: die lag-, die exponentielle und die stationäre Phase. Der stationären Phase folgt die Absterbe-Phase, in der Zelltod und Autolyse einen Rückgang der Biomasse zur Folge haben.

Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, dass das Wachstum der getesteten Pilzstämmen keine lag-Phase aufwies (s. Anhang B, Tab. 5). Exponentiell wachsende Pilzzellen, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen als Inokulum verwendet wurden (s. Anhang A, Tab. 1), setzen nach Übertragung in dasselbe Medium ihr exponentielles Wachstum fort, so dass eine lag-Phase fehlt (CARLILE und WATKINSON, 1994). Die stationäre Phase von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 begann nach 6 Tagen mit $3,1 \text{ mg mL}^{-1}$, in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 hingegen erst nach 7 bzw. 8 Tagen, wobei die Biomasse 29,0 bzw. 38,7 % geringer war als die von Stamm H4/P/15.

Die stationäre Phase wird erreicht, wenn essentielle Nährstoffe nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen oder toxische Stoffwechselprodukte gebildet werden (CARLILE und WATKINSON, 1994). *H. lugdunensis* und *V. cf. alboatrum* gehören unterschiedlichen systematischen Ordnungen an, daher wären unterschiedliche stoffwechselphysiologische Leistungen denkbar, die die geringere Biomasse der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 unter gleichen Nährstoffbedingungen erklären könnten.

Die Bestimmung der I_{50} -Konzentration erfolgt in der logarithmischen Phase. Daher wurde nach 5-tägiger Kultivierung, jeder Stamm befand sich in der logarithmischen Phase, die Wachstumshemmung bestimmt.

4.1.4 Schwermetalltoleranz der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

In Flüssigkultur wurde die Hemmung des Wachstums durch Cd(II), Cu(II) und Zn(II) untersucht. Die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 wiesen einen I_{50} von 0,05 bzw. 0,1 mM Cd(II) und 0,3 mM Cu(II) oder Zn(II) auf (Abb. 7; Anhang B, Tab. 6).

MIERSCH et al. (1997) untersuchten einen *H. lugdunensis* BB Stamm bezüglich seiner Schwermetalltoleranz. Dieser wies eine 50 %-ige Wachstumshemmung bei 0,05 mM Cd(II) auf, ein Wachstum in Cu(II) und Zn(II)-haltigem Medium war bis 0,2 bzw. 0,6 mM möglich. In der Arbeit von MIERSCH et al. (1997) wurde die Schwermetalltoleranz aquatischer Hyphomyceten in einem Malz-Pepton-Medium, wie in der vorliegenden Arbeit, bestimmt. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie erfolgte eine 11tägige Kultivierung bei 20 °C und 100 rpm (vergl. Tab. 10). In beiden Studien konnte jedoch ein Wachstum von *H. lugdunensis* in schwermetallhaltiger Flüssigkultur nachgewiesen werden.

Der im hoch belasteten Gewässer isolierte *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 zeigte im Vergleich zu *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1, der in einem gering belasteten Gewässer isoliert wurde (KRAUSS, 1998, 2001), im allgemeinen keine erhöhte Schwermetalltoleranz.

Ob ein Stamm von einem belasteten Standort prinzipiell toleranter ist als ein Stamm von einem unbelasteten Standort, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits war der Zygomycet *Glomus* sp., isoliert aus unbelastetem Boden, sensitiver gegenüber Schwermetallen als *Glomus claroideum*, der aus einem kontaminierten Standort isoliert wurde (DEL VAL et al., 1999). Andererseits war die Cu(II)-Toleranz des Basidiomyceten *Paxillus involutus*, der in Cu(II)-belasteten Böden isoliert worden war, nicht größer als die der Isolation aus unbelasteten Böden (HOWE et al., 1997).

PIERAU (1999) stellte in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 eine Stimulation des Wachstums durch 0,025 und 0,05mM Cu(II) und eine 50 %-ige Verringerung der Biomassenbildung bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,025 mM fest. Außerdem wies Stamm H8/2/1 im Vergleich zu Stamm H4/2/4 eine größere Toleranz gegenüber Cd(II) auf. Dies konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden, was vermutlich auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen zurückzuführen ist (s. Kap. 4.1.1, Tab. 10). So wurde die Kultur in der Arbeit von PIERAU (1999) mit homogenisierten Agarstückchen inokuliert, die Pilze nach 2 bzw. 3 Tagen mit SM belastet und die Kultivierung erfolgte bei 10 °C.

Im Vergleich zu den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 zeigte *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 nicht nur in Oberflächenkultur, sondern auch in Flüssigkultur eine hohe Schwermetalltoleranz. Bei 0,025 mM Cu(II) kam es zu einer signifikanten Wachstumsförderung. Vermutlich lag unter 0,025 mM eine optimale Konzentration des essentiellen Cu(II) vor. Unter Zn(II)-Belastung kam es erst zwischen 10 und 20 mM zu einer 50 %-igen Wachstumshemmung und es lag keine Korrelation zwischen der Zn(II)-Belastung und der Wachstumshemmung vor ($r = -0,97$) (Abb. 8 B; s. Anhang B, Tab. 7 u. 8). *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 wurde in dem stark kontaminierten Standort H4, der eine Zn(II)-Belastung von 39,8 mM aufwies, isoliert. Ob die hohe Toleranz eine Adaption an das stark Zn(II)-belastete Habitat ist oder *V. cf. alboatrum* generell eine hohe Zn(II)-Toleranz aufweist, könnte in weiteren Untersuchungen mit Isolationen aus unbelasteten Gewässern gezeigt werden. In der Literatur gibt es bereits erste Hinweise, dass die Gattung *Verticillium* eine hohe Toleranz gegenüber Zn(II) besitzt. In Studien von THRONEBERRY (1973) konnte unter 0,24 mM Zn(II) keine Wachstumshemmung für *V. alboatrum* nachgewiesen werden. *V. marquandii* wuchs bis zu einer Konzentration von 382 mM Zn(II) (SLABA und DLUGOŃSKI, 2000).

Im Vergleich zu der Schwermetalltoleranz der Pilze der vorliegenden Studie ist z. B. *Curvularia lunata* als wesentlich schwermetalltoleranter anzusehen. *C. lunata* wies eine 50 %-ige Wachstumshemmung unter 60 mM Cd(II) auf (RAMA RAO et al., 1997a). Das Wachstum von *C. lunata* wurde im Vergleich zu *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 bei einer 67fach höheren Cd(II)-Konzentration zu 50 % gehemmt. Da die Kultivierung von *C. lunata* in einem Mineralmedium erfolgte, war die hohe Cd(II)-Toleranz vermutlich nicht durch eine starke Komplexbildung des Cd(II) bedingt.

In der vorliegenden Arbeit war ein Wachstum von z. B. *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Oberflächenkultur bis zu 0,5 mM Cd(II) und 1 mM Cu(II) oder Zn(II) möglich. In Flüssigkultur hingegen erfolgte ein Wachstum nur bis zu 0,1 mM Cd(II) und 0,4 mM Cu(II) oder Zn(II). Vermutlich adsorbiert der in der Oberflächenkultur enthaltene Agar einen Teil der Schwermetalle, so dass die Bioverfügbarkeit der Schwermetalle geringer ist und dies das Wachstum unter bis zu 5fach höherer SM-Konzentration in Oberflächenkultur erklärt. MIERSCH et al. (1997) konnten in Oberflächenkultur für den aquatischen Hyphomyceten *Clavariopsis aquatica* ein Wachstum bis 0,3 mM Cd(II) nachweisen, wohingegen ein

Wachstum in Flüssigkultur nur bis 0,1 mM Cd(II) möglich war. Dies wurde mit einer möglichen Adsorption des Cd(II) durch Agar begründet (MIERSCH et al. 1997).

Die Wachstumshemmung von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 betrug unter einer Zn(II)-Belastung von 10 mM in Oberflächenkultur 71,3 % und in Flüssigkultur nur 28,2 %. Somit kam es in Oberflächenkultur zu einer stärkeren Hemmung des Wachstums als in Flüssigkultur. In Cd(II)-haltiger Kultur von *C. lunata* lag ebenfalls eine stärkere Wachstumshemmung in Oberflächenkultur vor (RAMA RAO et al., 1997a). In *C. lunata* erfolgte die Cd(II)-Detoxifikation durch eine hohe Biosorptionskapazität. Die Autoren führten die höhere Cd(II)-Toxizität in Oberflächenkultur auf eine eingeschränkte Cd(II)-Biosorption zurück. Eine Detoxifikation von Zn(II) durch eine hohe Biosorptionskapazität konnte in *V. cf. alboatrum* jedoch nicht nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.2 u. 4.2.2), daher kann bislang die geringere Wachstumshemmung in Flüssigkultur durch 10 mM Zn(II) nicht erklärt werden.

Die Aufnahme der Wachstumskurve in unbelasteter und belasteter (0,05 mM Cd(II)) Flüssigkultur für die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 zeigte zu Beginn der Kultivierung für beide Stämme ein verringertes Wachstum bei 0,05 mM Cd(II) (s. Anhang A, Tab. 2 u. 3). Nach 6tägiger Kultivierung von Stamm H4/2/4 bzw. 12tägiger Kultivierung von Stamm H8/2/1 war die Biomasse der unbelasteten und belasteten Kultur jedoch gleich. Eine Verringerung des Wachstums zu Beginn der Cd(II)-haltigen Kultivierung (0,1 mM) und eine mit der Kontrolle vergleichbare Biomasse in der stationären Phase konnten von GROß (2000) in den *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 festgestellt werden. Die Untersuchungen wurden jedoch unter anderen Kulturbedingungen durchgeführt, die Inokulation erfolgte mit homogenisierten Agarstückchen und Cd(II) wurde nach 3tägiger Kultivierung appliziert (vergl. Tab. 10). Der terrestrische Basidiomycet *Daedalea quercina* zeigte hingegen unter 0,1 mM Cd(II)-Belastung ein verringertes Wachstum und die maximale Biomasse der belasteten Kultur war im Vergleich zur Kontrolle um 50 % geringer (GABRIEL et al., 1996). Auch der terrestrische Pilz *N. crassa* bildete in Cd(II)-haltiger Kultur (0,5 mM) eine geringere Biomasse als die Kontrolle (LEVINE und MARZLUF, 1989).

4.2 Studien zur Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

4.2.1 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium bestimmt (Kap. 3.2.1).

In *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 lag bei einer Konzentration von 0,025 mM Cd(II) 5,2 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG biosorbiert vor (Abb. 9; Anhang B, Tab. 9). Die Biosorption von Cd(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 lässt Bindungsstellen für Cd(II) in der Zellwand vermuten.

Die Biosorption von Schwermetallen kann durch Ionenaustausch oder Komplexierungsreaktionen mit deprotonierten funktionellen Gruppen der Zellwandbestandteile (Glucan, Chitin, Chitosan und Cellulose) erfolgen (SIEGEL et al., 1990; KAPOOR und VIRARAGHAVAN, 1997a). In dem Zygomyceten *R. arrhizus* sind Carboxyl-, Phosphat- und Hydroxylgruppen an der Biosorption von Metallen wie Cd(II) oder Zn(II) beteiligt (TOBIN et al., 1984). Die Biosorption von Cd(II) durch den Deuteromyceten *A. niger* erfolgt nicht nur durch Carboxylgruppen, sondern auch durch Aminogruppen (KAPOOR und VIRARAGHAVAN, 1997b). Der Ascomycet *N. crassa* biosorbiert Cd(II) durch Hydroxylgruppen des Chitins und an der Biosorption von Cu(II) sind Polyphenole beteiligt (SURESH und SUBRAMANYAM, 1998; BHANOORI und VENKATESWERLU, 2000). Außerdem kann eine Biosorption von Schwermetallen an Pigmente erfolgen, so wurde Cu(II) von *A. pullulans* durch Melanin gebunden (GADD, 1984). Welche Zellwandbestandteile von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 Cd(II) biosorbieren, bleibt zu klären.

Bei dem hier untersuchten *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 kam es mit zunehmender Cd(II)-Konzentration im Medium zu einem Anstieg der Cd(II)-Biosorption (Abb. 9; Anhang B, Tab. 9). Daher ist die Cd(II)-Biosorption bei *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 ein konzentrationsabhängiger Prozess. Eine konzentrationsabhängige Biosorption von Cd(II) durch *H. lugdunensis* konnte auch in Untersuchungen von PIERAU (1999) und GROß (2000)

an dem gleichen Stamm nachgewiesen werden. Die Cd(II)-Biosorption durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 nahm beispielsweise bei einer Erhöhung der Konzentration von 0,025 mM auf 0,05 mM Cd(II) bei PIERAU (1999) um 150 %, sowie bei GROß (2000) und in der vorliegenden Studie um etwa 80 % zu. Die Differenzen in dem konzentrationsabhängigen Anstieg könnten in der unterschiedlichen Kultivierung begründet sein (vergl. Tab. 10).

In Biosorptionsversuchen mit lebendem oder totem Pilzmyzel kommt es unterschiedslos zunächst zu einer Zunahme der Cd(II)-Biosorption mit steigender Cd(II)-Konzentration in der Lösung; nach Erreichen der maximalen Biosorptionskapazität tritt dann jedoch eine Sättigung ein (KRANTZ-RÜLCKER et al., 1993; YIN et al., 1999). So stieg die Cd(II)-Biosorption des Deuteromyceten *Trichoderma harzianum* mit zunehmender Cd(II)-Konzentration an (KRANTZ-RÜLCKER et al., 1993). Da in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bis 0,1 mM Cd(II) keine Sättigung der Biosorption nachweisbar war, ist vermutlich die maximale Biosorptionskapazität nicht erreicht. Ein Wachstum bei einer Konzentration von 0,2 mM Cd(II) war jedoch unter diesen Kulturbedingungen nicht möglich.

Bei einer Zn(II)-Konzentration von 0,025 mM biosorbierte *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 5,7 nmol Zn(II) mg⁻¹ TG (Abb. 9; Anhang B, Tab. 10). Mit steigender Zn(II)-Konzentration kam es zu einer Zunahme des biosorbierten Zn(II), so dass nicht nur die Cd(II)-Biosorption, sondern auch die Zn(II)-Biosorption ein konzentrationsabhängiger Prozess war. Eine ebenfalls konzentrationsabhängige Zn(II)-Biosorption konnte bei dem Ascomyceten *S. cerevisiae* festgestellt werden (WHITE und GADD, 1987).

Die Biosorption von Zn(II) und Cd(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 war nicht signifikant verschieden.

Der Biosorption von Schwermetallen wird eine Detoxifikationsfunktion zugeschrieben, da an der Zellwand biosorbiertes Metall geringere Schädigung auf den Zellstoffwechsel ausübt als intrazellulär vorliegendes. So kam der Zellwand einer Hg(II) resistenten Mutante von *S. cerevisiae* eine wichtige Funktion in der Schwermetalldetoxifikation zu (ONO et al., 1988). Die Mutante biosorbierte im Vergleich zum Wildtyp größere Mengen Hg(II), bis zu 85 % des insgesamt aufgenommenen Hg(II), bei gleichzeitig geringerer Menge akkumuliertem Hg(II). Auch die Cd(II)-Toleranz des Deuteromyceten *C. lunata* wird der hohen Cd(II)-

Biosorptionskapazität zugeschrieben; 90 % des insgesamt aufgenommenen Cd(II) liegt biosorbiert vor (RAMA RAO et al., 1997a).

Die Cd(II)-Akkumulation von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bei 0,025 mM Cd(II) betrug 2,7 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG (Abb. 9; s. Anhang B, Tab. 9). Bei 0,05 mM Cd(II)-Belastung wiesen PIERAU (1999) und GROß (2000) für *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 eine Cd(II)-Akkumulation von 2,9 bzw. 1,6 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG nach. Es unterschied sich nur die Akkumulation von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 unter 0,05 mM Cd(II) in den Untersuchungen von GROß (2000) signifikant, diese Differenzen könnten mit den unterschiedlichen Kulturbedingungen erklärt werden. *C. lunata* akkumulierte in einem 20 mM Cd(II)-haltigen Medium 2,6 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG (RAMA RAO et al., 1997a). Dies entspricht zwar der akkumulierten Cd(II)-Menge von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4, doch die Kultivierung von *C. lunata* erfolgte unter einer 800fach höheren Cd(II)-Belastung. Sowohl *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 als auch *C. lunata* wiesen trotz dieser akkumulierten Cd(II)-Gehalte nur eine geringfügige Wachstumshemmung auf (RAMA RAO et al., 1997a, vergl. Kap. 3.1.3). Im Gegensatz zur Cd(II)-Biosorption wird in erster Linie die akkumulierte bzw. intrazellulär vorliegende Cd(II)-Konzentration für die Hemmung des Pilzwachstums verantwortlich gemacht. In der vorliegenden Arbeit hatte ein Anstieg der Cd(II)-Konzentration im Medium eine erhöhte intrazelluläre Cd(II)-Akkumulation in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 zur Folge, so dass eine konzentrationsabhängige Akkumulation vorlag. Die Zunahme der Cd(II)-Akkumulation korrelierte mit der Wachstumshemmung. Bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,1 mM betrug die akkumulierte Menge an Cd(II) 11,8 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG und es lag eine 50 %-ige Wachstumshemmung vor. Der Anstieg der Wachstumshemmung mit erhöhter intrazellulärer Cd(II)-Konzentration kann durch die Schädigung von Cd(II) auf den Stoffwechsel hervorgerufen worden sein. Cd(II) kann die Plasmamembran schädigen. In *S. pombe* kam es durch eine direkte Wechselwirkung von Cd(II) mit Membranphospholipiden zu einem K⁺-Efflux (AßMANN et al., 1996). In *S. cerevisiae* konnte unter Cd(II)-Belastung eine Lipidperoxidation nachgewiesen werden, was ebenfalls ein K⁺-Efflux zur Folge hatte (HOWLETT und AVERY, 1997a, 1997b). Ob es in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 zu einer Schädigung der Plasmamembran kommt bleibt zu klären.

Die Zn(II)-Akkumulation von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 betrug bei 0,025 mM Zn(II) 10,5 nmol Zn(II) mg⁻¹ TG (Abb. 9; Anhang B, Tab. 10). Da die Zn(II)-Akkumulation mit der

Zn(II)-Konzentration im Medium zunahm, war auch hier die Zn(II)-Akkumulation ein konzentrationsabhängiger Prozess. Bei 0,1 mM Zn(II) wurde 25,1 nmol Zn(II) mg⁻¹ TG akkumuliert, doch es lag keine signifikante Wachstumshemmung vor (Abb. 7). Zn(II) zählt zu den essentiellen Schwermetallen und steigerte z. B. in dem Deuteromyceten *Oidiodendron maius* die Aktivität der Polygalacturonase (MARTINO et al., 2000). Offensichtlich lag in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bei 0,1 mM Zn(II) keine toxische intrazelluläre Zn(II)-Konzentration vor. In der Hefe *S. cerevisiae* wird Zn(II) durch zwei energieabhängige Transportsysteme, Zrt1p: hohe Affinität und Spezifität für Zn(II) und Zrt2p: geringe Affinität und Spezifität, ins Zellinnere aufgenommen (ZHAO und EIDE, 1996a, b). Dies könnte die - im Vergleich zu Cd(II)- höhere Akkumulation von Zn(II) erklären. Bei gleicher Konzentration im Medium wird Zn(II) sowohl durch ZTR1 als auch durch ZTR2 aufgenommen, während Cd(II) nur durch ZTR2 aufgenommen werden könnte.

