

Abschlussbericht zum Projekt:

Mykoremediation von Klärschlamm und Gülle

Akronym: MYCORE

Autor: Daniel Akira Stiebeling

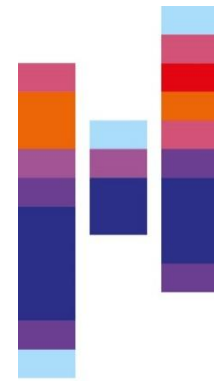
Betreuerin: Prof. Dr. Antje Labes

An der Hochschule Flensburg

Gefördert durch die



Gesellschaft für Energie und
Klimaschutz Schleswig-Holstein GmbH



**Hochschule
Flensburg**
University of
Applied Sciences

1. Titel der Dissertation

Mykoremediation von Klärschlamm und Gülle

2. Zusammenfassung

Im MYCORE-Projekt an der Hochschule Flensburg, das durch die EKSCH gefördert und von Daniel Akira Stiebeling unter der Betreuung von Prof. Dr. Antje Labes realisiert wurde, untersuchte man den Einsatz von Pilzen zur Sanierung und Aufwertung organischer Düngemittel – konkret Klärschlamm und Gülle. Hintergrund war die zentrale Rolle des Bodens als größter terrestrischer Kohlenstoffspeicher und sein Potenzial zur Kohlenstoffsequestrierung. Um degradierte Acker- und Weideflächen wieder mit Humus anzureichern, setzte man auf organische Düngemittel wie Klärschlamm und Gülle, die jedoch häufig mit Schwermetallen, Humanarzneimitteln oder organischen Schadstoffen wie per- und polyfluorierten Alkylsubstanzen (PFAS) belastet waren.

Ziel des Projekts war es, die Mykoremediation – also den gezielten Abbau organischer Schadstoffe durch Pilze – auf Klärschlamm und Gülle zu übertragen. Aufgrund ihres umfangreichen Enzymspektrums (Laccasen, Peroxidasen, Cytochrom P450) waren Saprobionten wie Weißfäulepilze prädestiniert für den Abbau komplexer Schadstoffe (z. B. Diclofenac, PCBs, Dioxine). Ein besonderer Schwerpunkt lag auf marinen Pilzen aus der „Flensburger Stammsammlung von Meerespilzen“ (mFSC).

Methodisch gliederte sich das Projekt in drei Phasen:

1. Screening in Labormedium

Aus rund 200–300 mFSC-Stämmen wählte man anhand ihrer Morphologie Kandidaten aus und kultivierte sie in einem flüssigen Standardmedium, das mit einem Schadstoff (Diclofenac, PFOA usw.) zugesetzt (gespikt) wurde. Den Abbauverlauf erfasste man über UHPLC-MS, die Pilzarten klassifizierte man mittels ITS/18S-Sequenzierung und hinterlegte Voucherkulturen an der DSMZ.

2. Kinetikstudien

Für die vielversprechendsten Isolate bestimmten Rein- und Mischkulturen die Abbaukinetik unter Variation von Schadstoffkonzentration und Inkubationsdauer. Ziel war es, eine stabile Pilzkultur zu entwickeln, die mehrere Schadstoffe simultan abbauen konnte.

3. Proof-of-Concept in Klärschlamm und Gülle

In Kooperation mit dem Technischen Betriebszentrum Flensburg inokulierte man gespikete Klärschlammproben mit ausgewählten Kulturen. Zur Kontrolle führte man nicht-inokulierte und nicht-gespikete Ansätze parallel. Pilzwachstum verfolgte man über die Ergosterol-Bestimmung, Abbauprodukte erfasste man zusätzlich mit einem non-targeted Metabolitprofil.

Ergebnisse

- Die UHPLC-MS-Analytik für Diclofenac und PFOA wurden erfolgreich etabliert.
- Im Screening reduzierten 9 von 41 getesteten Stämmen – überwiegend *Penicillium* spp. und einmal *Absidia cylindrospora* – nach 28 Tagen über 92 % Diclofenac; 22 % aller Stämme zeigten eine herausragende Abbaufähigkeit.
- In Kinetikversuchen mit drei Top-Stämmen korrelierte der steady-state-Abbau von Diclofenac eng mit dem Myzelwachstum; *Penicillium*-Stämme begannen bereits nach 1-2 Tagen, nahezu vollständigen Abbau im 6-Tage-Untersuchszeitraum zu erreichen.
- Beim PFAS-Modellstoff PFOA waren die Abbaumengen insgesamt gering; vereinzelt zeichnete sich ein partieller Abbau ab, die Datenqualität litt jedoch unter Mediumsverdunstung und Kontamination.

