

1. Einleitung

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

1.1. Aquatische Pilze

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

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

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

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

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

Aquatische Hyphomyceten

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

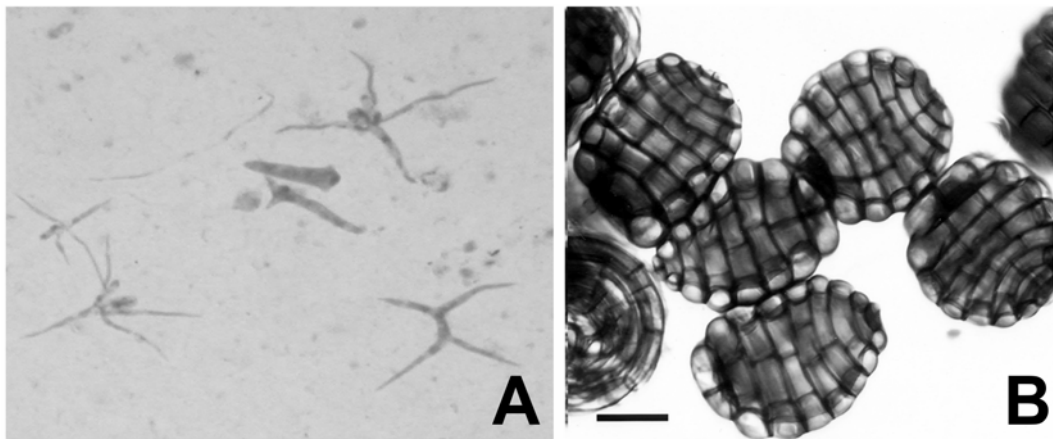


Abbildung 1: (A) Unterschiedlich geformte Konidien aquatischer Hyphomyceten. Deutlich sind die Verzweigungen der Sporen als Anpassung an die Verbreitung im Wasser zu erkennen. (Quelle: G. Krauß, UFZ; Lichtmikroskopie, 40-fache Vergrößerung). (B) Konidien des aeroaquatischen Hyphomyceten *Helicoon* sp.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

Aeroaquatische Hyphomyceten

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

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

Diverse mitospore Pilze

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

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

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

Umweltschadstoffe und aquatische Pilze

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

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

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

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

1.2. Laccasen (E.C. 1.10.3.2)

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

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

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

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

Einleitung

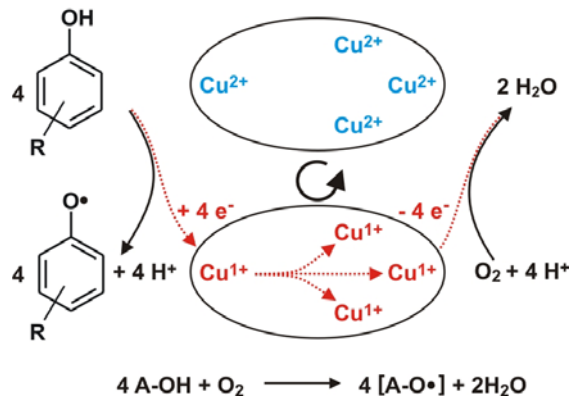


Abbildung 2: Reaktionszyklus der Laccase: Die Laccase in ihrer oxidierten Form (oben) wird durch phenolische Substrate reduziert (links). Im weiteren Reaktionsverlauf wird molekularer Sauerstoff (O_2) zu Wasser reduziert (rechts), dadurch kehrt das Enzym in seine oxidierte Form zurück. Es werden pro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

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

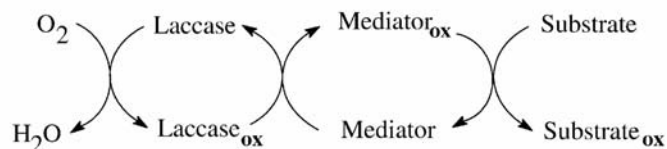


Abbildung 3: Prinzip der mediatorvermittelten Oxidation von Substraten durch Laccase nach Fabbrini *et al.* (72).

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

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

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

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

1.3. Textilfarbstoffe

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

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

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

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

Strukturelle Merkmale

Eine farbige Verbindung ist durch zwei Charakteristika gekennzeichnet.