In hohen Konzentrationen kann Zn(II) toxisch wirken, so kam es z. B. in *S. cerevisiae* durch die starke Aufnahme von Zn(II) zu einer Hemmung des H⁺-Efflux und der K⁺-Aufnahme (WHITE und GADD, 1987; KAMIZONO et al., 1989). Ab einer Zn(II)-Konzentration von 0,2 mM bzw. ab einem akkumulierten Gehalt von 59,5 nmol Zn(II) mg⁻¹ TG kam es in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 zu einer Wachstumshemmung und somit lag eine toxische Zn(II)-Konzentration vor. Ob es wie in *S. cerevisiae* zu einer Hemmung der K⁺-Aufnahme kommt, müssen weitere Studien zeigen.

Insgesamt zeigen die Biosorptions- und Akkumulationsversuche eine konzentrationsabhängige Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4. Die toxische Wirkung eines Schwermetalls wird überwiegend intrazellulär ausgeübt. Bei einer Akkumulation von 11,8 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG bzw. 85,8 nmol Zn(II) mg⁻¹ TG wurde eine 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht, so dass Cd(II) toxischer als Zn(II) ist.

4.2.2 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

In *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 war die Cd(II)-Biosorption bis zu einer Konzentration von 0,5 mM Cd(II) gering (3,7 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG). Die Zellwand scheint demnach nur wenig Bindungsstellen für Cd(II) zu besitzen. Bei Erhöhung der Cd(II)-Konzentration von 0,5 auf 1 mM Cd(II) stieg die Cd(II)-Biosorption um 854,0 % an (Abb 10; s. Anhang B, Tab. 11).

Die sprunghafte Zunahme der Biosorption könnte auf eine Bildung von Cd(II)-bindenden Zellwandstrukturen und somit auf eine Adaption an die Cd(II)-Belastung, hinweisen. Diese Vermutung wird durch Befunde der Literatur gestützt. So nahm in *N. crassa* unter Cd(II)-Belastung der Gehalt an Chitin in der Zellwand zu. Da Cd(II) durch die Hydroxylgruppen des Chitins gebunden werden kann, wurde die Zunahme des Chitins unter Cd(II)-Belastung als adaptive Antwort auf Cd(II)-Stress angesehen (BHANOORI und VENKATESWERLU, 2000). *Cunninghamella blakesleeana*, ein Zygomycet, veränderte unter Co(II)- bzw. Cu(II)-Belastung ebenfalls die Zellwandstruktur und hatte eine höhere Biosorptionskapazität für Co(II) und Cu(II) als die Kontrollkultur (VENKATESWERLU und STOTZKY, 1989). *Mucor rouxii* wies nach unbelasteter Kultivierung eine um 26 % geringere Cu(II)-Biosorptionskapazität als in Cu(II)-haltiger Kultur auf (GARDEA-TORRESDEY et al., 1997). Die Autoren folgerten, dass sich die Zellwandzusammensetzung unter Cu(II)-Belastung verändert hat. Inwieweit es unter Cd(II)-Belastung zu einer Veränderung der Zellwandzusammensetzung von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 kommt, bleibt in weiteren Studien zu untersuchen.

Bei einer Zn(II)-Konzentration von 0,025 mM lag eine geringe Zn(II)-Biosorption von 0,6 nmol Zn(II) mg⁻¹ TG vor, die jedoch bei 20 mM Zn(II) um 4600 % angestiegen war (Abb. 10; s. Anhang B, Tab. 12). Die Zn(II)-Biosorption stieg mit zunehmender Zn(II)-Konzentration im Medium gleichmäßig an und war konzentrationsabhängig.

Bei einer SM-Belastung von 0,025 mM war die Biosorption von Cd(II) geringer als von Zn(II). Doch bei einer Cd(II)-Konzentration von 1 mM war die Biosorption um 123,4 % höher als bei 10 mM Zn(II).

Die vorliegende Studie konnte erste Hinweise auf eine unterschiedliche Biosorptionskapazität für die Schwermetalle Cd(II) und Zn(II) aufzeigen. Ob diese Unterschiede auf eine Veränderung in der Zellwandzusammensetzung unter Schwermetallstress zurückzuführen sind, müssen weitere Studien klären.

Die Akkumulation von Cd(II) betrug unter 0,025 mM Cd(II) 0,2 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG und stieg bis zu 1 mM Cd(II) um 11150 % (113fach) an (Abb. 10; Anhang B, Tab. 11). Eine signifikante Wachstumshemmung (17,8 %) trat erst bei einer Cd(II)-Konzentration von 0,5 mM und einer Akkumulation von 1 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG auf (Abb. 8 u. 10). Eine toxische

intrazelluläre Cd(II)-Konzentration wurde demzufolge erst in einem 0,5 mM Cd(II)-haltigen Medium erreicht.

Die Akkumulation von Zn(II) nahm von 0,025 bis 10 mM Zn(II) um 914,3 % zu, stieg dann aber bis 20 mM Zn(II) nicht mehr signifikant an. Damit erreichte die Akkumulation von Zn(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 die von GADD (1993) erwähnte Sättigung der Schwermetallakkumulation.

Bei einer Cd(II) bzw. Zn(II)-Belastung von 0,025 mM galt für die Akkumulation: Zn(II) > Cd(II). Eine Wachstumshemmung von ungefähr 70 % lag bei 1 mM Cd(II) bzw. 10 mM Zn(II) vor. Unter dieser SM-Belastung war die Akkumulation von Zn(II) um 57,7 % höher als die von Cd(II) und somit übte Cd(II) eine größere Toxizität aus als Zn(II).

Die vergleichsweise geringe intrazelluläre Aufnahme von Zn(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unter einer Belastung von bis zu 20 mM deutet auf einen verringerten Zn(II)-Transport ins Zellinnere hin. Weitere Studien sollten klären, ob eine geringe Affinität der Zn(II)-Transportsysteme die vergleichsweise geringe Akkumulation bedingen. Des Weiteren bleibt zu überprüfen, ob es zu einem Efflux von Zn(II) kommt. In dem Deuteromyceten *Candida albicans* konnte bereits ein Efflux von Cu(II) nachgewiesen werden (WEISSMAN et al., 2000).

V. cf. alboatrum-Stamm H4/P/15 wies eine geringe Biosorptions- und Akkumulationskapazität für Zn(II) auf. Unter 10 mM Zn(II) wurden nur 0,8 % des wiedergefunden Zn(II) von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 aufgenommen (Biosorption + Akkumulation). Durch *V. marquandii* hingegen kam es in einem 15 mM Zn(II)-haltigem Stroh-Extrakt-Schlacke Medium zu einer Zn(II)-Abnahme im Medium um 80 % (SLABA und DLUGOŃSKI, 2000).

4.2.3 Vergleich der getesteten Pilzstämme

H. lugdunensis-Stamm H4/2/4 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 sind von dem hoch kontaminierten Standort H4 isoliert worden. In den Wachstumsuntersuchungen konnte bereits eine unterschiedliche Schwermetalltoleranz aufgezeigt werden (Kap. 3.1.3). Auch hinsichtlich ihres Biosorptions- und Akkumulationsverhaltens waren Unterschiede zu beobachten. In Tabelle 11 ist die Biosorption und Akkumulation von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4P/15 im

Vergleich zu *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 (Biosorption + Akkumulation = 100 %) dargestellt.

Tab. 11 Prozentuale Biosorption und Akkumulation von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 im Vergleich zu *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 (= 100 %).

	Cd(II) [mM]		Zn(II) [mM]	
	0,025	0,1	0,025	0,3
Biosorption	0	6,5	10,5	7,4
Akkumulation	7,4	2,5	33,3	8,6

Bei einer Belastung von 0,1 mM Cd(II) oder 0,3 mM Zn(II) biosorbiert *V. cf. alboatrum*-Stamm H4P/15 nur 6,6 bzw. 7,4 % der biosorbierten SM-Menge von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4. Diese Ergebnisse lassen einen unterschiedlichen Zellwandaufbau der beiden Pilze vermuten, wobei die Zellwand von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 weniger Bindungsstellen für Cd(II) und Zn(II) besitzen dürfte als *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4. Der Zellwandaufbau kann sich innerhalb der Arten unterscheiden und das Biosorptionsverhalten beeinflussen (TREVORS et al., 1986; VOLESKY, 1990). So zeigten der Ascomycet *S. cerevisiae* und der Deuteromycet *Sporobolomyces roseus* eine unterschiedliche Biosorptionskapazität, die mit einer verschiedenen Zellwandstruktur erklärt wurde (MOWLL und GADD, 1983). Ob die in der vorliegenden Arbeit festgestellte geringere Biosorption bei *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 tatsächlich auf eine unterschiedliche Zellwandzusammensetzung zurückzuführen ist, kann nur durch eine Zellwandanalyse geklärt werden.

Bei 0,1 mM Cd(II) bzw. 0,3 mM Zn(II) im Medium nahm *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 nur 2 bzw. 9 % der akkumulierten Menge an Cd(II) bzw. Zn(II) von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 intrazellulär auf (Tab. 11). Die geringere Wachstumshemmung von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 (vergl. Abb. 7 u. 8), die unter gleichen SM-Konzentrationen vorlag, wird auf die bis zu 98 % niedrigere Akkumulation zurückzuführen sein. Eine geringe Akkumulation von Schwermetallen in toleranteren Stämmen ist weit verbreitet (GADD, 1990). So kam es in dem Cd(II)-toleranten Stamm von *Neocosmospora vasinfecta* im Vergleich zum sensitiven Stamm zu einer Abnahme der Cd(II)-Akkumulation (BUDD, 1991). In einem resistenten Stamm von *N. crassa* konnte eine um 73 % geringere Zn(II)-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (RAMA RAO et al., 1997b). Die hohe Cd(II)-Toleranz von *C. lunata* wurde auf eine geringe Akkumulation von Cd(II) zurückgeführt (RAMA RAO et al., 1997a). Die Cd(II)-Sensitivität von *S. cerevisiae*-Stämmen beruht nach

JOHO et al. (1985) auf einer höheren Cd(II)-Akkumulation im Vergleich zu schwermetalltoleranten Stämmen. Dies unterstützt die Hypothese, dass die hohe Toleranz von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 wesentlich auf die geringe Cd(II)- bzw. Zn(II)-Akkumulation zurückgeführt werden kann.

Das Wachstums *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 wurde bei einer Cd(II)-Belastung von 0,05 mM bzw. 0,5 mM zu 19,2 bzw. 17,8 % gehemmt. Die intrazelluläre Cd(II)-Konzentration war für *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 um 280,0 % höher als in *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15. Somit tolerierte *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 höhere intrazelluläre Cd(II)-Konzentrationen als *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15.

4.3 Wirkungen von Schwermetallen auf den Gehalt thiolhaltiger Peptide und Proteine der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1, sowie von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15

4.3.1 GSH- und GTSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unter Cd(II)- und Zn(II)-Belastung

Der GSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 war im Vergleich zur Kontrolle bis 0,1 mM Cd(II) nicht signifikant erhöht. Dies könnte auf die geringe Cd(II)-Akkumulation zurückgeführt werden (0,1 mM Cd(II): 0,3 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG). Vermutlich lag bis zu diesem Gehalt an akkumuliertem Cd(II) keine toxische Konzentration vor. Dies wird dadurch unterstützt, dass keine Wachstumshemmung beobachtet wurde.

Ab einer Cd(II)-Konzentration von 0,5 mM und einer Cd(II)-Akkumulation von 1 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG nahm der GSH-Gehalt signifikant zu (vergl. Kap. 3.2.2 u. 3.3.1; Abb. 11; s. Anhang B, Tab. 11 u. 13). Der GSH-Gehalt korrelierte mit dem akkumulierten Cd(II), so dass eine Induktion des intrazellulären GSH-Anstiegs durch Cd(II) denkbar wäre. *C. glabrata* zeigte ebenfalls einen Anstieg des GSH-Gehaltes nach Cd(II)-Belastung (BARBAS et al. 1992). Ausserdem wiesen sie eine Komplexierung von Cd(II) durch GSH nach (BARBAS et al., 1992).

Der GTSH-Gehalt von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 war im Vergleich zur Kontrolle bei 1 mM Cd(II) um 220,0 % erhöht. Außerdem war bei 1 mM Cd(II) der GTSH-Gehalt um 239,4 % höher als der GSH-Gehalt. Dies weist auf die Bildung weiterer thiolhaltiger Substanzen unter Cd(II)-Belastung hin. Die Bildung von Phytochelatinen oder Metallothioneinen konnte

jedoch bislang in *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unter Cd(II)-Belastung nicht nachgewiesen werden.

Bei einer Zn(II)-Belastung von 20 mM kam es in *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 im Vergleich zur Kontrolle nur zu einer Erhöhung des GSH- und GTSH-Gehaltes um 26,3 bzw. 54,7 % (Abb. 11, Anhang B Tab. 14). Es besteht keine Korrelation zwischen der Zn(II)-Akkumulation und dem GSH- bzw. GTSH-Gehalt, so dass GSH oder andere thiolhaltige Substanzen vermutlich keine wichtige Funktion in der Zn(II)-Detoxifikation zukommt. Die maximale Zn(II)-Akkumulation von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 betrug 36,9 nmol mg⁻¹ TG. Bei ungefähr der gleichen Zn(II)-Akkumulation von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 kam es ebenfalls zu keiner Erhöhung des GSH-Gehaltes (s. Anhang A, Tab. 6).

Bislang ist die intrazelluläre Detoxifikation von Cd(II) und Zn(II) in *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 unbekannt. In der Literatur gib es Hinweise, inwieweit es neben der Bildung von Metallothionein oder Phytochelatin zu einer Detoxifikation von Schwermetallen kommen kann. So kam es unter Cu(II)-Belastung in *S. cerevisiae* zu einer Akkumulation von Histidin in der Vakuole und histidin-defiziente Mutanten zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cu(II). Die Autoren nahmen eine Bindung von Cu(II) durch Histidin und eine Detoxifikation in der Vakuole an (PEARCE und SHERMAN, 1999). In *S. cerevisiae* wurde ein Zn(II)-Resistenz-Gen nachgewiesen. Der genaue Mechanismus der Zn(II)-Resistenz konnte jedoch nicht geklärt werden (KAMIZONO et al., 1989).

4.3.2 Gehalt thiolhaltiger Verbindungen in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung

4.3.2.1 Identifikation eines gemischten Disulfids

Unter Cd(II)-Belastung konnte ein gemischtes Disulfid mit m/z 556 nachgewiesen werden. Dies wurde im HPLC-Chromatogramm nicht durch einen separaten Peak detektiert, sondern kam zeitgleich mit dem GSH-Peak. Es können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob das gemischte Disulfid, das sich aus GSH und γ -Glutamylcystein zusammensetzt, durch Cd(II) induziert wurde und somit eine Funktion in der Cd(II)-Detoxifikation haben könnte. Ein Bildung des Peptids durch eine Reaktion der Sulfidgruppen von GSH und γ -

Glutamylcystein *in vivo* oder *in vitro* wäre ebenfalls denkbar. In der Literatur ist das Vorkommen eines solchen gemischten Disulfids bislang noch nicht beschrieben.

4.3.2.2 Nachweis von Metallothioneinen

Unter Cd(II)-Belastung kam es in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 zur Bildung von zwei thiolreichen Proteinen, MT1_HL und MT2_HL. Ein Aminosäuresequenzvergleich von MT1_HL und MT2_HL mit einer Proteindatenbank (www.ebi.ac.uk) ergab eine Homologie mit der Aminosäuresequenz von MT2_COLGL des Deuteromyceten *C. gloeosporioides* von 60 % (HWANG und KOLATTUKUDY, 1995; s. Abb. 22). MT2_COLGL von *C. gloeosporioides* wird zur Familie 8 der Metallothioneine gezählt (SWISSPROT). Daher sind MT1_HL (Metallothionein 1 *H. lugdunensis*) und MT2_HL (Metallothionein 2 *H. lugdunensis*) in Familie 8 einzuordnen (KÄGI, pers. Mitteilung). Zur Familie 8 gehören ebenfalls die MTs des Ascomyceten *N. crassa* und des Basidiomyceten *A. bisporus* sowie MT1_COLGL von *C. gloeosporioides* (Abb. 22).

MT1_HL	-SPCTCS---TC--NCAGACNSCSCSTSCSH-
MT2_HL	MSPCTCS---TC--NCAGACNTCSCSTSCSH-
MT2_COLGL	MAPCSCK---SCGTSCAGSCTSCSCGSCSH-
MT1_COLGL	MSGCGCASTGTC--HCGK---DCTCAGCPHK
MT_AGABI	-GDCGCSGASSC--TCAS--GQCTCSGCGK-
MT_NEUCR	-GDCGCSGASSC--NCGS--G-CSCSNCGSK

Abb. 22 Alignment der MTs der Familie 8. MT1_HL: Metallothionein 1 *Heliscus lugdunensis*; MT2_HL: Metallothionein 2 *Heliscus lugdunensis*; MT2_COLGL: Metallothionein 2 *Colletotrichum gloeosporioides*, MT1_COLGL: Metallothionein 1 *Colletotrichum gloeosporioides*, MT_AGABI: *Agaricus bisporus*, MT_NEUCR: *Neurospora crassa*.

Durch den Nachweis von neuen MTs kann es immer zu einer Veränderung der Klassifizierung kommen. Da die MTs von *H. lugdunensis* die größte Homologie mit MT2_COLGL aufweisen, könnte es in Zukunft zur Bildung von zwei neuen Unterfamilien f11 und f12 kommen, wobei MT_AGABI, MT_NEUCR und MT1_COLGL in f11 und MT1_HL, MT2_HL und MT2_COLGL in f12 zuzuordnen sind (KÄGI, pers. Mitteilung).

MT2_HL der *H. lugdunensis*-Stämme unterscheidet sich von MT1_HL nur darin, dass das 4. carboxyterminale Serin durch Threonin ausgetauscht ist und am aminoterminalen Ende zusätzlich ein Methionin enthält. Das MT von *S. cerevisiae* besitzt genau wie MT1_HL kein Methionin, wobei vermutet wird, dass posttranslational 8 aminoterminalen Aminosäuren, hydrophobe sowie aromatische Aminosäuren, abgespalten wurden (HAMER, 1986; INOUE

et al., 1989). *N. crassa* bildet neben dem in Abbildung 22 dargestellten MT, MTs mit der gleichen Aminosäuresequenz, die jedoch zusätzlich am aminoterminalen Ende ein Methionin enthalten oder aminoterminal blockiert sind (LERCH, 1991). Vermutlich kommt es in dem MT1_HL von *H. lugdunensis* und auch im MT von *N. crassa* zu einer posttranslationalen Abspaltung des Methionins, die in *N. crassa* jedoch nur teilweise erfolgt.

In der Literatur wurde eine Bindung von Cu(I) an das MT beschrieben und dem MT wird eine Rolle in der Cu(I)-Detoxifikation in Pilzen zugeschrieben (LERCH, 1980; MEHRA et al., 1988). In Untersuchungen mit nicht angesäuerten Myzelextrakten von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 konnte mittels MALDI-PSD die Bindung von 2 Cd(II) durch MT1_HL nachgewiesen werden (Abb. 18). Die Metall/Protein Stöchiometrie betrug somit 2 Cd(II)/MT und das Cd(II)/S-Verhältnis war 2 : 4. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* MT1_HL 3 Cd(II) bindet, da es durch die Ionisierung in der Massenspektrometrie zu einem Verlust von Cd(II)-Atomen gekommen sein könnte. Für das MT von *N. crassa*, welches aus 25 Aminosäuren besteht und 7 Cysteine enthält, ist eine *in vitro* Bindung von 3 Cd(II) beschrieben. 2 Cd(II) sind tetrahedral als Metall-Thiolat Cluster gebunden und an der Bindung des 3. Cd(II) sind vermutlich andere Liganden beteiligt (BELTRAMINI et al., 1984). MT1_HL hat eine ähnliche Molmasse und es wäre eine tetrahedrale Bindung von 2 Cd(II) durch 7 Cysteine möglich. Die stabile tetrahedrale Bindung wurde durch den Ionisierungsprozess während der Massenspektrometrie vermutlich nicht vollständig zerstört, so dass ein Nachweis von Cd₂-MT1 möglich war. Ein Verlust eines möglichen 3. Cd(II), welches vermutlich nicht tetrahedral gebunden vorlag, könnte während der Massenspektrometrie erfolgt sein.