3. Schlüsselwörter

Mykoremediation, Pilze, Persistend Organic Pollutants, Arzneimittelrückstände, PFAS

4. Einleitung und Projektziel

4.1. Hintergrund und Motivation

Der Boden ist der größte terrestrische Speicher für organischen Kohlenstoff. Er enthält mehr Kohlenstoff (C) als die Atmosphäre und die Vegetation zusammen. Daher können geringfügige Veränderungen der C-Konzentration im Boden einen signifikanten Einfluss auf die Atmosphäre haben: Ein Verlust an organischem Bodenkohlenstoff bedeutet eine Freisetzung von CO₂ in die Atmosphäre, während eine Akkumulation auf eine C-Bindung im Boden („negative Emission“) hinweist (Flessa *et al.*, 2018). Der Gehalt an organischem Bodenkohlenstoff an einem bestimmten Ort wird von örtlichen Bedingungen (Klima, Wassersättigung, etc.) und der Art der Landnutzung beeinflusst. Seit der neolithischen Revolution vor ca. 12.000 Jahren führte die landwirtschaftliche Nutzung von ursprünglich mit natürlicher Vegetation bedecktem Boden zu einem geschätzten, weltweiten Verlust von 133 Gigatonnen (Gt) Kohlenstoff (488 Gt CO₂) aus dem Boden (Sanderman *et al.*, 2017). Ackerböden sind besonders an organischem C verarmt, da Pflanzenbiomasse größtenteils während der Ernte entfernt und dadurch die Zufuhr von organischer Substanz in den Boden reduziert wird. An Humus verarmte Flächen bieten gute Möglichkeiten zur C-Sequestrierung im Boden, weshalb gerade intensive Ackerbauregionen und

degradierte Weideflächen sich für solche Sequestrierungsbemühungen eignen können (Sanderman *et al.*, 2017). Die meisten Studien schätzen das weltweite biophysikalische Potenzial der C-Sequestrierung im Boden auf 4-5 Gt CO₂ (1,09-1,36 Gt C) pro Jahr, sofern Maßnahmen und Methoden für eine gezielte Erhöhung des Kohlenstoffs im Boden (sog. Best-Management-Praktiken) flächendeckend übernommen werden (Paustian *et al.*, 2019). Soziale und wirtschaftliche Hürden dürften jedoch diese Zahl etwas verringern (Sanderman *et al.*, 2017). Angesichts der globalen Treibhausgasemissionen von etwa 57,1 Gt CO₂-Äquivalenten im Jahr 2023 (United Nations Environment Programme, 2024) wird deutlich, dass die C-Sequestrierung im Boden nur einen kleinen Teil ausgleichen kann. Bei den derzeitigen Emissionen ist allerdings jede geeignete Maßnahme sowohl zur Reduzierung von Treibhausgasemissionen als auch zur Entnahme von CO₂ aus der Atmosphäre erforderlich. Die C-Sequestrierung im Boden sollte daher als ein Mittel in einer Reihe von Klimaschutzmaßnahmen verfolgt werden.