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

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

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

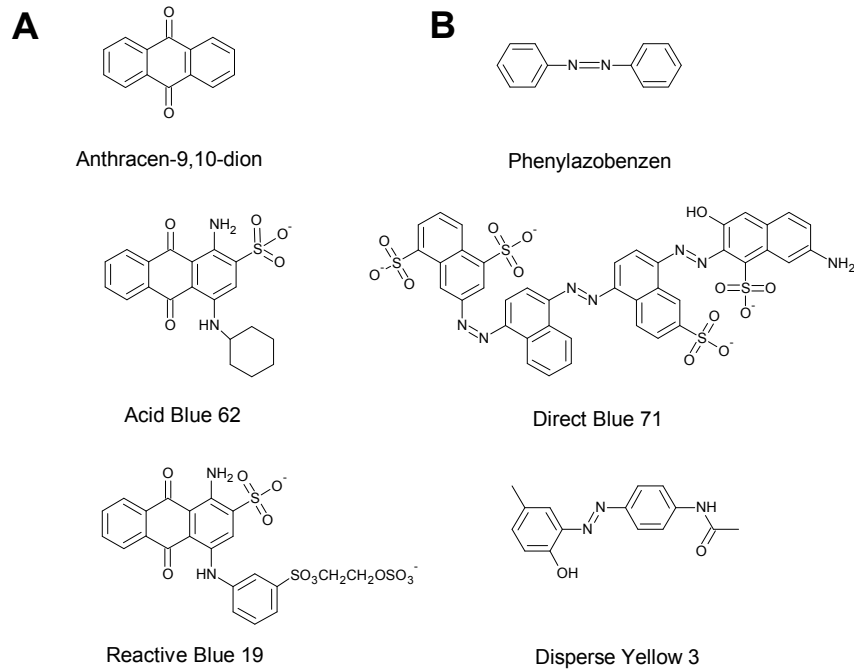


Abbildung 4: Struktur von Chromophoren und Beispiele für entsprechende Farbstoffe. (A) Anthrachinon; (B) Azo.

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

Behandlung farbstoffhaltiger Abwässer: Probleme und Verfahren

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

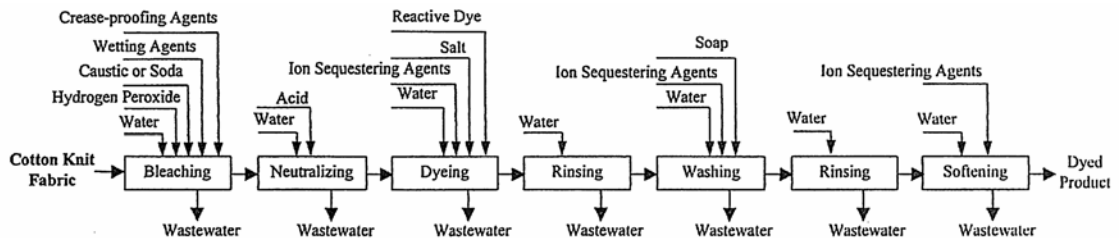


Abbildung 5: Ein typisches Flussdiagramm zur Färbung von Baumwolle mit Reaktivfarbstoffen nach Babuna *et al.* (12).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Biologische Behandlung

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

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

Bakterien

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

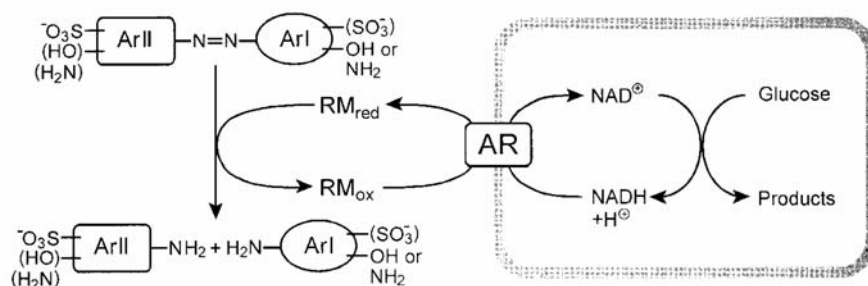


Abbildung 6: Vorgeschlagener Mechanismus der kometabolischen, redoxmediatorabhängigen, reduktiven Spaltung von Azofarbstoffen durch *Sphingomonas xenophaga* BN6 nach Keck et al. (126). AR – Azoreduktase, RM – Redoxmediator, ArI und II – aromatische Strukturen.

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

Pilze

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

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

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

Mangan-abhängige Peroxidase (E.C. 1.11.1.13)

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

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

Lignin-Peroxidase (E.C. 1.11.1.14)

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

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

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

Versatile Peroxidase (E.C. 1.11.1.16)

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

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

DyP (dye decolorizing peroxidases)

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

Laccase (E.C. 1.10.3.2)

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

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

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

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

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

1.4. Anliegen der Arbeit

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

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

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

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

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

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

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