4.3.2.3 Gehalt thiolhaltiger Peptide und Proteine der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 zeigten unter Cd(II)-Belastung im Verlauf der Kultivierung eine signifikante Erhöhung des GSH-Gehaltes und es kam zur Bildung von Metallothioneinen (MT1_HL und MT2_HL) (Abb. 12 u. 19). In *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 kam es außerdem zur Synthese von Phytochelatin (PC₂). In aquatischen Hyphomyceten ist die Synthese von Metallothioneinen oder Phytochelatine unter SM-Belastung noch nicht beschrieben worden. Erstmals wurde Metallothionein in dem Ascomyceten *N. crassa* nachgewiesen; dieses MT wurde nur unter Cu(II)-Belastung induziert (LERCH, 1980). Die darauffolgend nachgewiesenen MTs, wie z. B. in *A. bisporus*, *S. cerevisiae* und *C. glabrata* wurden ebenfalls nur durch Cu(II) induziert (MÜNGER und

LERCH, 1985; MEHRA et al., 1988; WINGE et al., 1985) (vergl. Kap. 1.4.2 Tab. 2). Lediglich in einer Mutante von *S. cerevisiae* (N301), sowie in *C. gloeosporioides* und in *B. bassiana* war eine Induktion von MT durch Cu(II) und Cd(II) möglich (INOUE et al., 1991; HWANG und KOLATTUKUDY, 1995; KAMEO et al., 2000).

Bis zum Nachweis von Phytochelatin in *S. pombe* unter Cd(II)-Belastung nahm man an, dass eine Schwermetalldetoxifikation in Pilzen nur durch Metallothioneine erfolgt (KONDO et al., 1984). Neben *S. pombe* war jedoch ein Nachweis der Phytochelatinbildung unter Cd(II)-Belastung u. a. in *C. glabrata*, *N. crassa* und *S. cerevisiae* möglich.

Demzufolge ist im Reich der Pilze die Bildung von Metallothionein bzw. Phytochelatin unter Schwermetallstress weit verbreitet. In der vorliegenden Arbeit gelang jedoch erstmals ein Nachweis der gleichzeitigen Bildung von Metallothioneinen und Phytochelatin als Reaktion auf Cd(II)-Stress in *H. lugdunensis* bzw. in Pilzen.

Unter Cd(II)-Belastung lag am 3. Tag ein maximaler GSH-Gehalt in Stamm H4/2/4 vor, der bis zum 12. Tag um 58,9 % abnahm. Dagegen hatte der GSH-Gehalt von H8/2/1 am 6. Tag ein schwaches Maximum, der bis zum 12. Tag um 25,6 % sank (Abb. 12, Anhang B, Tab. 15 u. 17). Im Vergleich zur Kontrolle war am 3. Tag der GSH-Gehalt von H4/2/4 um 76,2 % und von H8/2/1 um 69,7 % erhöht. In Arbeiten von PIERAU (1999) kam es unter Cd(II)-Belastung (0,05 mM) in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes von 230 % bzw. 80 %. Die in der vorliegenden Arbeit geringere Zunahme (76,2 % statt 230 %) des GSH-Gehaltes durch Stamm H4/2/4 könnte in unterschiedlichen Kultivierungsmethoden begründet sein. In der vorliegenden Arbeit wurde mit homogenisiertem Myzel inokuliert, Cd(II) zum Zeitpunkt der Inokulation appliziert und die Kultivierung erfolgte bei 14 °C (s. Kap. 2.6). PIERAU (1999) hingegen inokulierte mit homogenisierten Agarstückchen, die Zugabe von Cd(II) erfolgte nach 2tägiger Kultivierung (lag-Phase) und die Inkubationstemperatur betrug 10 °C (vergl. Tab. 10). Im Gegensatz zu den *H. lugdunensis*-Stämmen der vorliegenden Studie konnte in *H. lugdunensis* BB kein Anstieg des GSH-Gehaltes unter Cd(II)-Belastung nachgewiesen werden (MIERSCH et al., 1997). Dies könnte mit den unterschiedlichen Kulturbedingungen begründet werden. In der Studie von MIERSCH et al. (1997) wurde der GSH-Gehalt nach 10tägiger Kultivierung bei 20 °C bestimmt. Eine Wachstumskurve liegt für diese Bedingungen nicht vor. Wachstumsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit lassen jedoch die Vermutung zu, dass sich *H. lugdunensis* BB zu dem Zeitpunkt der GSH-Bestimmung in der

stationären Phase befindet, da die stationäre Phase von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bei einer Kultivierung unter 14 °C bereits nach 8 Tagen vorliegt (s. Anhang B, Tab. 5). Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, kam es in den *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 zu einer Abnahme des GSH-Gehaltes nach dem 3. Tag, so dass in der stationären Phase im Vergleich zur Kontrolle nur noch einer Erhöhung des GSH-Gehaltes um 31,0 % vorlag (Abb. 12; Anhang B, Tab. 15). Dies könnte den fehlenden Anstieg des GSH-Gehaltes unter Cd(II)-Belastung in *H. lugdunensis* BB erklären.

Der aquatische Hyphomycet *Articulospora tetracladia* BB wies unter Cd(II)-Belastung ebenfalls einen erhöhten GSH-Gehalt auf, wohingegen *A. tetracladia* CS unter Cd(II)-Belastung keine Erhöhung des GSH-Gehaltes zeigte (MIERSCH et al., 2001). Demzufolge kam es zu einer stammesspezifischen Reaktion von *A. tetracladia* auf Cd(II)-Belastung. Die unterschiedliche Reaktion der *H. lugdunensis*-Stämme der vorliegenden Arbeit und *H. lugdunensis* BB auf Cd(II)-Belastung könnte somit auch, wie bei *A. tetracladia*, mit einer stammesspezifischen Reaktion auf Cd(II)-Belastung begründet werden. Der GSH-Gehalt in Pilzen ist von den Kulturbedingungen und dem physiologischen Zustand des Pilzes (log- bzw. stat.-Phase) abhängig. In weiterführenden Studien könnten stammesspezifische Unterschiede in der GSH-Bildung zwischen den *H. lugdunensis*-Stämmen der vorliegenden Arbeit und *H. lugdunensis* BB unter gleichen Kulturbedingungen untersucht werden.

Die Erhöhung des GSH-Gehaltes unter Cd(II)-Belastung in der vorliegenden Studie deutet auf eine mögliche Funktion von GSH in der Detoxifikation von Cd(II) hin, da eine Bindung von Cd(II) an den Sulfhydrylgruppen von GSH möglich ist. Eine Bindung von Cd(II) an die Thiolgruppen des GSHs konnten DIAZ-CRUZ et al. (1997) bereits nachweisen. Aus der Literatur ergeben sich erste Hinweise, dass GSH in Pilzen in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte. In *C. glabrata* kam es unter Cd(II)-Belastung zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes (BARBAS et al., 1992). Darüber hinaus wurde von BARBAS et al. (1992) erstmals eine Detoxifikation von Cd(II) durch die Bildung von Cd(II)-GSH-Komplexen, die in *C. glabrata* zu Beginn der Cd(II)-Belastung vorlagen, nachgewiesen. Im Verlauf der Belastung nahm der Anteil der Cd(II)-GSH-Komplexe ab und es kam zunehmend zur Bildung von Cd(II)S-Komplexen, die von GSH und Phytochelatin umgeben waren. Ob die Erhöhung des GSH-Gehaltes in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 mit der Bildung von Cd(II)-GSH-Komplexen einhergeht und somit eine Detoxifikation des Cd(II) durch GSH erfolgt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Aufnahme von EEL-

Spektren mittels analytischer Elektronenmikroskopie könnte Aufschluss geben, ob Cd(II) durch SH-Gruppen bzw. GSH gebunden wird. So wiesen beispielsweise EEL-Spektren des Wassermooses *Fontinalis antipyretica* auf eine Bindung von Cd(II) an SH-Gruppen von Thiolpeptiden im Cytoplasma hin und ein Vergleich mit Standard-Spektren von Cd(II)-GSH-Komplexen zeigte eine große Übereinstimmung (BRUNS et al., 2001).

In *S. cerevisiae* wird eine Cd(II)-Detoxifikation durch den Transport von Cd(II)-(GS)₂ (bis(glutathionato)Cadmium-Komplexen) in die Vakuole angenommen (LI et al., 1997). So konnte YCF1, ein vakuolärer ABC-Transporter, der *in vitro* Cd(II)-(GS)₂ in die Vakuole transportiert, nachgewiesen werden. Die Vakuolenbildung der *H. lugdunensis*-Stämme, sowie der Transport von Cd(II)-(GS)₂ in die Vakuole bleibt zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Gehalt an Gesamtglutathion bestimmt. Neben GSH kommt jedoch auch GSSG (oxidiertes GSH) in der pilzlichen Zelle vor (PENNINCKX, 2000). Unter oxidativem Stress kann es zu einer Akkumulation von GSSG kommen. So stieg unter oxidativem Stress der Gesamtglutathiongehalt in *P. chrysogenum* an, der Gehalt an GSSG nahm zu und das GSH : GSSG-Verhältnis sank (EMRI et al., 1997). In Arbeiten von PIERAU (pers. Mitteilung) konnte in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung (0,05 mM) keine Akkumulation von GSSG nachgewiesen werden.

In *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 kam es unter Cd(II)-Belastung nach 4tägiger Kultivierung nicht nur zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes, sondern auch zur Bildung von Phytochelatin (Abb. 19; s. Anhang B, Tab. 25). Somit besteht in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 die Möglichkeit der Cd(II)-Komplexierung bzw. -Detoxifikation durch PC₂, da Phytochelatine Metallionen durch eine Thiolatkoordination inaktivieren können (STRASDEIT et al., 1991). Die *in vivo* Bildung von Cd(II)-PC₂-Komplexen in den *H. lugdunensis*-Stämmen wurde jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Die Bildung von Cd(II)-PC-Komplexen konnte u. a. in der Hefe *S. pombe* nachgewiesen werden (KONDO et al., 1983; MURASUGI et al., 1984; HAYASHI et al., 1994). Die Bedeutung der Phytochelatine bei der Cd(II)-Detoxifikation konnte durch die Isolation einer PC-defizienten *S. pombe* Mutante gezeigt werden, da trotz der Bildung von GSH eine Sensitivität gegenüber Cd(II) vorlag (MUTOH und HAYASHI, 1988). Für *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 wäre daher eine Beteiligung von PC₂ in der Cd(II)-Detoxifikation denkbar.

In *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 sank der Gehalt an PC₂, wie auch der von GSH, ab dem 5. Kulturtag. Vermutlich wurden beide Peptide im Verlauf der Kultivierung abgebaut. Eine Abnahme von GSH und PC₂ im Verlauf der Kultivierung konnte auch in *S. pombe* beobachtet werden, eine Erklärung dafür wurde jedoch nicht genannt (LAURO und PLOCKE, 1999).

Im Gegensatz zu *S. pombe*, wo Phytochelatine mit $n > 2$ nachweisbar waren, konnte in der vorliegenden Arbeit bei *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 innerhalb einer Kulturdauer von 12 Tagen keine Synthese von Phytochelatinen $n > 2$ nachgewiesen werden. In *S. cerevisiae* ist jedoch ebenfalls nur die Synthese von PC₂ beschrieben (KNEER et al., 1992). In *S. cerevisiae* konnte kein homologes Gen von *PCSI*, dem PC-Synthase Gen von *S. pombe*, nachgewiesen werden (HA et al., 1999). Die Autoren folgerten, dass in *S. cerevisiae* die Synthese von PCs auf einem anderen, bislang unbekanntem Weg erfolgt. In *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und H8/2/1 konnte, genau wie in *S. cerevisiae*, kein homologes Gen von *PCSI* nachgewiesen werden (PIERAU, pers. Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass die PC-Synthese der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nicht wie in *S. pombe* erfolgt und es, wie bei *S. cerevisiae*, nur zur Bildung von PC₂ kommt.

In der Literatur wird die Bildung der PC-Synthase als konstitutiv beschrieben (HAYASHI et al., 1991). In *S. pombe* wurde bereits nach 5stündiger Cd(II)-Belastung PC₂ und PC₃ nachgewiesen und in *in vitro* Untersuchungen erfolgte die Bildung von Phytochelatinen mit Myzelextrakten aus unbelasteter Kultur (HAYASHI et al., 1988; HAYASHI et al., 1991). *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bildete PC₂ erst nach 4 Tagen. In den Studien von HAYASHI et al. (1988, 1991) zur Phytochelatin-Bildung durch Pilze erfolgte die Zugabe von Cd(II) jedoch zu einer logarithmisch wachsenden Kultur (vergl. Kap. 4.3.2.5), wohingegen in dem vorliegenden Versuch Cd(II) zum Zeitpunkt der Inokulation appliziert wurde. Zu Beginn der logarithmischen Phase kommt es zur ribosomalen Bildung von Enzymen, z. B. Synthasen. Erst im Anschluss daran kann es zur Synthese von weiteren Polypeptiden, wie Phytochelatinen kommen. In *S. pombe* kam es nach Cd(II)-Belastung in der frühen log-Phase nur zu einer geringen Phytochelatinsynthese, da die Transkription und Translation von *PCSI* vermutlich in einer späten log-Phase erfolgten (SIMM, 2000). Dies könnte in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 die erst nach 4 Tagen nachweisbare PC₂-Synthese erklären. Bis zum Einsetzen der Synthese von PC₂ wäre eine Komplexierung des Cd(II) durch GSH denkbar. Eine mögliche Chelatierung und Detoxifizierung von Cd(II) in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 könnte nach 4 Tagen durch die Bildung von Cd(II)-PC₂-Komplexen, aber auch durch Cd(II)-GSH-PC-Komplexe, wie sie in *S. pombe* nachgewiesen werden konnten

(PLOCKE und KÄGI, 1992), erfolgen. Die Hypothese der anfänglichen Cd(II)-Detoxifikation durch GSH, wird durch Untersuchungen in *C. glabrata* gestützt. In *C. glabrata* erfolgte in den ersten 6 h der Cd(II)-Belastung eine Bindung von Cd(II) an GSH, mit zunehmender Kultivierung wurde das Cd(II) durch die Bildung von Cd(II)S-Kristalliten, die von GSH und zunehmend von Phytochelatinen umgeben waren, komplexiert (BARBAS et al., 1992).

Für *S. pombe* ist eine Beteiligung der Phytochelatine am Transport des Cd(II) in die Vakuole beschrieben. Durch ein vakuoläres Membranprotein (HMT1) werden Cd(II)-PC-Komplexe (LMW-Komplexe) in die Vakuole transportiert, wo es zur Bildung von Cd(II)S-PC-Komplexen (HMW-Komplexe) kommt. (ORTIZ et al., 1992). ORTIZ et al. (1995) schreiben dem Transport von Cd(II)-PC-Komplexen in die Vakuole eine wichtige Funktion in der Cd(II)-Toleranz zu, da *S. pombe* mit einer Mutation in *Hmt1* Cd(II) sensitiv war.

In weiteren Studien bleibt zu klären, ob es in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 zur Bildung von Cd(II)-PC₂-Komplexen kommt. Des weiteren wäre ein Nachweis von Vakuolen, sowie ein Transport von LMW-Komplexe in die Vakuole und die Bildung von HMW von Interesse.

Im Gegensatz zum *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 bildet Stamm H8/2/1, wenn die Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation erfolgte, kein Phytochelatin. Es liegen demzufolge stammesspezifische Unterschiede in der Bildung von Phytochelatinen vor. *H. lugdunensis* BB bildete unter Cd(II)-Applikation ebenfalls kein Phytochelatin (MIERSCH et al., 1997). Die Untersuchungen wurden jedoch unter anderen Kulturbedingungen durchgeführt, die Kultivierung erfolgte für 21 Tage bei 20 °C, so dass ein Vergleich mit den Ergebnissen nur bedingt möglich ist.

Die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 bildeten unter Cd(II)-Belastung Metallothioneine (MT1_HL und MT2_HL). Bereits am 3. Tag lag MT1_HL vor, dessen Gehalt in der Kultur von Stamm H4/2/4 am 4. Tag maximal war und innerhalb der folgenden 8 Tage um 85,5 % abnahm. Der MT1_HL-Gehalt in Stamm H8/2/1 änderte sich während der Kultivierung nicht signifikant. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Metallothioneine der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 zeigen eine Homologie zu MT2_COLGL von *C. gloeosporioides*. MT2_COLGL wird bei der Bildung von Appressorien synthetisiert (HWANG und KOLATTUKUDY, 1995). Die Appressorienbildung ist für viele pflanzenpathogene Pilze, wie *C. gloeosporioides*, notwendig, um den Wirt zu durchdringen. Eine Induktion der Appressorienbildung von *C. gloeosporioides* erfolgte durch langkettige

Fettalkohole, die im Wachs der Avocado, dem Wirt, enthaltene sind (HWANG und KOLATTUKUDY, 1995). *In vitro* wurde im Myzel von *C. gloeosporioides* eine Bildung von MT2_COLGL auch durch Cd(II) oder Cu(II) induziert. Unter Cd(II)- oder Cu(II)-Belastung wurde jedoch weniger MT2_COLGL gebildet als bei der Appressorienbildung. Die Autoren folgerten, dass die Bildung von MT2_COLGL mit der Appressorienbildung einhergeht und nicht *a priori* der Schwermetalldetoxifikation dient. Die genaue Funktion von MT2_COLGL Protein in *C. gloeosporioides* ist bisher noch nicht bekannt (HWANG und KOLATTUKUDY, 1995).

Im Gegensatz zu den MTs von *C. gloeosporioides* besitzen die MTs anderer Pilze eine Funktion in der Detoxifikation von Cu(II) und z. T. von Cd(II). In *N. crassa*, *A. bisporus* und *A. niger* ist die Induktion nur durch Cu(II) möglich (LERCH 1980; MÜNGER und LERCH, 1985; GOETHEBEUR et al., 1995). Die Cu(I)-Atome werden durch die Thiolgruppen der Cysteine gebunden (LERCH, 1980). Um eine mögliche *in vivo* Bindung von Cd(II) durch MT nachzuweisen, wurde in *S. cerevisiae* die Kontrolle der Genexpression von *CUP1*, Gen der MT-Synthese, einem konstitutiven Promotor unterstellt (ECKER et al., 1986). Das konstitutiv exprimierte MT erhöhte die Cd(II)-Toleranz von *S. cerevisiae* um das 1000fache (ECKER et al., 1986). Eine Detoxifikation von Cd(II) durch MT ist demzufolge möglich. Später konnte in dem Cd(II)-resistenten Stamm von *S. cerevisiae* 301N und in *B. bassiana* die Induktion der MT-Synthese durch Cd(II) nachgewiesen werden (INOUE et al., 1989; KAMEO et al., 2000). In *H. lugdunensis* wäre eine mögliche Funktion des MT1_HL als Cd(II)-Chelator und somit in der Cd(II)-Detoxifikation denkbar. Zum einen erfolgte die Bildung von MT1_HL nur unter Cd(II)-Belastung, woraus sich erste Hinweise für eine Beteiligung des MTs an der Cd(II)-Detoxifikation ergeben. Zum anderen konnte die Bindung von 2 Cd(II)-Atomen an das MT1_HL des *H. lugdunensis*-Stammes H8/2/1 durch MALDI-PSD Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abb. 18). Das Cd₂-MT war nach Gelfiltration eines ungesäuerten Myzelextraktes nachweisbar, was ein Vorkommen dieses Metalloproteins in *H. lugdunensis in vivo* vermuten lässt.