Um den Gehalt an organischem Bodenkohlenstoff auf verarmten Flächen wieder auf ein höheres Niveau zu bringen, muss insbesondere der Humus durch einen erhöhten Eintrag von organischer Substanz (Biomasse) in den Boden aufgebaut werden. Verschiedene landwirtschaftliche Praktiken unterstützen den Humusaufbau, wie z. B. der Anbau von Zwischenfrüchten, der Verbleib von Ernteresten auf dem Feld, eine ganzjährige Begrünung und die organische Düngung (Flessa *et al.*, 2018). Die organische Düngung ist das zentrale Werkzeug im Nährstoffrecycling und damit auch der C-Sequestrierung. Neben wichtigen Nährstoffen wird dabei organischer Kohlenstoff wieder zurück auf den Acker gebracht, von wo er während der Ernte entfernt wurde (Flessa *et al.*, 2018). Stallmist, Kompost, Biogasgärreste, Gülle und Klärschlamm sind gängige organische Düngemittel. Ein Problem bei organischen Düngemitteln ist die Kontamination mit anthropogenen Schadstoffen. Klärschlämme enthalten oft Schwermetalle, Arzneimittel und andere organische Schadstoffe sowie Mikro- und Nanopartikel (Roskosch & Heidecke, 2018). Bei Gülle ist die Belastung mit Tierarzneimitteln ein häufiges Problem (Vidaurre *et al.*, 2016; Adler *et al.*, 2018). Hierin besteht das Dilemma der Nutzung von Gülle und Klärschlamm als Dünger. Organische Düngemittel sollten vor synthetisch-mineralischen Düngemitteln bevorzugt werden, da sie ohnehin in der Landwirtschaft und der Abwasserbehandlung anfallen und zur C-Fixierung im Boden beitragen. Und nicht zuletzt, weil die Herstellung von synthetisch-mineralischen Düngemitteln mit einem immensen Energieaufwand (Haber-Bosch-Verfahren) einhergeht und hinzu noch abhängig von endlichen Ressourcen (i.d.R. aus Nicht-EU-Ländern) ist (Phosphatgestein, Kalisalze).

Andererseits kann Gülle und Klärschlamm aufgrund von Kontamination ein Umweltrisiko darstellen. Daher sollten belastete Klärschlämme und Gülle vor der Ausbringung behandelt werden. Bei Klärschlamm ist die Belastung mit unterschiedlichen Arten von Schadstoffen eine Herausforderung. Dies führte zu einer Novellierung der Klärschlammverordnung mit der Folge, dass ab dem Jahr 2032 nur noch Klärschlamm von Kläranlagen mit einer Größe von 50.000 Einwohnerwerten (EW) oder kleiner landwirtschaftlich genutzt werden kann. Bei größeren Anlagen muss der Klärschlamm thermisch behandelt werden. Aber auch kleinere Anlagen erhalten über das Abwasser organische Schadstoffe wie Humanarzneimittel, da bei vielen der eingenommenen Arzneimitteln ein Teil der Wirkstoffe unverändert und weiterhin wirksam den Körper passieren. In Deutschland wurde im Jahr 2012 in der Humanmedizin allein 8.120 t Arzneistoffe mit möglicher Umweltrelevanz verbraucht. Dies kann zu einem Problem für das Ökosystem werden, da von vielen Wirkstoffen bekannt ist, dass sie die Gesundheit von Organismen beeinträchtigen (Ebert *et al.*, 2014). Aufgrund des demografischen Wandels ist für die kommenden Jahrzehnte mit einer Zunahme des Humanarzneimittelverbrauchs um bis zu 68,5% zu

rechnen (civity Management Consultants, 2017), weshalb künftig auch mehr Arzneimittelrückstände im Klärschlamm zu erwarten sind. Eine andere relevante Gruppe außerordentlich schwer abbaubarer organischer Schadstoffe bilden die per- und polyfluorierten Alkylsubstanzen (PFAS). Es handelt sich um stabile, synthetische Chemikalien, die in den letzten Jahren stärker in den Fokus der Wissenschaft und Politik gerückt sind, weil von ihnen ein bisher unterschätztes Gesundheitsrisiko ausgeht. Aufgrund ihrer jahrzehntelangen Produktion und der Weiterverarbeitung in Gewerbe und Industrie haben sie sich mittlerweile flächendeckend auf der ganzen Welt und in allen Umweltmedien (Boden, Wasser, Luft) ausgebreitet. Im menschlichen Blut und sogar an entlegenen Orten mit kaum menschlicher Aktivität wie der Arktis werden sie nachgewiesen (International Agency for Research on Cancer, 2017). Selbst wenn ein Verbot dieser Stoffgruppe bald beschlossen würde, was derzeit in der EU zur Debatte steht, blieben sie aufgrund ihrer Persistenz und ohne gezielte Behandlung vorerst in der Umwelt bestehen und stellen deshalb ein Risiko für Mensch und Umwelt dar. Diese Stoffe gelangen ebenfalls in den Klärschlamm. Damit die bodenbezogene Nutzung von Klärschlamm auch in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur C-Sequestrierung und zum Nährstoffkreislauf auf lokaler Ebene leisten kann, ohne dabei einen unerwünschten, negativen Effekt auf Mensch und Umwelt zu haben, ist die Entwicklung eines Sanierungskonzeptes sinnvoll.