Der wesentliche Unterschied der zwei *H. lugdunensis*-Stämme in ihrer Reaktion auf Cd(II)-Belastung zum Zeitpunkt der Inokulation besteht darin, dass Stamm H8/2/1 kein PC₂ synthetisiert. Aufgrund der fehlenden PC₂-Synthese in Stamm H8/2/1 kann GSH keine

Funktion als Precursor in der Phytochelatinsynthese zukommen. Ob GSH an der Cd(II)-Detoxifikation beteiligt ist, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

Nach 3tägiger Cd(II)-Belastung lag ein für den untersuchten Zeitraum (3-12 Tage) maximaler GSH-Gehalt von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 vor, Phytochelatin war noch nicht gebildet worden und MT1_HL lag nur in geringen Konzentrationen vor. Es wäre eine erste Komplexierung von Cd(II) durch GSH, wie bereits in *C. glabrata* beschrieben (BARBAS et al., 1992), vorstellbar. Im Verlaufe der Kultivierung könnte vermutlich eine Detoxifikation durch MT1_HL und PC₂ erfolgen. Die gleichzeitige Bildung von sowohl Phytochelatinen als auch Metallothioneinen unter Cd(II)-Belastung ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. In *C. glabrata* und *S. cerevisiae* konnte bei konstitutiver Expression von *CUPI* unter Cd(II)-Belastung keine Akkumulation von Cd(II)-PC-Komplexen nachgewiesen werden (YU et al., 1994). Die Autoren folgerten, dass Phytochelatine in Zellen nur der Schwermetalldetoxifikation dienen, wenn MT-Gene nicht vorhanden sind oder nicht exprimiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der gleichzeitigen Bildung von Phytochelatinen und Metallothioneinen unter Cd(II)-Belastung durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 jedoch nicht bestätigt werden.

4.3.2.4 Bildung thiolhaltiger Peptide und Proteine in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration

Mit zunehmender Cd(II)-Konzentration im Medium kam es in Stamm H4/2/4 zu einem Anstieg des GSH- und GTSH-Gehaltes, sowie des Gehaltes an PC₂ und MT1_HL (Abb. 13 u. 20; s. Anhang B, Tab. 19 u. 27). Wie in Kapitel 3.2.1 bereits erwähnt, stieg in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 auch der intrazelluläre Cd(II)-Gehalt in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration im Medium an. Dies lässt eine Cd(II)-abhängige Induktion der Synthese von GSH, PC₂ und MT1_HL vermuten. Der konzentrationsabhängige Anstieg von GSH und MT1_HL in *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 wird vermutlich ebenfalls auf einem Anstieg der intrazellulären Cd(II)-Konzentration beruhen. Eine Bildung von PC₂ erfolgte allerdings nicht.

In *S. cerevisiae* stieg die Transkription von *GSH1*, Gen der γ -EC Synthetase, unter Cd(II)-Belastung an (VIDO et al., 2001). In einem Modell von COBETT (2000) wird die PC-Synthase durch Cd(II)-GSH oder Cd(II)-PC aktiviert, dies wurde in Studien zur Aktivierung der PC-Synthase in *A. thaliana* bestätigt. Die PC-Synthase von *A. thaliana* wird nicht durch freie Cd(II)-Ionen, sondern durch Cd(II)-GSH aktiviert (VATAMANUIK et al., 2000). In Studien an *S. pombe* konnte hingegen keine Aktivierung der PC-Synthase durch Cd(II) bzw. Cd(II)-GSH nachgewiesen werden. Die MT-Synthase wird in *S. cerevisiae* durch ACE1

reguliert. ACE1 wiederum wird durch Cu(I) aktiviert und bindet an die UAS (Upstream Activation Sequence) von *CUPI*, dem MT-Gen, und es kommt zur Transkription von *CUPI* (s. Kap. 1.4.2.; MACREADIE et al., 1994). In *C. gloeosporioides* induzierte Cd(II) die Transkription der MT-Gene *cap3* und *cap5*, Aussagen zur Regulation der Transkription wurden jedoch nicht gemacht (HWANG und KOLATTUKUDY, 1995).

Dies zeigt, dass eine Regulation der Synthese von GSH, PC oder MT durch das zu komplexierende Schwermetall (Cd(II) oder Cu(II)) erfolgen kann. Die Regulation der GSH-, PC- oder MT-Synthese der *H. lugdunensis*-Stämme durch Cd(II) müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

Der GSH-Gehalt beider Stämme unterschied sich unter Cd(II)-Belastung nicht signifikant, wohingegen der MT1_HL-Gehalt bei 0,05 mM Cd(II) in Stamm H4/2/4 signifikant höher war als in Stamm H8/2/1 (Abb. 20). Bei dieser Belastung waren die intrazellulären Cd(II)-Konzentrationen (3,8 bzw. 3,3 nmol Cd(II) mg⁻¹ TG für Stamm H4/2/4 bzw. H8/2/1; s. Anhang A, Tab. 7 bzw. Anhang B, Tab. 9) nicht signifikant verschieden, wohingegen die Wachstumshemmung von Stamm H4/2/4 15,0 % und die von Stamm H8/2/1 27,2 % betrug (s. Anhang A; Tab. 2 u. 3). Im Gegensatz zu Stamm H8/2/1 synthetisierte Stamm H4/2/4 weiterhin PC₂. Demzufolge war in Stamm H4/2/4 die Möglichkeiten zur Komplexierung des Cd(II) größer und somit könnte Cd(II) eventuell in größerem Umfang detoxifiziert worden sein. Inwieweit dies die Ursache für die um 12,2 % geringere Wachstumshemmung von Stamm H4/2/4 im Vergleich zu Stamm H8/2/1 bei gleicher intrazellulärer Cd(II)-Konzentration war, bleibt zu klären.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Synthese von GSH, PC₂ und MT1_HL in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 von der Cd(II)-Konzentration abhängig ist. Des weiteren konnte auch bei Cd(II)-Konzentrationen von 0,0125 oder 0,025 mM keine PC₂-Synthese in *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 nachgewiesen werden. Die Synthese von GSH und MT1_HL durch Stamm H8/2/1 ist ebenfalls von der Cd(II)-Konzentration abhängig. Die Abhängigkeit der Peptid- bzw. Proteinbildung von der Cd(II)-Konzentration, weist auf eine mögliche Beteiligung in der Cd(II)-Detoxifikation hin.

4.3.2.5 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von thiolhaltigen Peptiden und Proteinen der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der log-Phase

In zahlreichen Pilzstudien zur Induktion von schwermetall-bindenden Peptiden und Proteinen durch Cd(II) oder Cu(II) erfolgte die Zugabe des Schwermetalls während der log-Phase (HAYASHI et al., 1988; HAYASHI und MUTOH, 1994; MEHRA und WINGE, 1988; REESE et al., 1988; MÜNGER et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden daher weitere Versuche durchgeführt, in denen nach 3tägiger unbelasteter Kultivierung der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 0,1 bzw. 0,5 mM Cd(II) appliziert wurde (s. Kap. 2.8.8).

Beide Stämme erreichten nach Cd(II)-Applikation innerhalb eines Tages einen maximalen GSH-Gehalt, der im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 336,4 % erhöht war (Abb. 14, s. Anhang B, Tab. 21 u. 23). GROSS (2000) wies in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Zugabe (0,25 mM) in der logarithmischen Phase im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung des GSH-Gehaltes um 20 % bzw. 90 % nach. Die Erhöhung des GSH-Gehaltes in der Arbeit von GROSS (2000) war deutlich geringer (1/20) als in der vorliegenden Studie bei 0,1 mM Cd(II). Diese differenten Befunde zur GSH-Erhöhung unter Cd(II)-Einfluss könnten auf die unterschiedlichen Inokulationsmethoden zurückgeführt werden (s. Tab. 10). Aufgrund der Inokulation mit homogenisierten Agarstückchen in den Untersuchungen von GROSS (2000) lag zu Beginn der Kultivierung eine lag-Phase vor, so dass zum Zeitpunkt der Cd(II)-Applikation eine geringere Biomasse gebildet worden war, als in der vorliegenden Studie. Dies könnte einen Einfluss auf die GSH-Bildung haben und den geringeren Anstieg des GSH-Gehaltes in der Studie von GROSS (2000) erklären.

Eine Erhöhung des GSH-Gehaltes nach Cd(II)-Belastung konnte auch in anderen Pilzen nachgewiesen werden. Nach Kultivierung einer Mutante von *S. pombe* in einem 0,1 mM Cd(II)-haltigen Medium kam es zu einem 8fachen Anstieg des GSH-Gehaltes. Die Frage, ob GSH an der Detoxifikation von Cd(II) beteiligt war, blieb jedoch ungeklärt. (AL-LAHHAM et al., 1999). Der GSH-Gehalt in *S. cerevisiae* erhöhte sich nach Applikation von 0,5 mM Cd(II) um das 4fache und GSH wurde eine mögliche Funktion in der Cd(II)-Chelatierung zugesprochen (VIDO et al., 2001).

Eine Cd(II)-Komplexierung durch GSH wäre auch in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 denkbar, jedoch kam es neben der Erhöhung des GSH-Gehaltes in der vorliegenden Studie auch zur Bildung von PC₂ (s. Abb. 21). Eine Chelatierung des Cd(II) könnte an den Sulfhydrylgruppen des PCs erfolgen. Es kam zu einer zeitlich verzögerten

maximalen Bildung von PC₂; nach 3-9tägiger Belastung war das Maximum erreicht, wobei gleichzeitig der GSH-Gehalt absank. GRILL et al. (1986) führten die Abnahme des GSH-Gehaltes in *S. pombe* unter Cd(II)-Belastung auf einen Verbrauch des GSHs als Precursor bei der PC-Synthese zurück. HAYASHI et al. (1991) wiesen *in vitro* einen Verbrauch von GSH bei der Phytochelatinsynthese in *S. pombe* nach. Vermutlich kann in den *H. lugdunensis*-Stämmen die Abnahme von GSH und die gleichzeitige Zunahme von PC₂ nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase mit einem Verbrauch von GSH bei der Bildung von PC₂ erklärt werden.

Besonders hervorzuheben ist die Fähigkeit von Stamm H8/2/1 PC₂ zu bilden, wenn Cd(II) nach 3tägiger Kultivierung in unbelastetem Medium appliziert wurde (s. Abb. 21). Es ist zur Zeit nicht erklärbar, warum in Stamm H8/2/1 eine Bildung von PC₂ nur nach Cd(II)-Belastung in der logarithmischen Phase erfolgte. GRILL et al. (1986) beschrieben bereits eine Abhängigkeit der Phytochelatinsynthese vom Zeitpunkt der Cd(II)-Applikation. Wenn Cd(II) in der frühen Wachstumsphase von *S. pombe* hinzugegeben wurde, überwog PC₂; erfolgte die Cd(II)-Applikation in einer späten Wachstumsphase, so war der Gehalt an PC₃ größer als der von PC₂. Eine Abhängigkeit der PC-Synthese vom Zeitpunkt der Belastung in *S. pombe* wurde auch in Untersuchungen von SIMM (2000) festgestellt. Bei Cd(II)-Zugabe in der frühen logarithmischen Phase kam es zu einer geringeren PC-Synthese als nach Cd(II)-Belastung in der spät-logarithmischen Phase. Der physiologische Zustand des Pilzes zum Zeitpunkt der Cd(II)-Applikation scheint somit einen entscheidenden Einfluss auf die PC-Synthese zu haben. Dies könnte ein erster Hinweis für die Abhängigkeit der PC₂-Synthese von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 vom Zeitpunkt der Cd(II)-Belastung sein.

Höhermolekulare Phytochelatine, $n > 2$, wurden in der vorliegenden Arbeit auch unter den veränderten Versuchsbedingungen, Zugabe des Cd(II) während der logarithmischen Phase, nicht gebildet.

Neben der Erhöhung des GSH-Gehaltes und der Bildung von PC₂, kam es unter Cd(II)-Belastung zur Induktion der MT-Synthese (s. Abb. 21). *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 erreichte nach 3tägiger Kultivierung unter 0,1 mM bzw. 0,5 mM Cd(II) seinen maximalen MT1_HL-Gehalt, der dann konstant blieb. Demgegenüber konnte in Stamm H8/2/1 nur bei einer Konzentration von 0,5 mM Cd(II) nach 3tägiger Belastung ein konstanter Gehalt an

MT1_HL beobachtet werden, während bei 0,1 mM Cd(II) der Gehalt nach 9tägiger Belastung wieder abnahm. In *N. crassa* kam es bei Belastung mit 0,5 mM Cu(II) innerhalb von 4 h zur Bildung eines maximalen MT-Gehaltes, der dann konstant blieb (MÜNGER et al., 1987). Dem Metallothionein wurde daher eine wichtige Funktion in der Metallhomöostase zugeschrieben. Eine Beteiligung des MT1_HL an der Metallhomöostase bei den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 kann jedoch bislang ausgeschlossen werden, da ein Nachweis von MT1_HL in unbelasteten Kontrollen negativ ausfiel. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass MT1_HL eine Rolle in der Cd(II)-Detoxifikation zukommt, da eine Bindung von Cd(II) durch MT1_HL vermutlich *in vivo* möglich war (Abb. 18). Der MT1_HL-Gehalt nahm in beiden *H. lugdunensis*-Stämmen mit zunehmender Cd(II)-Konzentration ab, wohingegen nach Cd(II)-Belastung zum Zeitpunkt der Inokulation eine konzentrationsabhängige Bildung von MT1_HL erfolgte (s. Kap. 4.3.2.4). Eine Erklärung dafür ist zur Zeit nicht möglich.

Nach Cd(II)-Belastung der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 in der log-Phase war nach eintägiger Cd(II)-Belastung eine Erhöhung des GSH-, PC₂- und MT1_HL-Gehaltes nachweisbar, so dass eine Komplexierung von Cd(II) durch die thiolhaltigen Peptide und Proteine möglich wäre. Nach 3tägiger Kultivierung unter Cd(II)-Stress war der maximale Gehalt an PC₂ und MT1_HL erreicht und der Gehalt an GSH, Precursor der PC₂-Synthese, nahm gleichzeitig ab. In *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 ist die PC₂-Synthese von dem Zeitpunkt der Cd(II)-Belastung abhängig. Wenn die Belastung in der logarithmischen Phase erfolgte, war eine PC₂-Synthese möglich. Im Gegensatz dazu wurde nach Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation kein PC₂ synthetisiert (s. Kap. 4.3.2 und 4.3.3).

Das Wachstum wurde unter Cd(II)-Belastung in beiden Stämmen durch die Zugabe von Cd(II) gehemmt (s. Anhang A, Tab. 6 u. 7).

4.3.3 Modell der Cd(II)-Detoxifikation von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und H8/2/1

In Abbildung 23 ist die mögliche Entgiftung von Cd(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und H8/2/1, für den Fall, dass die Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase erfolgt, schematisch dargestellt.

Die physiologisch-biochemische Reaktion der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 auf Cd(II)-Belastung ist die Erhöhung des GSH-Gehaltes, sowie die Bildung von PC₂ und

MT1_HL und MT2_HL. Ob eine Komplexierung des Cd(II) durch GSH, wie bereits in *C. glabrata* beschrieben (BARBAS et al., 1992), in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 erfolgt, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Auch ein möglicher Transport des Cd(II) als Cd(II)-(GS)₂ über einen ABC-Transporter in die Vakuole, wie bereits in *S. cerevisiae* von LI et al. (1997) beschrieben, bleibt zu untersuchen.

Phytochelatin wird in Pilzen, wie *S. pombe*, eine wichtige Funktion in der Cd(II)-Detoxifikation zugeschrieben (MUTOH und HAYASHI, 1988; COBLENZ und WOLF, 1994), daher wäre in den *H. lugdunensis*-Stämmen eine Detoxifikation von Cd(II) durch PC₂ und somit die Bildung von LMW vorstellbar. In *S. pombe* wurden Cd(II)-PC-Komplexe (LMW) über ABC-Transporter in die Vakuole transportiert und es kam dort durch Einlagerung von Sulfid zur Bildung von Cd(II)S-PC-Komplexen (HMW) (ORTIZ et al., 1992, 1995; OW, 1993). Ob die Bildung von LMW und HMW eine Rolle in der Cd(II)-Detoxifikation der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 spielt, sollten weiterführende Studien untersuchen.

Eine zusätzliche Beteiligung des gemischten Disulfids an der Cd(II)-Komplexierung wäre aufgrund der Thiolgruppen denkbar.

Da eine Bindung von Cd(II) an MT1_HL *in vivo* möglich erscheint, könnte in den *H. lugdunensis*-Stämmen eine Detoxifikation von Cd(II) durch MT1_HL erfolgen. MT2_HL kam nur in Spuren vor, so dass es wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle in der Cd(II)-Detoxifikation spielt.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals die gleichzeitige Bildung von Phytochelatin und Metallothioneinen unter Cd(II)-Belastung in *H. lugdunensis* und in Pilzen nachgewiesen werden.

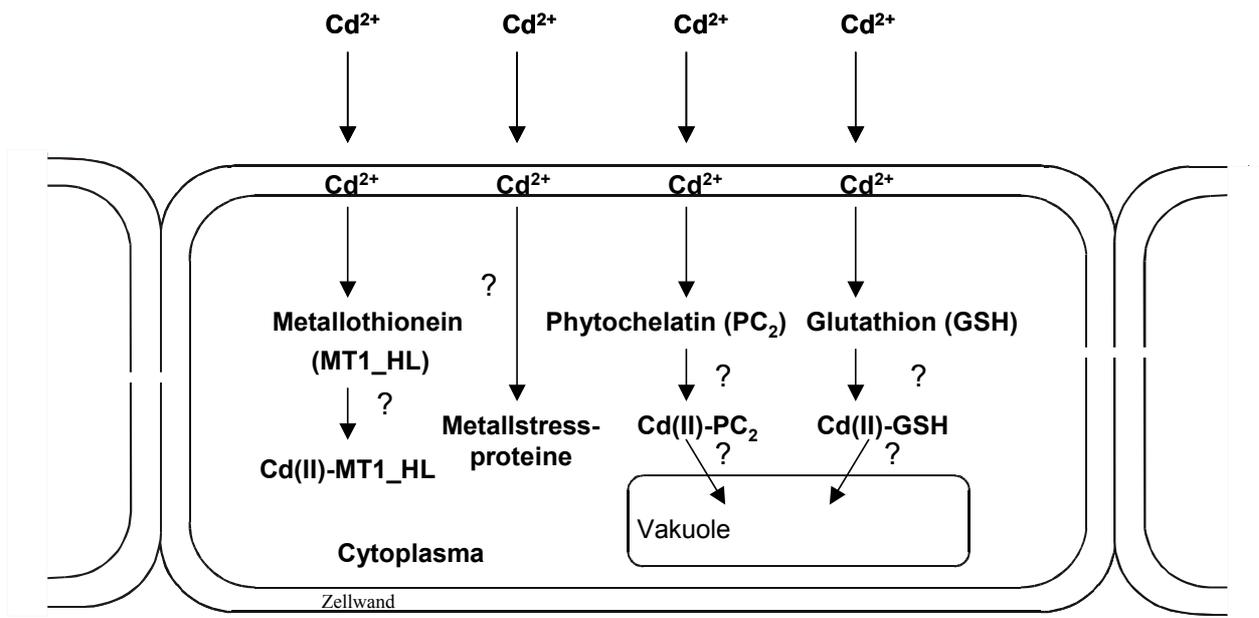


Abb. 23 Möglichkeiten der Cd(II)-Detoxifikation in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase.