In den letzten Jahrzehnten nehmen Ansätze aus der Bioremediation immer mehr an Bedeutung in der Forschung und Anwendung zu. Hierbei werden gezielt lebende Organismen zur Sanierung von belasteten Substraten und Standorten eingesetzt. Der Vorteil ist, dass solche Methoden relativ kostengünstig sind und eine gute Umweltverträglichkeit haben. Bei Pflanzen ist das Akkumulationspotential von Schwermetallen von besonderem Interesse und mit Bakterien lassen sich simple Stoffe gut metabolisieren. Pilze haben im Vergleich zu Bakterien ein stärkeres Enzymsystem, weshalb sie sich besser eignen, wenn es um den Abbau von komplexeren und stabileren Stoffen geht. Diese Fähigkeit resultiert aus ihrer ökologischen Rolle der Destruenten: Pilze sind Saprobionten und haben in der Natur eine fundamentale Bedeutung bei der Zersetzung von komplexen biologischen Polymeren wie Cellulose und Lignin. Sie scheiden bestimmte Enzyme aus (Laccasen, verschiedene Peroxidasen) und besitzen Stoffwechselwege (Cytochrom P450), um diese Polymere in kleinere Moleküle abzubauen. Industriechemikalien wie polychlorierte Biphenyle (PCBs), Dioxine und Arzneimittel wie Diclofenac sind Beispiele für umweltrelevante organische Schadstoffe, die von Pilzen metabolisiert werden können (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2017; Sadañoski *et al.*, 2019; Kaewlaoyoong *et al.*, 2020). Dieser spezielle Bereich der Bioremediation, der das Potential von Pilzen sich zu Nutze macht, nennt sich Mykoremediation. Aufgrund der erwähnten und diversen anderen Studien, die zeigen, dass Pilze organische Schadstoffe metabolisieren können, sollte in diesem Projekt das Anwendungsspektrum der Mykoremediation auf belastete Gülle- und Klärschlammsubstrate erweitert werden, um die Nutzung dieser für die C-Sequestrierung und den Nährstoffkreislauf unverzichtbaren organischen Düngemittel noch umweltverträglicher zu gestalten und langfristig zu sichern. Bekannte Pilzarten, die in der Mykoremediation eingesetzt bzw. untersucht werden, sind beispielsweise der Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*) oder die Schmetterlingstramete (*Trametes versicolor*), weil sie als Weißfäulepilze für ihre Fähigkeit, schwerabbaubare Biopolymere wie Lignin abzubauen, bekannt sind. In den letzten Jahren wurde die Forschung der Mykoremediation um Pilze aus der marinen Umwelt erweitert. Pilze leben nicht nur an Land, sondern auch an allen marinen Standorten von der Küste über die freie Wassersäule bis hin zur Tiefsee. Aufgrund der Anpassung an einen erhöhten osmotischen Druck sind Meeresspilze für die Forschung von besonderem Interesse. (Passarini *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2016; Batista-García *et al.*, 2017; Birolli *et al.*, 2018; Ahumada-Rudolph *et al.*, 2021). Da es an der Hochschule Flensburg

einen Forschungsschwerpunkt in mariner Biotechnologie gibt und die Hochschule außerdem im Besitze der „Flensburger Stammsammlung von Meerespilzen“ (mFSC) ist, wurden im Rahmen des Projektes Stämme aus dieser Sammlung hinsichtlich der Abbaufähigkeit von organischen Schadstoffen untersucht.

4.2. Ziele und Methoden

Die Arbeit verfolgte das Ziel, den Forschungsstand zur Mykoremediation von bodenähnlichen Matrices – insbesondere Klärschlamm und Gülle – weiterzuentwickeln und so die Nutzung organischer Düngemittel noch umweltverträglicher zu gestalten. Hierfür war ein dreistufiger Prozess vorgesehen:

4.2.1. Screening

Aus der „Flensburger Stammsammlung von Meerespilzen“ (mFSC) wurden gezielt Pilzstämme ausgewählt und auf ihre Fähigkeit gescreent, organische Schadstoffe abzubauen. Die Kultivierung erfolgte in einem flüssigen Standardmedium, das mit reinen Zielsubstanzen (z. B. Diclofenac, PFOA) gespickt war. Die Abbaurate und mögliche Metaboliten wurden mittels UH-PLC-MS bestimmt. Ergänzend führten die Forschenden Literaturrecherchen und zellbasierte Toxizitätsassays durch, um die Umweltverträglichkeit auftretender Abbauprodukte abzuschätzen. Geplant war, 200–300 Stämme auf den Abbau von 5–6 Substanzen zu untersuchen. Besonders leistungsfähige Isolate wurden ausgewählt, taxonomisch mittels ITS/18S-Sequenzen charakterisiert und als Voucherkulturen in der DSMZ hinterlegt.

4.2.2. Untersuchungen zur Abbaukinetik

Mit den vielversprechendsten Stämmen führten die Projektbeteiligten Rein- und Mischkulturversuche durch, um die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des Schadstoffabbaus zu ermitteln. Synergistische Effekte verschiedener Pilzstämme sollten gezielt genutzt werden. Zentrale Kenngrößen waren Abbauraten, Restkonzentrationen und das Profil verbliebener bzw. transformierter Substanzen. Ziel war die Etablierung stabiler Pilzkulturen, die mehrere Zielverbindungen in einem Ansatz effizient eliminieren konnten.

4.2.3. In-situ-Versuche im Klärschlamm und in der Gülle

Aufbauend auf den Kinetikdaten wurden Proof-of-Concept-Experimente mit echten Klärschlamm- und Gülleproben durchgeführt (in Kooperation mit den Stadtwerken Flensburg). Die Substrate wurden mit definierten Schadstoffkonzentrationen versetzt („Spiking“) und entweder mit Reinkulturen oder stabilen Mischkulturen inokuliert. Parallel liefen nicht-gespickte sowie nicht-inokulierte Kontrollen. Nach Inkubation extrahierte man das Material, quantifizierte das Pilzwachstum über Ergosterol und bestimmte die Konzentrationen der Ausgangs- und Abbauprodukte. Ein non-targeted Metabolit-Screening (Massen- und Absorptionsspektren) diente der Detektion bislang unbekannter Abbauprodukte.

Um diese drei Stufen durchzuführen, mussten zahlreiche Methoden etabliert werden. Dies führte zu entsprechenden Publikationen.

5. Projektergebnisse

5.1. Etablierung der Analytik

Eine Analytikmethode für die untersuchten Stoffe war im Labor nicht vorhanden und musste entwickelt und validiert werden. Zunächst wurde an einer HPLC (High-performance liquid chromatography) mit UV-Detektor versucht, eine Methode für Diclofenac aufzubauen. Diclofenac konnte an dem Gerät zwar detektiert werden, allerdings war die Sensitivität nicht hoch genug. Daraufhin wurde eine Analytikmethode an einer UHPLC-MS (Ultra high-performance liquid chromatography–mass spectrometry) etabliert. Hierbei werden die Stoffe wie in einer HPLC erst aufgetrennt und anschließend in einem Massenspektrometer detektiert. Sowohl ein non-targeted Scan von allen Stoffen als auch ein Single Ion Recording (SIR), bei dem nur der entsprechende Metabolit untersucht wird, wurden bei den Analysen aufgezeichnet. Um mit der UHPLC-MS auch die infrage kommenden Stoffe quantifizieren zu können, wurde für jede Verbindung eine Kalibriergerade angelegt.

5.2. Screening

Zunächst wurden verschiedene Stämme aufgrund ihrer Morphologie ausgewählt und gescreent, das heißt, dass ihre Abbaufähigkeit hinsichtlich organischer Schadstoffe in einem flüssigen Standardmedium getestet wurde. Das Flüssigmedium ist speziell für Meeresspilze konzipiert und wird mit einem Schadstoff zugesetzt gespickt. So können die Pilzisolat zeigen, wie gut sie einen Schadstoff in „einfachen“ Umweltbedingungen metabolisieren. Der erste Schadstoff, der getestet wurde, war das Analgetikum Diclofenac, besser bekannt unter dem Namen Voltaren[®]. Diclofenac ist für seine verheerende Wirkung auf Ökosysteme berüchtigt, insbesondere für den Zusammenbruch der Geierpopulation auf dem indischen Subkontinent (Green *et al.*, 2004; Oaks *et al.*, 2004). In Proben aus deutschen Oberflächengewässern wird Diclofenac regelmäßig nachgewiesen (Umweltbundesamt, 2023). Dabei sind beispielsweise die in den Proben gemessenen Konzentrationen teilweise deutlich über der LOEC (Lowest observed effect concentration) für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Bei einer zu hohen Konzentration des Stoffes wurden bei *O. mykiss* zytologische Veränderungen in Leber, Niere und Kiemen festgestellt (Tribskorn *et al.*, 2004). Mit Diclofenac wurden 41 Stämme aus den Gattungen *Peni-*