5 Zusammenfassung

Aquatischen Hyphomyceten wurde eine hohe Sensitivität gegenüber Schadstoffen zugesprochen. Dennoch konnten durch unsere Arbeitsgruppe zahlreiche aquatische Hyphomyceten aus schwermetallbelasteten Haldensickerwässern des Mansfelder Landes isoliert werden. Ihre physiologisch-biochemische Reaktion auf Schwermetallbelastung ist weitgehend unbekannt. Daher wurden aquatische Hyphomyceten, aber auch terrestrische Hyphomyceten aus Haldensickerwässern bezüglich ihrer Schwermetalltoleranz und -antwort getestet.

1. Wachstumsuntersuchungen in Oberflächen- und in Flüssigkultur sollten über die Schwermetalltoleranz der getesteten Pilze Aufschluss geben.
2. Die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) wurde in ausgewählten Pilzen bestimmt und verglichen.
3. Eine mögliche Detoxifikation von Cd(II) durch die Bildung von thiolhaltigen Peptiden und Proteinen war zu untersuchen.

Sowohl die aquatischen Hyphomyceten (*H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und H8/2/1) als auch die terrestrischen Hyphomyceten (*Phialophora*-sp. Stamm H3/P/5, H3/P/7 und H4/P/12, sowie *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15) wuchsen in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur. Die Stämme H4/2/4 und H8/2/1 des aquatischen Hyphomyceten *H. lugdunensis* wiesen eine I_{50} -Konzentration von 0,2 bzw. 0,3 mM Cd(II) auf und zeigten ein Wachstum bis 1 mM Cu(II) oder Zn(II).

Die Stämme von *Phialophora* sp. und *V. cf. alboatrum* hatten I_{50} -Werte von bis zu 10 mM Cd(II), Cu(II) oder Zn(II) und wuchsen im Vergleich zu den *H. lugdunensis*-Stämmen noch unter bis zu 10fach höheren Schwermetallkonzentrationen.

Demzufolge waren die terrestrischen Pilze wesentlich schwermetalltoleranter als die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1. Die Hemmung des Wachstums der getesteten Pilze nahm in der Reihenfolge Cd(II) > Cu(II) > Zn(II) ab.

In Flüssigkultur lag in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 eine 50 %-ige Wachstumshemmung unter 0,05 bzw. 0,1 mM Cd(II) und 0,3 mM Cu(II) oder Zn(II) vor.

Der terrestrische Hyphomycet *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 war mit einer 50 %-igen Wachstumshemmung zwischen 0,7 und 0,9 mM Cd(II), 0,5 mM Cu(II) und zwischen 10 und 20 mM Zn(II) wesentlich schwermetalltoleranter als die *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1.

Die Schwermetalltoleranz der *H. lugdunensis*-Stämme nahm folgendermaßen zu: Cd(II) < Cu(II) < Zn(II), wohingegen die Schwermetalltoleranz von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in der Reihenfolge Cu(II) < Cd(II) < Zn(II) anstieg.

In der Literatur gibt es bisher keine eindeutigen Hinweise, ob Pilzstämme aus einem schwermetallkontaminierten Gewässer toleranter sind, als solche aus unbelasteten Gewässern. In der vorliegenden Arbeit konnten keine eindeutigen Belege für eine derartige Hypothese erbracht werden. Standort H4 zeichnet sich durch einen besonders hohen Zn(II)-Belastung aus. Doch der aus diesem Standort isolierte *H. lugdunensis* Stamm wies nur eine signifikant höhere Cd(II)-Toleranz als der *H. lugdunensis* Stamm aus gering belastetem Standort auf.

Die Biosorption und Akkumulation von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 sowie *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 sind konzentrationsabhängige Prozesse.

Die Biosorption von Cd(II) und Zn(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 war nicht signifikant verschieden. Bei einer Cd(II)- bzw. Zn(II)-Konzentration von 0,1 mM war in *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 die Akkumulation von Zn(II) um 113 % höher als die von Cd(II). Eine 50 %-ige Wachstumshemmung lag im Vergleich zu Cd(II) erst bei einem um 404 % höheren akkumulierten Zn(II)-Gehalt vor. Cd(II) war toxischer als Zn(II).

Unter einer Belastung von 1 mM Cd(II) war die Biosorption von Cd(II) durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 um 123 % höher als die Zn(II)-Biosorption unter 10 mM Zn(II). Unter dieser SM-Belastung war die Akkumulation von Zn(II) um 58 % höher als die von Cd(II). Trotz der höheren Zn(II)-Akkumulation lag nur eine Wachstumshemmung von 28 % vor, wohingegen das Wachstum bei 1 mM Cd(II) zu 70 % gehemmt war. Somit war Cd(II) toxischer als Zn(II).

Insgesamt galt für Cd(II): Biosorption > Akkumulation und für Zn(II): Akkumulation > Biosorption.

H. lugdunensis-Stamm H4/2/4 biosorbierte und akkumulierte bis zu 13,4 bzw. 39,3fach höhere Schwermetallmengen als *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15. Die unterschiedliche Biosorption von Cd(II) und Zn(II) durch die getesteten Pilze lässt differente

Zellwandzusammensetzungen vermuten. Die geringe Cd(II)- und Zn(II)-Akkumulation von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 erklärt vermutlich die im Vergleich zu *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 hohe Cd(II)- und Zn(II)-Toleranz.

In der vorliegenden Arbeit konnte in aquatischen Hyphomyceten erstmals die Bildung von Phytochelatin (PC₂) und Metallothioneinen (MT1_HL/MT2_HL) unter Cd(II)-Belastung nachgewiesen werden.

Die konzentrationsabhängige Zunahme des PC₂ und MT1_HL-Gehaltes lassen eine Cd(II)-abhängige Induktion der PC₂- und MT1_HL-Synthese vermuten. Phytochelatine können Metallionen durch eine Thiolatkoordination inaktivieren (STRASDEIT et al., 1991), daher wäre in den *H. lugdunensis*-Stämmen eine Cd(II)-Komplexierung bzw. -Detoxifikation durch PC₂ vorstellbar. Hinweise auf eine mögliche *in vivo* Bindung von 2 Cd(II)-Atomen durch MT1_HL wurden durch MALDI-PSD erhalten. Neben PC₂ wäre eine Chelatierung von Cd(II) durch MT in den *H. lugdunensis*-Stämmen möglich. Die genaue Funktion von PC₂ und MT1_HL in der Cd(II)-Detoxifikation konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Eine gleichzeitige Induktion von Phytochelatin und Metallothioneinen unter Cd(II)-Belastung ist in Pilzen bislang noch nicht beschrieben worden.

Bezüglich der Stressantwort unter Cd(II)-Belastung, die in der Synthese von Cd(II)-bindenden Peptiden bzw. Proteinen gesehen wird, konnten stammesspezifische Unterschiede nachgewiesen werden. So kam es in *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 nicht zur Bildung von PC₂, wenn die Cd(II)-Belastung zum Zeitpunkt der Inokulation erfolgte, während *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 PC₂ bildete und gleichzeitig eine geringere Wachstumshemmung aufwies.

Neben der Bildung von PC₂ und MT lag unter Cd(II)-Belastung ein erhöhter GSH-Gehalt vor. GSH könnte als Precursor der PC-Synthese fungieren. In Stamm H8/2/1 kam es nach Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation zu einem Anstieg des GSH-Gehaltes, jedoch nicht zur Bildung von PC₂. Die Aufgabe von GSH in diesem Zusammenhang ist bislang noch unklar.

6 Ausblick

- In Biosorptions- und Akkumulationsstudien wies *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 im Gegensatz zu *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 eine geringe Biosorption von Cd(II) und Zn(II) auf. Dies lässt unterschiedliche Zellwandkomponenten vermuten. Eine Zellwandanalyse der beiden Pilze würde dazu beitragen, die Biosorption besser zu verstehen.

Des Weiteren könnte die Beantwortung der Frage, ob *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 aufgrund von Zn(II)-Transportern mit einer niedrigen Zn(II)-Affinität oder wegen eines Efflux' von Zn(II) geringe Mengen an Zn(II) akkumuliert, ein Schwerpunkt künftiger Arbeiten sein.

- In der vorliegenden Arbeit konnte in den *H. lugdunensis*-Stämmen H4/2/4 und H8/2/1 unter Cd(II)-Belastung die Induktion von PC₂ und Metallothioneinen, sowie ein Anstieg des GSH-Gehaltes nachgewiesen werden.

Interessant wären Untersuchungen zur Bildung von Cd(II)-GSH- und Cd(II)-PC₂-Komplexen, sowie Cd(II)S-Kristalliten, die von GSH und/oder PC₂ umgeben sind.

Ein Nachweis von Cd(II)-GSH- bzw. Cd(II)-PC₂-Komplexen könnte durch die Aufnahme von EEL-Spektren und einem Vergleich der Spektren mit entsprechenden Standards erfolgen.

Außerdem wäre durch Einzelzellanalytik ein Nachweis der Komplexe möglich, sowie deren Lokalisation in der Zelle.

Die Bildung von Cd(II)S-Kristalliten könnte, wie bereits in der Literatur beschrieben (DAMERON et al., 1989; BARBAS et al., 1992), nach Gelfiltration in den eluierten Fraktionen untersucht werden. In den Cd(II)-enthaltenen Fraktionen wäre ein Nachweis der Cd(II)S-Kristallite durch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums in den roten UV-Bereich (320-370 nm) möglich. Außerdem könnte die Bestimmung des GSH- und PC₂-Gehaltes der Fraktionen erste Hinweise darüber geben, ob die Cd(II)S-Kristallite von GSH und/ oder PC₂ umgeben sind.

Es wurde die Bindung von 2 Cd(II) durch MT1_HL nachgewiesen. Eine mögliche Abspaltung von Cd(II) durch die Ionisierungsenergie in der Massenspektrometrie kann jedoch nicht

ausgeschlossen werden. Die Bestimmung des Cd(II) : MT1_HL-Verhältnisses kann durch Isolation des Cd(II)-MT1_HL-Komplexes mittels Gelfiltration und anschließender Bestimmung des Protein- und Cd(II)-Gehaltes erfolgen (MÜNGER und LERCH, 1985). Des Weiteren könnte durch die Aufnahme von CD-Spektren von apoMT und apoMT + Cd(II) eine Bindung von Cd(II) an das MT durch eine Absorptionsverschiebung nachweisen (BELTRAMINI et al., 1984).

Das Metallothionein-Gen ist bereits u. a. in *S. cerevisiae* und *C. glabrata* beschrieben worden (MACREADIE et al., 1994). Molekularbiologische Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben, ob in den *H. lugdunensis*-Stämmen eine homologe Genstruktur vorhanden ist.

In der Literatur ist eine Induktion der PC-Synthese durch Cd(II), Cu(II) und Zn(II) beschrieben, sowie die Induktion der MT-Synthese durch Cd(II) oder Cu(II) (vergl. Tab. 2). Daher wäre es von Interesse, die Induktion der PC₂- und MT1_HL-Synthese durch andere Schwermetalle in den *H. lugdunensis*-Stämmen zu untersuchen.

Ein Nachweis der Cd(II)-Detoxifikation durch MT1_HL und PC₂ wäre durch PC₂- und MT_HL-defiziente Mutanten der *H. lugdunensis*-Stämme möglich. So wurde bereits in *S. pombe* die Beteiligung von PC an der Cd(II)-Detoxifikation mit Hilfe einer PC-defizienten Mutante, die unter Cd(II)-Belastung kein Wachstum aufwies, gezeigt (MUTOH und HAYASHI, 1988).

7 Literaturverzeichnis

ABEL, T. H.; BÄRLOCHER, F. (1984): Effect of cadmium on aquatic hyphomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 48 (2): 245-251

ABEL, T.; BÄRLOCHER, F. (1988): Uptake of cadmium by *Gammarus fossarium* (Amphipoda) from food and water. J. Appl. Ecol. 25: 223-231

AKTAR, N.; MOHAN, P. M. (1995): Bioremediation of toxic metal ions from polluted lake waters and industrial effluents by fungal biosorbent. Curr. Sci. 69 (12): 1028-1030

AL-LAHHAM, A.; ROHDE, V.; HEIM, P.; LEUCHTER, R.; VEECK, J.; WUNDERLICH, C.; WOLF, K. und Zimmermann, M. (1999): Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast 15: 385-396

ANDERSON, M. E. (1985): Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth. Enzymol. 113: 548-555

ATLAS, R. M. (1993): Microbiological Media In: PARKS, L. C. CRC Press, New York, London, Tokyo: 800

ABMANN, S.; SIGLER, K.; HÖFER, M. (1996): Cd²⁺-induced damage to yeast plasma membrane and its alleviation by Zn²⁺: studies on *Schizosaccharomyces pombe* cells and reconstituted plasma membrane vesicles. Arch. Microbiol. 165: 279-284

AVERBECK, N. B.; BORGHOUUTS, C.; HAMANN, A.; OSIEWACZ, H. -D. (2001): Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 264: 604-612

BABICH, H.; STOTZKY, G. (1977): Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. Appl. Environ. Microbiol. 33 (3): 681-695

BABICH, H.; STOTZKY, G. (1982): Influence of chloride ions on the toxicity of cadmium to fungi. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3: 421

BABICH, H.; STOTZKY, G. (1983): Further studies on environmental factors that modify the toxicity of nickel to microbes. Reg. Toxicol. Pharmacol. 3: 82-99

BÄRLOCHER, F. (1992): Community organization. In: BÄRLOCHER, F. (Ed.): The Ecology of Aquatic Hyphomycetes. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 38-76

BÄRLOCHER, F.; KENDRICK, B. (1974): Dynamics of the fungal population on leaves in a stream. J. Ecol. 62: 761-791

- BÄRLOCHER, F.; KENDRICK, B. (1975): Assimilation efficiency of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphopoda) feeding on fungal mycelium or autumn-shed leaves. OIKOS 26: 55-59
- BÄRLOCHER, F.; KENDRICK, B. (1981): Role of aquatic hyphomycetes in the trophic structure of stream. In: WICKLOW, D. T. und CARROL, G. C.: The Fungal Community, its Organization and Role in the Ecosystem. Marcel Dekker Inc., New York, Basel: 743-760
- BARBAS, J.; SANTHANAGOPALAN, V.; BLASZCZYNSKI, M.; ELLIS JR., W. R.; WINGE, D. R. (1992): Conversion in the peptides coating cadmium:sulfide crystallites in *Candida glabrata*. J. Inorg. Biochem. 48: 95-105
- BELTRAMINI, M.; LERCH, K.; VASAK, M. (1984): Metal substitution of *Neurospora crassa* metallothionein. Biochem. 23: 3422-3427
- BERMINGHAM, S. (1996): Effects of pollutants on aquatic hyphomycetes colonizing leaf material in freshwater. In: FRANKLAND, J. C.; MAGAN, N. und GADD, G. M. (Eds.): Fungi and Environmental Change. University Press, Cambridge: 201-216
- BERMINGHAM, S.; MALTBY, L.; COOKE, R. C. (1996a): Effects of a coal mine effluent on aquatic hyphomycetes. I. Field study. J. Appl. Ecol. 33: 1311-1321
- BERMINGHAM, S.; FISHER, P. J.; MARTIN, A.; MARRIOTT, M.; LAPPIN-SCOTT, H. (1998): The effect of the herbicide mecoprop on *Heliscus lugdunensis* and its influence on the preferential feeding of *Gammarus pseudolimnaeus*. Microb. Ecol. 35: 199-204
- BEVERIDGE, T. J.; HUGHES, M. N.; LEE, H.; LEUNG, K. T.; POOLE, S.; SILVER, S.; TREVORS, J. T. (1997): Metal- microbe interaction: contemporary approaches. Adv. Microb. Physiol. 38, 177-243
- BHANOORI, M.; VENKATESWERLU, G. (2000): In vivo chitin-cadmium complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta 1523: 21-28
- BINZ, P. -A.; KÄGI, J. H. R. (1999): Metallothionein: molecular evolution and classification. In: KLAASEN, C. (Ed.): Metallothionein IV. Birkhäuser Verlag, Basel: 7-13
- BROWN, D. H.; WELLS, J. M. (1988): Sequential elution technique for determining the cellular location of cations. In: GLIME, J. M. (Ed.): Methods in Bryology. Proc. Bryol. Method Workshop, Mainz, Hattori Bot. Lab. Nichinan: 227-233
- BRUNS, I.; SUTTER, K.; MENGE, S.; NEUMANN, D.; KRAUSS, G. -J. (2001): Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. J. Plant Physiol. 158: 79-89
- BUDD, K. (1991): A cadmium-tolerant strain of *Neocosmospora vasinfecta* shows reduced cadmium influx. Can. J. Bot. 69: 1296-1301
- CARLILE, M. J. und WATKINSON, S. C. (1994): The Fungi. Academic Press, London, Boston, San Diego, New York, Sydney, Tokyo: 102-109

- CLEMENS, A.; KIM, E. J.; NEUMANN, D.; SCHROEDER, J. I. (1999): Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18 (12): 3325-3333
- COBBETT, C. S.; GOLDSBROUGH, P. B. (2000): Mechanism of metal resistance: phytochelatins and metallothioneins. In: RASKIN, I. und ENSLEY, B. D. (Eds.): *Phytoremediation of Toxic Metals*. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: 247-269
- COBLENZ, A.; WOLF, K. (1994): The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 303-308
- COBLENZ, A. (1995): Untersuchungen zur Biosynthese von Glutathion bei *Schizosaccharomyces pombe*: Charakterisierung der γ -Glutamylcystein-Synthetase
Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen
- COHEN, A.; NELSON, H.; NELSON, N. (2000): The family of *SMF* metal ion transporters in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 275 (43): 33388-33394
- COLLINS, Y. E.; STOZKY, G. (1989): Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. In: BEVERIDGE, T. J. und Doyle, R. J. (Eds.): *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: 31-90
- COLLINS, Y. E.; STOTZKY, G. (1992): Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (5): 1592-1600
- DAMERON, C. T.; SMITH, B. R.; WINGE, D. R. (1989): Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J. Biol. Chem.* 264 (29): 17355-17360
- DAMERON, C. T.; HARRISON, M. D. (1998): Mechanism for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1091-1097
- DANCIS, A.; HAILE, D.; YUAN, D. S.; KLAUSNER, R. D. (1994): The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Crt1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* 269 (41): 25660-25667
- DEL VAL, C.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. (1999): Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11: 261-269
- DIAZ-CRUZ, M. S.; MENDIETA, J.; TAULER, R.; ESTEBA, M. (1997): Cadmium-binding properties of glutathione: a chemometrical analysis of voltammetric data. *J. Inorg. Biochem.* 66: 29-36
- DIX, N. J.; WEBSTER, J. (1995): Aquatic fungi. In: *Fungal Ecology*. Chapman & Hall, London: 225-265
- DOERFFEL, K. (1990): *Statistik in der analytischen Chemie*. 5. Aufl., Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig

- DUDDRIDGE, J. E.; WAINWRIGHT, M. (1980): Heavy metal accumulation by aquatic fungi and reduction in viability of *Gammarus pulex* fed Cd²⁺ contaminated mycelium. Wat. Res. 14: 1605-1611
- ECKER, D. J.; BUTT, T. R.; STERNBERG, E. J.; NEEPER, M. P.; DEBOUCK, C.; GORMAN, J. A.; CROOKE, S. T. (1986): Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. J. Biol. Chem. 261, (36): 16895-16900
- ELLMANN, G. L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77
- ELSKENS, M. T.; JASPERS, C. J.; PENNINGCKX, M. J. (1991): Glutathione as an exogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 137: 637-644
- EMRI, T.; POSCI, I.; SZENTIRMAI, A. (1997): Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. Free Radical Biol. Med. 23 (5): 809-814
- FAILLA, M. L.; BENEDICT, C. D.; WEINBERG, E. D. (1976): Accumulation and storage of Zn²⁺ by *Candida utilis*. J. Gen. Microbiol. 94: 23-36
- FOUREST, E.; ROUX, J. -C. (1992): Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanism and influence of pH. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 399-403
- FURST, P.; HU, S.; HACKETT, R.; HAMER, D. (1988): Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. Cell 55: 705
- GABRIEL, J.; KOFRONOVA, O.; RYCHLOVSKY, P.; KRENZELOL, M. (1996): Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycete *Daedalea quercina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57: 383-390
- GADD, G. M. (1983): The use of solid medium to study effects of cadmium, copper and zinc on yeasts and yeast-like fungi: applicability and limitations. J. Appl. Bact. 54: 57-62
- GADD, G. M. (1984): Effect of copper on *Aureobasidium pullulans* in solid medium. Trans. Brit. Mycol. Soc. 82: 546-549
- GADD, G. M. (1990): Metal tolerance. In: EDWARDS, C. (Ed.): Microbiology of Extreme Environments. Open University Press, Great Britain: 178-210
- GADD, G. M. (1993): Interactions of fungi with toxic metals. New Phytol. 124: 25-60
- GADD, G. M.; SAYER, J. A. (2000): Influence of fungi on the environmental mobility of metals and metalloids. In: LOVLEY, D. R. (Ed.): Environmental Microbe-Interactions. ASM Press, Washington, D. C.: 237-256
- GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Sci. 121: 151-159

- GARDEA-TORRESDAY, J. L.; CANO-AGUILERA, I.; WEBB, R.; GUTIÉRREZ-CORONA, F. (1997): Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. Environ. Toxicol. Chem. 16 (3): 435-441
- GOETGHEBEUR, M.; KERMASHA, S.; KENSLEY, J.; METCHE, M. (1995): Purification and characterization of copper-metallothionein from *Aspergillus niger* by affinity chromatography. Biotechnol. Appl. Biochem. 22: 315-325
- GRILL, E.; WINNACKER, E. -L.; ZENK, M. H. (1985): Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674-676
- GRILL, E.; WINNACKER, E.-L.; ZENK, M. H. (1986): Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. FEBS Lett. 197 (1,2): 115-120
- GRILL, E.; LÖFFLER, S.; WINNACKER, E. -L.; ZENK, M. H. (1989): Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6838-6842
- GRILL, E.; WINNACKER, E. -L.; ZENK, M. H. (1991): Phytochelatins. Meth. Enzymol. (205): 333-341
- GRECO, M. A.; HRAB, D. I.; MAGNER, W.; KOSMAN, D. (1990): Cu, Zn superoxide dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 172 (1): 317-325
- GROB, N. (2000): Untersuchungen zu Wachstum und physiologisch-biochemischer Leistung des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Therry. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- HA, S. -B.; SMITH, A. P.; HOWDEN, R.; DIETRICH, W. M.; BUGG, S.; O'CONNEL, M. J.; GOLDSBROUGH, P. B.; COBBETT, C. S. (1999): Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell 11: 1153-1163
- HAMER, D. H. (1986): Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55: 913-951
- HAYASHI, Y.; NAKAGAWA, C. W.; UYAKUI, D.; IMAI, K.; ISOBE, M.; GOTO, T. (1988): The change of cadystin components in cd-binding peptides from the fission yeast during their induction by cadmium. Biochem. Cell Biol. 66: 288-295
- HAYASHI, Y.; NAKAGAWA, C. W.; MUTOH, N.; ISOBE, M.; GOTO, T. (1991): Two pathways in biosynthesis of cadystins (γ -EC)_nG in the cell free system of the fission yeast. Biochem. Cell Biol. 69: 115-121
- HAYASHI, Y.; MUTOH, N. (1994): Cadystin (Phytochelatin) in fungi. In: WINKELMANN, G. und WINGE, D. R. (Eds.): Metal Ions in Fungi. Marcel Dekker, New York: 311-337

- HOWE, R.; EVANS, R. L.; KETTERIDGE, S. W. (1997): Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 135: 123-131
- HOWLETT, N. G.; AVERY, S. V. (1997a): Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 539-545
- HOWLETT, N. G.; AVERY, S. V. (1997b): Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (8): 2971-2976
- HUANG, C. -P.; HUANG, C -Pao; MOREHART, A. L. (1990): The removal of Cu(II) from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *Wat. Res.* 24 (4): 433-439
- HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. (1991): Metal speciation and microbial growth - the hard and soft facts. *J. Gen. Microbiol.* 137: 725-734
- HWANG, C. -S.; KOLATTUKUDY, P. E. (1995): Isolation and characterization of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia induced by the host surface wax. *Mol. Gen. Genet.* 247: 282-294
- INOUE, Y.; TRAN, L.-T.; KAMAKURA, M.; IZAWA, S.; MIKI, T.; TSUJIMOTO, Y.; KIMURA, A. (1995): Oxidative stress response in yeast: glutathione peroxidase of *Hansenula mrakii* is bound to the membrane of both mitochondria and cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* 1245: 325-330
- INOUE, M.; HIYAMA, M.; TOHOYAMA, H.; JOHO, M.; MURAYAMA, T. (1989): Cadmium-binding protein in a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 993: 51-55
- INOUE, M.; INAGAWA, A.; MORITA, M.; TOHOYAMA, H.; JOHO, M.; MURAYAMA (1991): Native cadmium-metallothionein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its primary structure and function in heavy metal resistance. *Plant Cell. Physiol.* 32 (4): 475-482
- INOUE, M.; SUMIYOSHI, M.; TOHOYAMA, H.; JOHO, M. (1996): Resistance to cadmium ions and formations of a cadmium-binding complex in various wild-type yeasts. *Plant Cell. Physiol.* 37 (3): 341-346
- JEYAPRAKASH, A.; WELCH, J. W.; FOGEL, S. (1991): Multicopy CUP1 plasmids enhance cadmium and copper resistance levels in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 225: 363-368
- JOHO, M.; FUJIOKA, Y.; MURAYAMA, T. (1985): Further studies on the subcellular distribution of Cd²⁺ in Cd-sensitive and Cd-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3185-3191
- JORDAN, M. J.; LECHEVALIER, M. P. (1975): Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. *Can. J. Microbiol.* 21: 1855-1865

- KAMEO, S.; IWAHASHI, H.; KOJIMA, Y.; SATOH, H. (2000): Induction of metallothioneins in the heavy metal resistant fungus *Beauveria bassiana* exposed to copper or cadmium. *Analisis* 28 (5): 382-385
- KAMIZONO, A.; NISHIZAWA, M.; TERANISHI, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. (1989): Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 161-167
- KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. (1996): Biosorption of heavy metal on fungal biomass. 4th *Environ. Engineer. Special. Conf.*: 333-343
- KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. (1997a): Fungi as biosorbents. In: WASE, J. und Forster, C. (Eds.): *Biosorbents for Metal Ions*. Taylor & Francis, London, Bristol: 67-85
- KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. (1997b): Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 61: 221-227
- KISTLER, M.; SUMMER, K. H.; ECKARDT, F. (1986): Isolation of glutathione deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 173: 117-120
- KNEER, R.; ZENK, M. H. (1992): Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochem.* 31 (8): 2663-2667
- KNEER, R.; KUTCHAN, T. M.; HOCHBERGER, A.; ZENK, M. H. (1992): *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157: 305-310
- KÖHLER, M.; VÖLSGEN, F. (1998): *Geomikrobiologie*. Wiley-VCH, Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: 36
- KONDO, N.; ISOBE, M.; IMAI, K.; GOTO, T.; MURASUGI, A.; HAYASHI, Y. (1983): Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Tetr. Lett.* 24 (9): 925-928
- KONDO, N.; IMAI, K.; ISOBE, M.; GOTO, T. (1984): Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast-----separation, revision of structures and synthesis. *Tetr. Lett.* 25 (35): 3869-3872
- KOJIMA, Y.; BINZ, P. -A.; KÄGI, J. H. R. (1999): Nomenclature of metallothionein: proposal for a revision. In: KLAASEN, C. (Ed.): *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel: 3-6
- KRANTZ-RÜLCKER, C.; ALLARD, B.; SCHNÜRER, J. (1993): Interactions between a soil fungus, *Trichoderma harzianum*, and IIb metals- adsorption to mycelium and production of complexing metabolites. *BioMetals* 6: 223-230
- KRAUSS, G.; BÄRLOCHER, F.; SCHRECK, P.; KRANICH, W.; MIERSCH, J.; DERMIETZEL, J.; WENNRICH, R.; KRAUSS, G. -J. (1998): Aquatic Hyphomycetes at extremely polluted sites in the Mansfelder Land Area. In: BECKER, P. M. (Ed.): *Microbiology of Polluted Aquatic Ecosystems*. Bd. 10. Germany: 76-83

- KRAUSS, G.; BÄRLOCHER, F.; SCHRECK, P.; WENNRICH, R.; GLÄBER, W.; KRAUSS, G. -J. (2001): Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Nova Hedw.* 72 (3-4): 419-428
- LANE, T. W.; MOREL, F. M. M. (2000): A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (9): 4627-4631
- LAURO, M. M.; PLOCKE, J. (1999): Synthesis and properties of class III metallothioneins of *Schizosaccharomyces pombe* in response to cadmium and zinc. In: KLAASEN, C. (Ed.): *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel: 195-199
- LERCH, K. (1980): Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* 284: 368-370
- LERCH, K. (1991): Purification of *Neurospora crassa* copper-metallothionein. *Meth. Enzymol.* 205: 278-283
- LEVINE, W. B.; MARZLUF, G. A. (1989): Isolation and characterization of cadmium-resistant mutants of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.* 35: 359-365
- LI, Z. -S.; SZCZYPKA, M.; LU, Y. -P.; THIELE, D. J.; REA, P. A. (1996): The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271 (11): 6509-6517
- LI, Z. -S.; LU, Y. -P.; ZHEN, R. -G.; SZCZYPKA, M.; THIELE, D. J.; REA, P. A. (1997): A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalysed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 42-47
- LIN, C. -M.; CRAWFORD, B. F.; KOSMAN, D. J. (1993): Distribution of ⁶⁴Cu in *Saccharomyces cerevisiae*: cellular locale and metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1605-1615
- LIU, X. F.; SUPEK, F.; NELSON, N.; CULOTTA, V. C. (1997): Negative control of heavy metal uptake by *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene. *J. Biol. Chem.* 272 (18): 11763-11769
- MACREADIE, I. G.; SEWELL, A. K.; WINGE, D. R. (1994): Metal ion resistance and the role of metallothionein in yeast. In: WINKELMANN, G. und Winge, D. R. (Eds.): *Metal Ions in Fungi*. Marcel Dekker, Inc., New York: 279-310
- MALTBY, L.; BOOTH, R. (1991): The effect of coal-mine effluent on fungal assemblages and leaf breakdown. *Wat. Res.* 25 (3): 247-250
- MARTINO, E.; COISSON, J. D.; LACOURT, I.; FAVARON, F.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. (2000): Influence of heavy metals on production and activity of pectinolytic enzymes in ericoid mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 104 (7): 825-833
- MEHRA, R. K.; WINGE, D. R. (1988): Cu (I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* γ -glutamyl peptides varying in chain lengths. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 381-389

- MEHRA, R. K.; TARBET, E. B.; GRAY, W. R.; WINGE, D. R. (1988): Metal-specific synthesis of two metallothioneins and γ -glutamyl peptides in *Candida glabrata*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8815-8819
- MEHRA, R. K.; GAREY, J. R.; BUTT, T. R.; GRAY, W. R.; WINGE, D. R. (1989): *Candida glabrata* metallothioneins; cloning and sequence of the genes and characterization of proteins. J. Biol. Chem. 264 (33): 19747-19753
- MEHRA, R. K.; MULCHANDANI, P.; HUNTER, T. C. (1994): Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 200 (3): 1193-1200
- MEISTER, A. (1988): Glutathione metabolism and its selective modification. J. Biol. Chem. 263 (33): 17205-17208
- MEISTER, A. (1989): Metabolism and function of glutathione. In: DOLPHIN, D.; POULSON, R. und AVRAMOVIC, O. (Eds.): Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Wiley Verlag, New York: 367-474
- MIERSCH, J.; BÄRLOCHER, F.; BRUNS, I.; KRAUSS, G. -J. (1997): Effects of cadmium, copper, and zinc on growth and thiol content of aquatic hyphomycetes. Hydrobiol. 346: 77-84
- MIERSCH, J.; TSCHIMEDBALSHIR, M.; BÄRLOCHER, F.; GRAMS, Y.; PIERAU, B.; SCHIERHORN, A.; KRAUSS, G. -J. (2001): Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. Mycol. Res. 105: in press
- MOWLL, J. L.; GADD, G. M. (1983): Zinc uptake and toxicity in the yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 129: 3421-3425
- MÜLLER, E. und LOEFFLER, W. (1992): Mykologie. 5. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York: 61
- MÜNGER, K.; LERCH, K. (1985): Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: chemical and spectroscopic properties. Biochem. 24: 6751-6756
- MÜNGER, K.; GERMANN, U. A.; LERCH, K. (1987): Isolation and regulation of expression of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene metallothionein II. Experientia Suppl. 52: 393-400
- MURASUGI, A.; WADA NAKAGAWA, C.; HAYASHI, Y. (1984): Formation of cadmium-binding peptide allomorphs in fission yeast. J. Biochem. 96: 1375-1379
- MURPHY, R. J.; LEVY, J. F. (1983): Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 81: 165-168
- MUTOH, N.; HAYASHI, Y. (1988): Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides. Biochem. Biophys. Res. Com. 151 (1): 32-39

- NIEHAUS, W. G.; DILTS, R. P. (1984): Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. Arch. Biochem. Biophys. 228: 113-119
- OHSUMI, Y.; KITAMOTO, K.; ANRAKU, Y. (1988): Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. J. Bact. 170 (6): 2676-2682
- ONO, B. -I; OHUE, H.; ISHIHARA, F. (1988): Role of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Hg²⁺. J. Bact. 170 (12): 5877-5882
- ORTIZ, D. F.; KREPPPEL, L.; SPEISER, D. M.; SCHEEL, G.; McDONALD, G.; OW, D. W. (1992): Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. EMBO J. 11 (10): 3491-3499
- ORTIZ, D. F.; RUSCITTI, T.; MCCUE, K. F.; OW, D. W. (1995): Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. J. Biol. Chem. 270 (9): 4721-4728
- OW, D. W. (1993): Phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. Vitro Cell Dev. Biol. 29P: 213-219
- PEARCE, D. A.; SHERMAN, F. (1999): Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 181 (16): 2774-4779
- PENNINCKX, M. (2000): A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. Enz. Microb. Technol. 26: 737-742
- PENNINCKX, M. J.; ELSKENS, M. T. (1993): Metabolism and function of glutathione in microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 34: 239-301
- PEREGO, P.; HOWELL, S. B. (1997): Molecular mechanism controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. Toxicol. Appl. Pharmacol. 147: 312-318
- PIERAU, B. (1999): Charakterisierung von zwei Stämmen des *Heliscus lugdunensis* (Sacc. & Therry) unter Schwermetallstreß. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- PLOCKE, D. J.; KÄGI, H. R. (1992): Spectral characteristics of cadmium-containing phytochelatin complexes isolated from *Schizosaccharomyces pombe*. Int. J. Biochem. 207: 201-205
- RABENSTEIN, D. L. (1989): Metal complexes of glutathione and their biological significance. In: DOLPHIN, D.; POUTSON, R. und AVRAMOVIC, O. (Eds.): Glutathione. Bd. A. Wiley Int. Sci., New York: 147-186
- RAMA RAO, V. S. K. V.; AKTHAR, N.; MARUTHI MOHAN, P. (1997a): Isolation of a cadmium tolerant *Curvularia* sp. from polluted effluents. Curr. Sci. 73 (5): 453-455

- RAMA RAO, V. S. K. V.; WILSON, C. H.; MARUTHI MOHAN, P. (1997b): Zinc resistance in *Neurospora crassa*. *BioMetals* 10: 147-156
- RAMAMOORTHY, S.; KUSHNER, D. J. (1975): Binding of mecuric and other heavy metal ions by microbial growth media. *Microb. Ecol.* 2: 162-176
- RAMSAY, L. M.; GADD, G. M. (1997): Mutans of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microb. Lett.* 152: 293-298
- RAUSER, W. E. (1999): Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48
- REESE, R. N.; WINGE, D. R. (1988): Sulfide stabilization of the cadmium- γ -glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263 (26): 12832-12835
- REESE, R. N.; MEHRA, R. K.; TARBET, E. B.; WINGE, D. R. (1988): Studies on the γ -Glutamyl Cu-binding peptide from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263 (9): 4186-4192
- RIJISTENBIL, J. W.; HARITONIDIS, S.; MALEA, P.; SEFERLIS, M.; WIJNHOLDS, J. A. (1998): Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (Greese, N Aegean Sea). *Hydrobiol.* 385: 171-181
- ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. (1984): Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectr.* 11 (11): 601
- SCHIERHORN, A.; JAECKEL, P.; KRAUSS, G.; MENGE, S.; RÜCKNAGEL, P.; KRAUSS, G. -J. (2001): Isolation and characterization of novel metallothionein like peptides from aquatic hyphomycetes. in press
- SCHRECK, P. (1997): Schadstoffausträge aus den Halden der Kupferschieferverschüttung. In: SCHRECK, P. und GLÄBER, W. (Eds.): Reststoffe der Kupferschieferverschüttung Teil 1: Mansfelder Kupferschlacken. Leipzig: 9-15
- SINGLETON, I.; TOBIN, J. M. (1996): Fungal interactions with metals and radionuclides for environmental bioremediation. In: FRANKLAND, J. C.; MAGAN, N. und GADD, G. M. (Eds.): Fungi and Environmental Change. University Press, Cambridge: 282-298
- SIEGEL, S. M.; GALUN, M.; SIEGEL, B. Z. (1990): Filamentous fungi as metal biosorbents: a review. *Water Air Soil Poll.* 53: 335-344
- SIMM, C. (2000): Phytochelatinsynthese aus *Schizosaccharomyces pombe*, Untersuchungen zur Lokalisierung, Regulation und biochemischer Funktionalität. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- SLABA, M.; DLUNGOŃSKI, J. (2000): Selective recovery of Zn^{2+} from waste slag from a metal-processing plant by the microscopic fungus *Verticillium marquandii*. *Biotechnol. Lett.* 22: 1699-1704