cillium, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cadophora*, *Phoma* gescreent. In den 4-wöchigen Screeningversuchen hat sich gezeigt, dass es unter den marinen Pilzen einige Exemplare gibt, die in der Lage sind, Diclofenac zu metabolisieren (Abbildung 1).

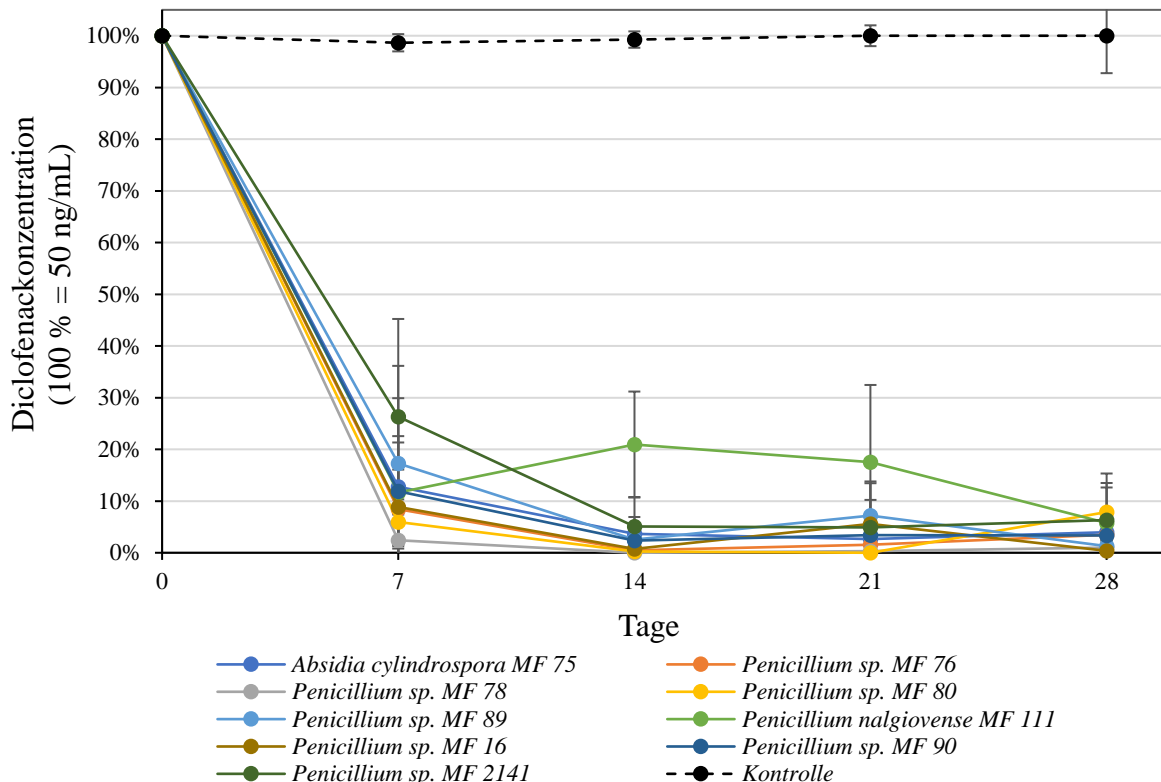


Abbildung 1. Abbau von Diclofenac durch Pilze der Flensburger Stammsammlung von Meerespilzen (mFSC). Gezeigt ist die Gesamtkonzentration in der Kultur über 28 Tage. Die Kontrolle stellt den Wirkstoff im Medium ohne Pilzkultur dar. 100% entsprechen 50 ng/mL. Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab.

Es ist zu unterstreichen, dass in diesen Versuchen nicht die Restkonzentration im bloßen Medium, sondern in der gesamten Kultur samt Pilzbiomasse gemessen wurde. Dies hat den Hintergrund, dass manche Stoffe auf der Zelloberfläche von Pilzen adsorbiert, jedoch nicht abgebaut und bei einer ausschließlichen Untersuchung des Mediums nicht detektiert werden. Durch die Extraktion der gesamten Kultur wird sichergestellt, dass alle vorhandenen Moleküle tatsächlich gemessen werden. Um die Restkonzentration eines Schadstoffes zu bestimmen, wurde an einer UHPLC-MS (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie) die Analytik etabliert. Abbildung 1 zeigt die 9 Stämme unter den 41 gescreentem Isolaten, die am besten abgeschnitten haben. Außer *Absidia cylindrospora* MF75 gehören alle anderen der Gattung *Penicillium* an. Es ist festzuhalten, dass immerhin 22% der gescreentem Isolate der Stammsammlung eine hervorragende Leistung hinsichtlich des Abbaus von Diclofenac in einem Labormedium aufzeigen. Dies lässt Hoffnungen zu, dass bei weiterer Suche noch mehr fähige Pilze gefunden werden können. Abbildung 1 zeigt außerdem, dass am Ende der 28 Tage die restliche Konzentration von Diclofenac bei den hier aufgeführten, vielversprechenden Pilzstämmen nur noch zwischen 0 und 8 % lag und dass der größte Teil des Diclofenacs innerhalb der ersten 7 Tage abgebaut werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Abbaukinetik der ersten 6 Tage mithilfe von 3 Pilzen genauer untersucht (siehe 5.3).

Neben Diclofenac wurde aus der Gruppe der Arzneistoffe das Antibiotikum Oxytetracyclin getestet. Allerdings wurde während der Versuche dieser Stoff auch in der abiotischen Kontrolle ohne Pilz abgebaut. Da die Versuche im Dunkeln abgehalten wurden, kann es sich nicht um einen photolytischen Abbau handeln. Es könnte eventuell eine oxidative oder hydrolytische Degradation vorliegen. Dies ist jedoch nicht im Einklang mit Studien, in denen Oxytetracyclin in einem ähnlichen Versuchsaufbau mithilfe von Pilzen abgebaut wurde und entsprechende Kontrollversuche keinen abiotischen Abbau vorwiesen (Migliore *et al.*, 2012; Ahumada-Rudolph *et al.*, 2021). Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden in diesem Bericht nicht vorgestellt.

Der nächste Stoff, der untersucht wurde, ist die zur Gruppe der PFAS gehörende Perfluorooctansäure (PFOA). Hierbei wurden 18 Pilzstämmen gescreent. Abbildung 2 zeigt die Abbauleistung von 7 Stämmen, die eine vergleichsweise „bessere“ Leistung erbracht haben. Insgesamt fällt der Abbau von PFOA durch die Pilze eher mager aus. Nur beim Stamm MF 2169 (eine molekulargenetische Bestimmung steht noch aus), zeichnet sich ein bisschen Abbau ab. Bei der Interpretation der Abbildung muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Medium teilweise evaporiert ist. Weniger Medium bei potenziell gleicher Schadstoffmenge würde zu einer Erhöhung der PFOA-Konzentration führen. Dies würden die Werte über 100 % erklären. Vor diesem Hintergrund könnte es aber sein, dass die Pilze mehr PFOA als dem Anschein nach metabolisiert haben. Derzeit wird die Verdunstungsrate des Mediums versucht zu bestimmen. Abbildung 2 zeigt außerdem auch, dass der Stamm MF 2169 eine hohe Standardabweichung hat. Der Hintergrund hierzu ist, dass, während beim ersten Versuchsdurchlauf Restkonzentration des PFOAs von 64 % bis 51 % erzielt wurden, es in der zweiten Wiederholung kaum einen Abbau gegeben hat. Nach der Wiederholung wurde festgestellt, dass die Agarplatten von MF 2169, die für die Inokulation des Flüssigmediums verwendet wurden, kontaminiert waren. Allerdings hat eine Trennung der verschiedenen Stämme auf den Agarplatten und ein anschließender Versuch mit den isolierten Stämmen keinen aussagekräftigen Abbau gezeigt.