- SMITH, W. H. (1977): Influence of heavy metal leaf contaminants on the *in vitro* growth of urban-tree phylloplane fungi. *Microb. Ecol.* 3: 231-239
- SRIDHAR, K. R.; KRAUSS, G.; BÄRLOCHER, F.; WENNRICH, R.; KRAUSS, G. -J. (2000): Fungal diversity in heavy metal polluted waters in Central Germany. *Fungal Div.* 5: 119-129
- STRASDEIT, H.; DUHME, A. K.; KNEER, R.; ZENK, M. H.; HERMES, C.; NOLTING, H. F. (1991): Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin. *J. Chem. Soc.*: 1129-1130
- SUBERKROPP, K.; KLUG, M. J. (1976): Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecol.* 57: 707-719
- SUBERKROPP, K.; KLUG, M. J. (1981): Degradation of leaf litter by aquatic hyphomycetes. In: WICKLOW, D. T. und CARROL, G. C. (Eds.): *The Fungal Community, its Organization and Role in the Ecosystem*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel: 762-776
- SUH, J. H.; KIM, D. S.; YUN, J. W.; SONG, S. K. (1998): Process of Pb²⁺ accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 20 (2): 153-156
- SUH, J. H.; YUN, J. W.; KIM, D. S. (1999): Effect of extracellular polymeric substances (EPS) and Pb²⁺ accumulation by *Aureobasidium pullulans*. *Bioproc. Engineer.* 21: 1-4
- SURESH, K.; SUBRAMANYAM, C. (1998): Polyphenols are involved in copper binding to cell walls of *Neurospora crassa*. *J. Inorg. Biochem.* 69: 209-215
- THRONEBERRY, G. O. (1973): Some physiological responses of *Verticillium albo-atrum* to zinc. *Can. J. Bot.* 51: 57-59
- TOBIN, J. M.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. (1984): Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (4): 821-824
- TOHOYAMA, H.; TOMOYASU, T.; INOUE, M.; JOHO, M.; MURAYAMA, T. (1992): The gene for cadmium metallothionein from a cadmium-resistant yeast appears to be identical to *CUP1* in a copper-resistant strain. *Curr. Gen.* 21: 275-280
- TREVORS, J. T.; STRATTON, G. W.; GADD, G. M. (1986): Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32: 447-464
- VATAMANUIK, O. K.; MARI, S.; LU, Y.-P.; REA, P. A. (1999): AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7110-7115
- VATAMANUIK, O. K.; MARI, S.; LU, Y., P.; REA, P. A. (2000): Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J. Biol. Chem.* 275 (40): 31451-31459
- VENKATESWERLU, G.; STOTZKY, G. (1989): Binding of metals by cell walls of *Cunninghamella blakesleeana* grown in the presence of copper or cobalt. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 619-625

- VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPEZ, S.; TOLEDANO, M.; LABARRE, J. (2001): A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276: 8469-8474
- VOLESKY, B. (1990): Biosorption of fungal biomass. In: VOLESKY, B. (Ed.): Biosorption of heavy metal. CRC Press, Boca Raton, Florida: 139-172
- WEBSTER, J. (1959): *Nectria lugdunensis* sp. nov., the perfect state of *Heliscus lugdunensis*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 42: 322-327
- WEBSTER, J. (1981): Biology and ecology of aquatic hyphomycetes. In: WICKLOW, D. T. und Carrol, G. C. (Eds.): *The Fungal Community*. Marcel Dekker, INC, New York Basel: 681-691
- WEBSTER, J. (1992): Anamorph-teleomorph relationships. In: BÄRLOCHER, F. (Ed.): *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes*. Springer, Berlin: 99-117
- WEHNER, E. P.; RAO, E.; BRENDDEL, M. (1993): Molecular structure and genetic regulation of *SFA*, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Mol. Gen. Genet.* 237: 351-358
- WEISSMAN, Z.; BERDICEVSKY, I.; CAVARI, B.-Z.; KORNTZER, D. (2000): The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (7): 3520-3525
- WELCH, J.; FOGEL, S.; BUCHMAN, C.; KARIN, M. (1989): The *CUP2* gene product regulates the expression of the *CUP1* gene, coding for yeast metallothionein. *EMBO J.* 8 (1) 255-260
- WHITE, C.; GADD, G. M. (1987): The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 727-737
- WINGE, D. R.; NIELSON, K. B.; GRAY, W. R.; HAMER, D. H. (1985): Yeast metallothionein; sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 260 (27): 14464-14470
- YIN, P.; YU, Q.; JIN, B.; LING, Z. (1999): Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch wastewater. *Wat. Res.* 33 (8): 1960-1963
- YU, W.; SANTHANAGOPALAN, V.; SEWELL, A. K.; JEMSEM, L. T.; WINGE, D. R. (1994): Dominance of metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$ isopeptides. *J. Biol. Chem.* 269 (33): 21010-21015
- ZHAO, H.; EIDE, D. (1996a): The *ZRT2* genes encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 23203-23210
- ZHAO, H.; EIDE, D. (1996b): The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2454-245

Anhang A, Rohdaten und Abbildungen

Tab. 1 Wachstum [mg mL^{-1}] von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in flüssigem Malz-Medium (1 %). 14 °C, 120 rpm, n = 3.

Alter [d]	MW	SD	SE
0	0,001	n. b.	
2	0,05	0,0	10,0
3	0,1	0,0	3,1
5	1,4	0,1	4,9
7	2,5	0,1	5,2
9	2,9	0,2	8,3
11	3,1	0,0	5,9
14	3,4	0,1	1,2

Tab. 2 Wachstum [mg mL^{-1}] von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in unbelasteter und 0,05 mM Cd(II)-haltiger Flüssigkultur. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Alter [d]	Kontrolle			0,05 mM Cd(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	0,001	n. b.		0,001	n. b.	
3	1,1	0,1	8,8	0,4	0,1	14,0
4	1,7	0,1	3,7	1,2	0,1	6,8
5	2,0	0,1	5,2	1,7	0,2	10,8
6	2,2	0,1	3,4	2,1	0,1	3,9
12	2,2	0,2	11,0	2,1	0,1	4,7

Tab. 3 Wachstum [mg mL^{-1}] von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in unbelasteter und 0,05 mM Cd(II)-haltiger Flüssigkultur. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Alter [d]	Kontrolle			0,05 mM Cd(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	0,001			0,001		
3	0,3	0,01	15,4	0,2	0,1	25,3
4	0,7	0,1	17,2	0,5	0,1	13,8
5	1,1	0,1	10,3	0,8	0,2	24,5
6	1,5	0,1	9,2	1,1	0,1	6,8
12	2,0	0,1	6,4	2,0	0,2	11,1

Tab. 4 Wachstum [mg mL^{-1}] von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3 d). 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs-zeit [d]	Kontrolle			0,1 mM			0,5 mM		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	1,7	0,1	3,7	1,3	0,2	14,2	1,0	0,1	4,4
3	2,2	0,1	3,4	1,5	0,2	12,6	1,1	0,2	17,1
9	2,2	0,2	11,0	2,0	0,1	3,1	1,6	0,2	12,9

Tab. 5 Wachstum [mg mL^{-1}] von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3 d). 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs-Zeit [d]	Kontrolle			0,1 mM			0,5 mM		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	0,7	0,1	16,9	0,7	0,1	21,3	0,6	0,1	21,7
3	1,5	0,1	9,2	1,0	0,1	13,8	0,9	0,2	18,0
9	2,0	0,1	6,4	1,8	0,3	17,5	1,2	0,4	35,1

Tab. 6 GSH- und GTSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Zn(II)-Konzentration. Zn(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation 14 °C, 5 d, Mittelwerte aus zwei Versuchen mit je n = 3.

Zn(II)-Konz. [mM]	GSH			GTSH		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	9,9	1,7	17,5	16,2	2,5	15,1
0,0125	10,7	1,4	13,5	17,8	2,5	13,8
0,025	10,2	2,4	23,3	18,1	2,8	15,4
0,1	11,0	3,2	29,4	15,4	3,0	19,1
0,2	12,3	2,3	18,6	19,1	2,9	15,0
0,3	18,6	9,9	53,5	24,3	7,8	32,1

Tab. 7 Biosorption und Akkumulation [$\text{nmol Cd(II) mg}^{-1}$ TG] von Cd(II) durch *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in 0,05 mM Cd(II)-haltiger Kultur. 14 °C, Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Biosorption [$\text{nmol Cd(II) mg}^{-1}$ TG]			Akkumulation [$\text{nmol Cd(II) mg}^{-1}$ TG]		
MW	SD	SE	MW	SD	SE
13,8	1,1	8	3,3	0,3	9,3

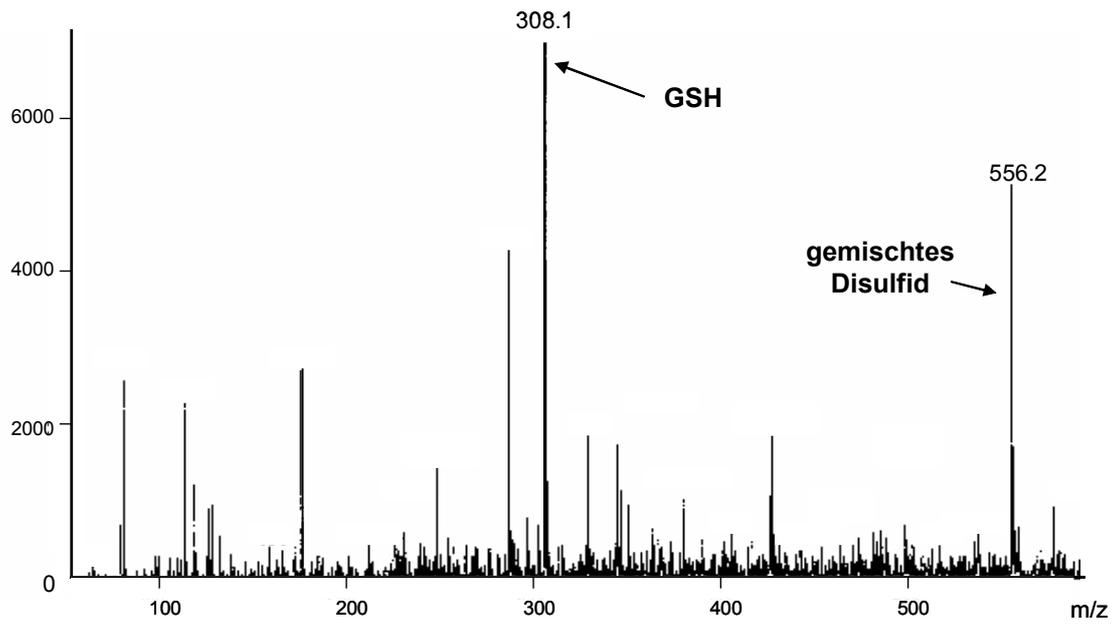


Abb. 1 Nachweis von GSH durch Massenspektrometrie

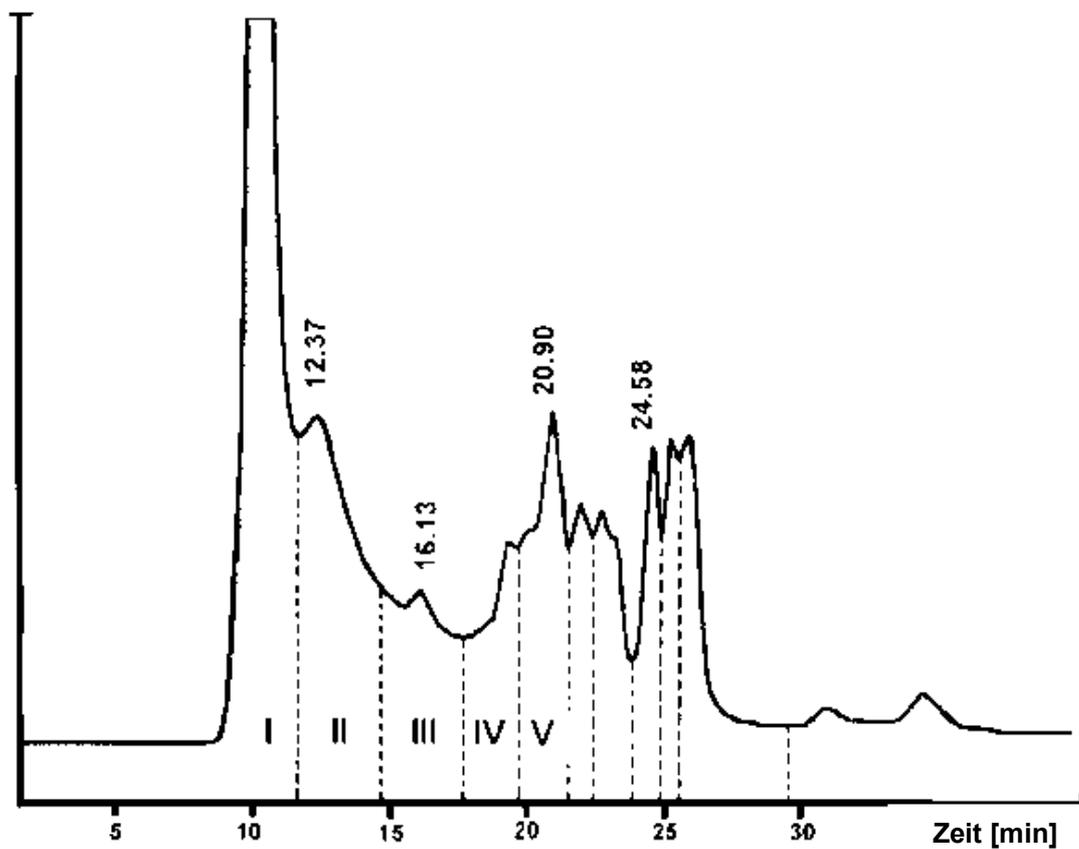


Abb. 2 Fraktionierung des ungesäuerten Extraktes.

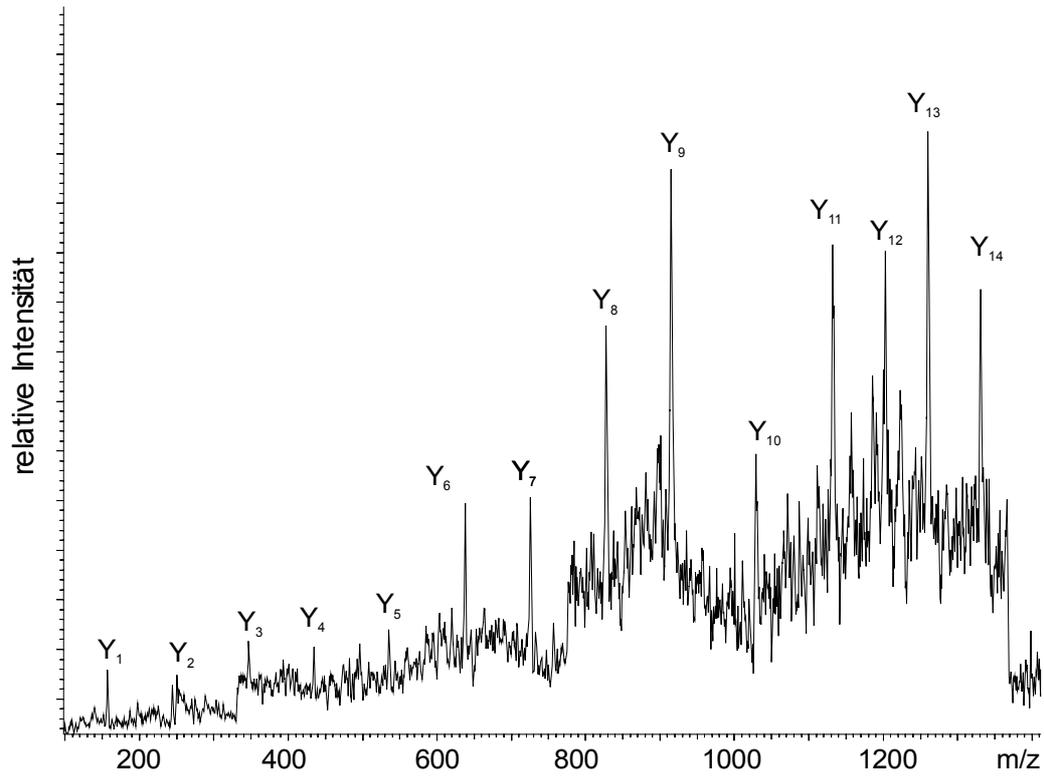


Abb. 3 MALDI-PSD Spektrum von MT1_HL von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1.

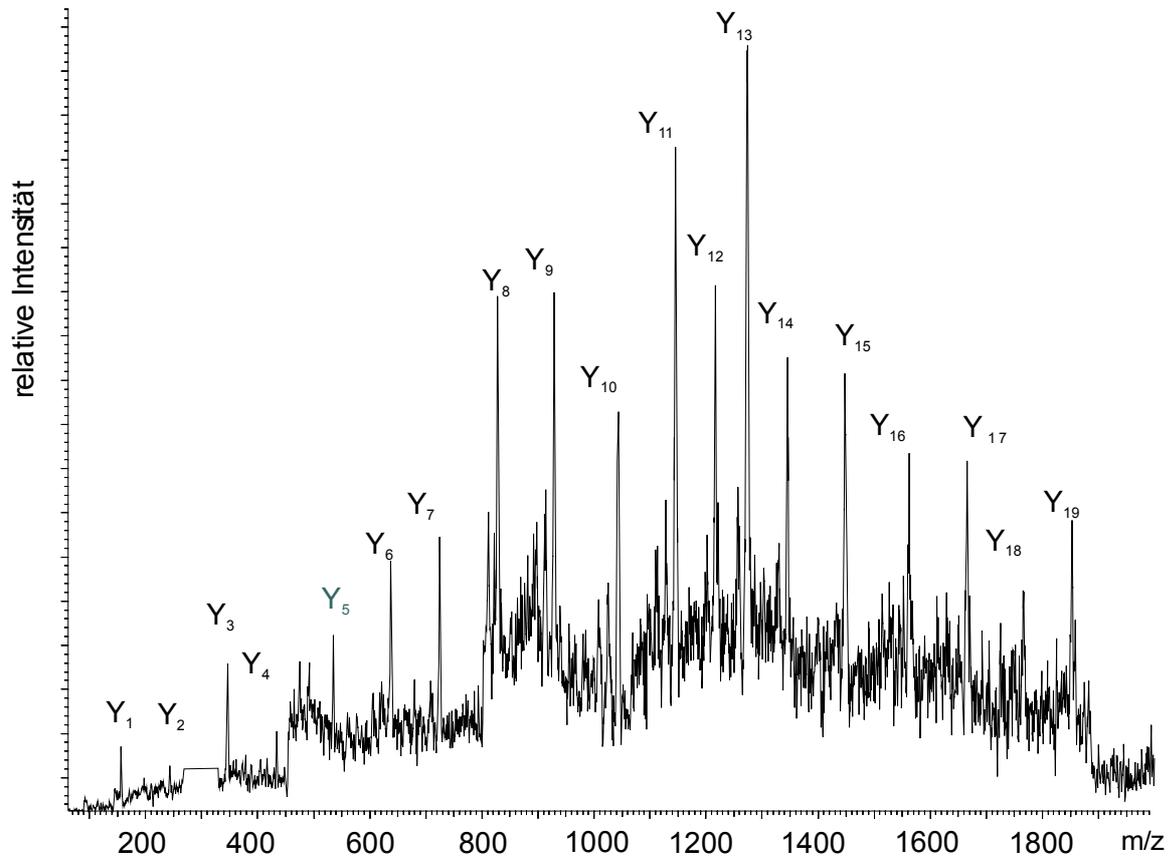


Abb. 4 MALDI-PSD Spektrum von MT2_HL von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4.

Anhang B, Daten der Abbildungen

Tab. 1 Wachstum [%] von *Phialophora* sp.-Stamm H3/P/5 in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). 14 °C, 18 d, Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

SM [mM]	Cd(II)			Cu(II)			Zn(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0,01	103,0	3,2	7,1	100,0	2,2	2,2	103,4	2,2	4,2
0,1	105,6	4,5	1,7	104,5	2,0	1,9	106,6	4,0	2,0
1	42,7	3,9	6,2	83,6	18,0	21,6	84,5	9,4	16,4
10	39,6	34,0	84,3	46,6	10,9	23,3	54,2	11,6	26,5

Tab. 2 Wachstum [%] von *Phialophora* sp.-Stamm H3/P/7 in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). 14 °C, 18 d, Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

SM [mM]	Cd(II)			Cu(II)			Zn(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0,01	101,4	2,4	4,7	99,3	1,8	1,8	101,3	1,5	1,5
0,1	104,6	1,2	5,5	103,7	1,7	1,7	104,5	1,9	1,8
1	34,3	5,8	20,2	82,8	17,3	20,9	96,1	2,6	2,7
10	9,0	5,3	61,8	46,2	10,5	22,6	67,0	2,3	3,4

Tab. 3 Wachstum [%] von *Phialophora* sp.-Stamm H4/P/12 in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). 14 °C, 18 d, Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

SM [mM]	Cd(II)			Cu(II)			Zn(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0,01	102,9	3,8	3,7	106,7	7,6	7,1	157,8	54,4	34,5
0,1	75,5	52,1	8,7	222,1	9,9	4,4	149,2	13,0	8,7
1	44,6	13,0	29,1	179,6	4,6	2,6	154,2	49,4	32,0
10	22,6	8,7	38,4	33,8	9,7	28,8	145,6	4,6	3,1

Tab. 4 Wachstum [%] von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in schwermetallhaltiger Oberflächenkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). 14 °C, 18 d, Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen mit je n = 3.

SM [mM]	Cd(II)			Cu(II)			Zn(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0,01	97,9	4,4	4,5	94,7	2,8	3,0	95,3	3,2	3,4
0,1	95,8	4,3	4,5	94,3	3,9	4,1	94,7	3,8	4,0
1	55,0	6,8	12,3	43,7	2,8	6,4	88,6	1,6	1,8
10	1,7	0,4	22,3	4,0	1,5	38,2	28,7	1,4	5,0

Tab. 5 Wachstum [mg mL⁻¹ TG] der *H. lugdunensis*-Stämme H4/2/4 und H8/2/1 und *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in unbelasteter Flüssigkultur. 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 bzw. 3 (Stamm H4/2/4) Versuchsreihen, mit je n = 3;* MW von t9 wurde nur in einer Versuchsreihe ermittelt.

Alter [d]	H4/2/4			H8/2/1			H4/P/15		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	0,001	0,0	0	0,001	0,00	0	0,002	0,00	0,0
1	0,04	0,0	65,6	0,05	0,02	30,5	0,03	0,01	31,9
2	0,2	0,1	49,3	0,10	0,01	12,7	0,3	0,1	31,3
3	1,0	0,2	21,6	0,6	0,1	11,4	1,0	0,5	49,5
4	1,6	0,2	12,9	1,1	0,0	4,5	2,4	0,7	27,2
5	1,8	0,1	4,9	1,4	0,1	5,8	3,0	0,2	7,1
6	2,0	0,1	3,2	1,8	0,1	5,2	3,1	0,3	9,3
7	2,1	0,1	5,4	1,9	0,1	4,0	2,9	0,4	12,6
8	2,2	0,1	4,4	1,9	0,1	4,1	2,9	0,3	10,4
9	2,2	0,1	5,6	1,9	0,0	1,9	2,6	0,1	1,9
10	2,1	0,1	5,3	1,9	0,1	3,1	2,7	0,4	16,5

Tab. 6 Wachstum [%] von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 und H8/2/1 in schwermetallhaltiger Flüssigkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). SM-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit je n = 3.

		H4/2/4			H8/2/1		
SM	Konz.[mM]	MW	SD	SE	MW	SD	SE
Cd(II)	0,0125	105,8	14,0	13,3	93,9	19,3	20,6
	0,025	106,6	19,8	18,6	76,7	20,5	26,7
	0,05	80,8	11,4	14,1	47,6	8,7	18,3
	0,1	49,3	28,3	57,4	9,1	7,0	77,2
Cu(II)	0,0125	105,1	11,8	11,2	92,7	10,1	10,9
	0,025	98,5	10,0	10,1	87,5	25,7	29,4
	0,05	99,6	5,8	5,8	97,6	22,3	22,8
	0,1	96,8	7,7	7,9	104,6	28,9	27,7
	0,2	78,7	8,7	11,0	110,4	31,8	28,8
	0,3	40,8	9,3	22,8	56,2	6,9	12,2
	0,4	13,3	8,1	60,9	3,9	1,7	43,6
Zn(II)	0,0125	95,2	11,8	12,4	92,5	17,7	19,1
	0,025	98,9	10,9	11,0	104,2	19,1	18,4
	0,05	93,4	6,5	6,9	107,4	19,8	18,4
	0,1	92,1	9,5	10,3	109,3	19,8	18,1
	0,2	85,6	10,7	12,5	90,5	19,9	22,0
	0,3	52,5	22,2	42,3	40,9	17,1	41,8
	0,4	11,4	12,0	106,1	22,4	12,7	56,7

Tab. 7 Wachstum [%] von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in schwermetallhaltiger Flüssigkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %). SM-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

SM-Konz. [mM]	Cd(II)			Cu(II)			Zn(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0,025	97,4	7,2	7,4	103,1	2,8	2,7	104,4	13,0	12,5
0,1	94,0	6,3	6,7	105,6	6,0	5,6	90,9	16,2	17,8
0,3	92,4	6,9	7,4	66,7	2,4	3,5	96,8	12,1	12,5
0,5	82,2	4,1	5,0	43,3	4,7	10,9	97,4	14,7	15,1
0,7	69,2	5,6	8,1	38,4	3,9	10,2	105,8	9,4	8,9
1,0	29,6	7,3	24,6	13,2	3,9	29,7	99,1	5,3	5,4

Tab. 8 Wachstum [%] von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Zn(II)-haltiger Flüssigkultur im Vergleich zur Kontrolle (K = 100%). Zn(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d; Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen mit je n = 3.

Zn(II)-Konz. [mM]	Zn(II)		
	MW	SD	SE
0,025	90,8	11,5	12,7
0,3	87,1	21,1	24,2
10	71,8	20,7	28,8
20	39,3	25,5	64,9

Tab. 9 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) [nmol mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	Biosorption [nmol Cd(II) mg ⁻¹ TG]			Akkumulation [nmol Cd(II) mg ⁻¹ TG]		
	MW	SD	[SE]	MW	SD	[SE]
0,0125	2,2	0,8	36,7	2,1	0,4	17,1
0,025	5,2	0,8	14,7	2,7	0,2	7,2
0,05	9,3	2,4	26,4	3,8	0,2	5,2
0,1	18,5	4,5	24,5	11,8	4,9	41,8

Tab. 10 Biosorption und Akkumulation von Zn(II) [nmol mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Zn(II)-Konzentration. Zn(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Zn(II)-Konz. [mM]	Biosorption [nmol Zn(II) mg ⁻¹ TG]			Akkumulation [nmol Zn(II) mg ⁻¹ TG]		
	MW	SD	[SE]	MW	SD	[SE]
0,0125	3,8	3,9	101,0	7,2	1,6	21,9
0,025	5,7	2,3	39,8	10,5	2,9	27,8
0,1	17,6	0,9	5,0	25,1	2,3	9,2
0,2	34,8	2,2	6,2	59,5	10,4	17,5
0,3	60,4	16,4	27,1	85,8	16,5	19,2

Tab. 11 Biosorption und Akkumulation von Cd(II) [nmol mg⁻¹ TG] durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	Biosorption [nmol Cd(II) mg ⁻¹ TG]			Akkumulation [nmol Cd(II) mg ⁻¹ TG]		
	MW	SD	[SE]	MW	SD	[SE]
0,025	n.n			0,2	0,1	40,7
0,1	1,2	0,3	21,9	0,3	0,0	12,1
0,5	3,7	2,4	42,2	1,0	0,4	47,1
1	35,3	7,0	19,8	22,5	6,9	30,5

Tab. 12 Biosorption und Akkumulation von Zn(II) [nmol mg⁻¹ TG] durch *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Abhängigkeit von der Zn(II)-Konzentration. Zn(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Zn(II)-Konz. [mM]	Biosorption [nmol Zn(II) mg ⁻¹ TG]			Akkumulation [nmol Zn(II) mg ⁻¹ TG]		
	MW	SD	[SE]	MW	SD	[SE]
0,025	0,6	0,2	40,3	3,5	0,5	13,5
0,3	4,5	1,2	26,9	7,4	2,0	27,3
10	15,8	5,2	32,7	35,5	3,7	10,4
20	28,2	5,6	19,9	36,9	4,9	13,3

Tab. 13 GSH- und GTSH-Gehalt [nmol mg⁻¹ TG] im Myzel von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration im Medium. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	GSH			GTSH		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	3,5	1,2	34,6	10,5	1,0	10,0
0,025	3,3	0,8	25,9	11,5	1,7	15,2
0,1	2,8	0,5	17,6	9,9	0,9	8,9
0,5	4,6	1,3	27,4	12,8	3,5	27,1
1	9,9	0,6	6,3	33,6	2,3	6,7

Tab. 14 GSH- und GTSH-Gehalt [nmol mg⁻¹ TG] im Myzel von *V. cf. alboatrum*-Stamm H4/P/15 in Abhängigkeit von der Zn(II)-Konzentration im Medium. Zn(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Zn(II)-Konz. [mM]	GSH			GTSH		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	5,7	1,2	21,6	15,7	2,7	17,4
0,025	6,9	2,2	31,2	17,8	5,6	31,5
0,3	7,8	2,0	25,9	20,2	3,0	14,8
10	7,1	1,6	23,0	20,3	3,9	19,2
20	7,2	0,8	10,6	24,3	1,9	7,9

Tab. 15 GSH-Gehalt [nmol mg⁻¹ TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in unbelasteter und Cd(II)-haltiger (0,05 mM) Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Alter [d]	K			Cd(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
3	10,5	1,4	13,6	18,5	5,3	28,4
4	6,5	0,7	11,1	17,1	2,9	16,8
5	7,1	1,7	23,2	12,5	2,2	17,8
6	4,7	0,8	16,9	9,1	1,4	15,1
12	5,8	0,5	8,0	7,6	0,7	8,9

Tab. 16 GTSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in unbelasteter und Cd(II)-haltiger (0,05 mM) Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je $n = 3$.

Alter [d]	K			Cd(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
3	15,8	2,2	13,7	24,1	1,3	20,7
4	10,8	0,6	5,4	28,6	2,7	12,0
5	16,6	3,2	19,0	25,8	0,7	11,0
6	8,7	2,7	31,4	19,0	3,2	9,6
12	10,0	1,2	12,2	15,4	3,5	15,3

Tab. 17 GSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in unbelasteter und Cd(II)-haltiger (0,05 mM) Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je $n = 3$.

Alter [d]	K			Cd(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
3	7,6	0,5	7,1	12,9	1,0	7,4
4	7,6	0,4	4,8	10,5	2,3	21,6
5	9,8	1,1	11,2	14,1	0,6	3,9
6	7,0	0,9	12,5	15,2	2,6	17,4
12	4,9	0,6	11,7	11,3	1,3	11,7

Tab. 18 GTSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in unbelasteter und Cd(II)-haltiger (0,05 mM) Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je $n = 3$.

Alter [d]	K			Cd(II)		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
3	11,3	1,8	16,0	19,6	1,3	6,9
4	10,0	5,2	52,2	13,1	2,7	20,5
5	11,9	1,3	10,8	19,3	0,7	3,5
6	10,0	0,9	9,5	21,4	3,2	15,2
12	6,7	1,5	22,1	16,2	3,5	21,8

Tab. 19 GSH- und GTSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration im Medium. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	GSH			GTSH		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	8,1	1,2	14,9	16,7	3,2	19,3
0,0125	12,6	1,4	11,5	24,9	1,5	6,2
0,025	13,7	1,2	8,5	26,3	2,1	8,1
0,05	15,1	0,9	5,8	28,4	0,8	2,7
0,1	17,9	4,1	22,6	38,1	9,1	23,8

Tab. 20 GSH- und GTSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration im Medium. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	GSH			GTSH		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0	10,0	1,2	11,6	11,6	1,4	12,5
0,0125	13,0	2,2	16,6	16,8	2,1	12,7
0,025	14,3	1,4	9,9	18,0	1,7	9,2
0,05	14,6	1,1	7,2	18,7	0,7	3,6

Tab. 21 GSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3 d). 14° C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs-zeit [d]	K			0,1 mM			0,5 mM		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	6,6	1,0	14,8	20,9	1,2	5,7	28,8	5,8	20,1
3	4,6	0,8	17,7	10,9	0,7	6,5	17,8	2,0	11,4
9	6,5	0,8	12,3	7,4	0,7	9,7	9,8	1,6	16,3

Tab. 22 GTSH-Gehalt [nmol mg^{-1} TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3 d). 14° C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs-zeit [d]	K			0,1 mM			0,5 mM		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	13,1	3,3	25,3	36,7	3,9	10,7	53,0	7,2	13,5
3	8,6	2,4	28,3	28,5	3,1	11,0	48,7	5,4	11,0
9	7,5	2,3	30,3	19,8	1,4	6,9	28,8	6,3	21,9

Tab. 23 GSH-Gehalt von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 im Myzel nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3d). 14° C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs-zeit [d]	K			0,1 mM			0,5 mM		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	7,6	0,3	4,6	22,4	1,8	8,1	35,3	5,3	15,0
3	7,0	0,9	12,5	18,7	1,5	8,0	29,3	4,3	14,8
9	4,7	0,4	8,2	10,2	1,1	10,4	17,9	2,9	16,4

Tab. 24 GTSH-Gehalt [nmol mg⁻¹ TG] im Myzel von *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase (nach 3d). 14° C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs-zeit [d]	K			0,1 mM			0,5 mM		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	10,3	4,3	41,7	23,7	5,0	21,0	53,2	14,4	27,2
3	9,7	1,0	10,5	23,1	3,3	14,1	60,3	19,7	32,6
9	5,9	1,1	19,1	14,5	2,6	17,8	56,9	10,2	17,9

Tab. 25 Bildung von PC₂ und MT1_HL [Area mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Kulturdauer (0,05 mM Cd(II)). Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Alter [d]	PC ₂			MT1_HL		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
3				392753	119004	30,3
4	48882	4854	9,9	1316875	685129	52,0
5	38679	11416	29,5	959116	601131	62,7
6	33344	8397	25,2	506981	225843	44,5
12	30765	6999	22,8	190503	18248	9,6

Tab. 26 Bildung MT1_HL [Area mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer (0,05 mM Cd(II)). Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Alter [d]	MT1_HL		
	MW	SD	SE
3	859453	88425	10,3
4	804358	122566	15,2
5	883540	244672	27,7
6	956719	94735	9,9
12	836168	177124	21,2

Tab. 27 Bildung PC₂ und MT1_HL [Area mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration. 14 °C, 120 rpm, 5 d, Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt Inokulation, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	PC ₂			MT1_HL		
	MW	SD	SE	MW	SD	SE
0,0125	25979	12595	48,5	393421	232467	59,1
0,025	38360	7412	19,3	858089	387376	45,1
0,05	47988	10852	22,6	2363693	1121818	47,5
0,1	70846	40648	57,4	8573974	4718353	55,0

Tab. 28 Bildung von MT1_HL [Area mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 in Abhängigkeit von der Cd(II)-Konzentration. Cd(II)-Applikation zum Zeitpunkt der Inokulation, 14 °C, 120 rpm, 5 d, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Cd(II)-Konz. [mM]	MT1_HL		
	MW	SD	SE
0,0125	717896	76626	10,7
0,025	769036	44987	5,8
0,05	883539	244671	27,7

Tab. 29 Bildung von PC₂ und MT1_HL [Area mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H4/2/4 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase. 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs- zeit [d]	Cd(II)-Konz. [mM]	PC ₂			MT1_HL		
		MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	0,1	191653	108086	56,4	43553	33820	77,7
	0,5	355495	144515	40,7	47196	17573	37,2
3	0,1	239154	47042	19,7	384332	79903	20,8
	0,5	608566	156415	25,7	73172	80635	110,2
9	0,1	116338	21826	18,8	407331	158265	38,9
	0,5	463784	70587	15,2	80199	75194	93,8

Tab. 30 Bildung von PC₂ und MT1_HL [Area mg⁻¹ TG] durch *H. lugdunensis*-Stamm H8/2/1 nach Cd(II)-Applikation in der logarithmischen Phase. 14 °C, 120 rpm, Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen mit je n = 3.

Belastungs- zeit[d]	Cd(II)-Konz. [mM]	PC ₂			MT1_HL		
		MW	SD	SE	MW	SD	SE
1	0,1	22490	7588	33,7	473899	212886	44,9
	0,5	413150	292768	70,9	71827	27901	38,8
3	0,1	55550	10169	18,3	1068887	197468	18,5
	0,5	1389471	579748	41,7	353658	150953	42,7
9	0,1	42250	12042	28,5	559589	208620	37,3
	0,5	1589477	429973	27,1	384095	318581	82,9

Danksagung

Hiermit danke ich allen, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben:

Prof. Dr. W. Gläßer für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas an der Sektion Hydrogeologie des UFZ Leipzig-Halle und sein Interesse am Fortgang der Arbeit,

Frau Dr. G. Krauß (AG Mikrobiologie des unterirdischen Wassers, UFZ Leipzig-Halle) für die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft,

Prof. Dr. G. -J. Krauß (FB Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle) für die Betreuung und die Begutachtung der Arbeit, sowie die hilfreichen Diskussionen,

Prof. Dr. F. Bärlocher (Mount Allison University, Dept. Biology, Sackville, Kanada) für die Begutachtung der Arbeit und die freundliche Unterstützung,

Dr. D. Neumann (Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) für die Begutachtung der Arbeit,

Frau Dr. S. Menge (FB Biochemie/Biotechnologie) für die freundliche Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen,

Dr. J. Miersch (FB Biochemie/Biotechnologie) für seine freundliche Unterstützung und der Diskussionsbereitschaft,

Frau Dr. A. Schierhorn (FB Biochemie/Biotechnologie) für die massenspektrometrischen Untersuchungen,

Dr. P. Rücknagel (Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle) für die Sequenzierung der Metallothioneine,

Dr. T. Schumann (FB Geowissenschaften, Martin-Luther-Universität) für die Schwermetallanalytik mittels ICP,

Frau Dr. L. Marvanová (Universität Brno, Tschechien) und Dr. K. Schaumann (Alfred-Wegener-Institut Bremerhaven) für die Identifizierung einiger Wasserpilzstämme,

Frau E. Püschel für wertvolle technische Hilfe bei den HPLC-Messungen,

den MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des unterirdischen Wassers und der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie, die mich freundlich aufgenommen und zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Die Arbeit wurde durch ein Graduiertenkollegstipendium der DFG finanziert.

Lebenslauf

- 12.08.1971 geboren in Bremerhaven
- 1979-1982 Grundschule Loxstedt
1982-1984 Orientierungsstufe Loxstedt
1984-1988 Gymnasium Loxstedt
1988-1991 Gymnasium Schiffdorf
- 1991- 1997 Studium der Biologie an der Carl v. Ossietzky Universität Oldenburg,
Diplom-Arbeit am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und
Meeresforschung, Thema: „Chitinabbau durch marine Pilze und
extrazelluläre Chitinase-Aktivität“
- 04-07/1996 Praktikum im Department of Industrial Microbiology im University
College Dublin
- 10/1997-
11/2000 Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs „Adaptive
physiologisch-biochemische Reaktion auf ökologisch relevante
Wirkstoffe“ in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des unterirdischen
Wassers des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH, Thema:
„Wirkungen von Schwermetallen auf aquatische Pile aus mikrobiellen
Biozönosen des Mansfelder Landes“
- 10-11/1998 Forschungsaufenthalt im Department of Biology der Mount Allison
University Sackville, Kanada
- 03-06/2001 Praktikum in der Arbeitsgruppe Molekulare Biologie bei Roche,
Penzberg
- Halle, 18.10.2001

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und die verwendeten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Halle/Saale, 18.10.2001