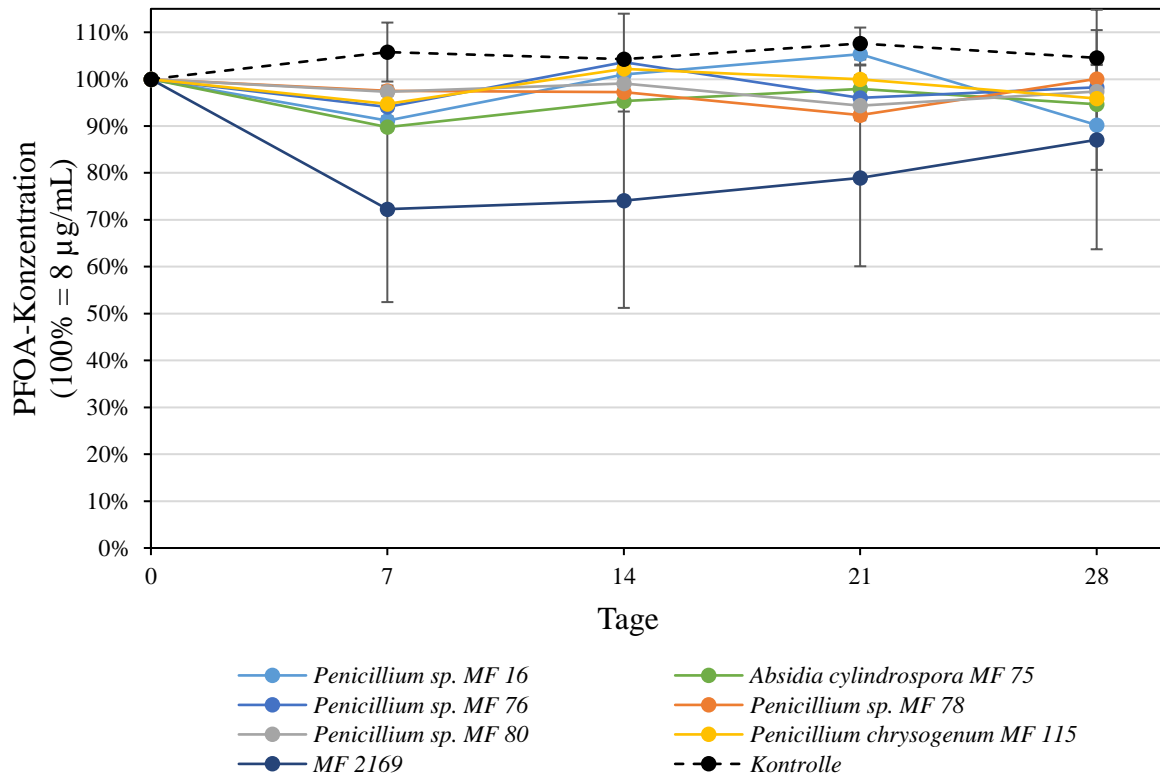


Abbildung 2. Abbau von PFOA durch Pilze der Flensburger Stammsammlung von Meerespilzen (mFSC). Gezeigt ist die Gesamtkonzentration in der Kultur über 28 Tage. Die Kontrolle stellt den Wirkstoff im Medium ohne Pilzkultur dar. 100% entsprechen 8 µg/mL. Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab.

5.3. Abbaukinetik

Abbildung 3 zeigt den Abbau von Diclofenac und das Wachstum der Pilze *Absidia cylindrospora* MF 75 (A), *Penicillium sp.* MF 76 (B) und *Penicillium sp.* MF78 (C) während der ersten 6 Tage in einem flüssigen Labormedium. Beide *Penicillium*-stämmen haben eine ähnliche Abbaukinetik und einen ähnlichen Biomassezuwachs: Der relativ stete Abbau von Diclofenac geht einher mit einem stetigen Wachstum des Myzels (die Gesamtheit aller filamentösen Zellen). Bei *Absidia cylindrospora* MF 75 nimmt der Abbau erst ab Tag 3 Fahrt auf. Allerdings ist der Abbau an Tag 5 auch schon fast abgeschlossen. Das kann darauf hindeuten, dass erst ab einer bestimmten Biomasse genügend Energie vorhanden ist, um Diclofenac zu metabolisieren. Dieser Pilz baut insgesamt weniger Biomasse auf und die Zuwachsrate ist weniger steil als bei den beiden *Penicillium*-stämmen. Esterhuizen-Londt *et al.* (2017) hat in ihren Versuchen zeigen können, dass der Pilz *Mucor hiemalis* in der Lage war die Konzentration von Diclofenac in einem Flüssigmedium schon nach 24 Stunden um 95% zu reduzieren.

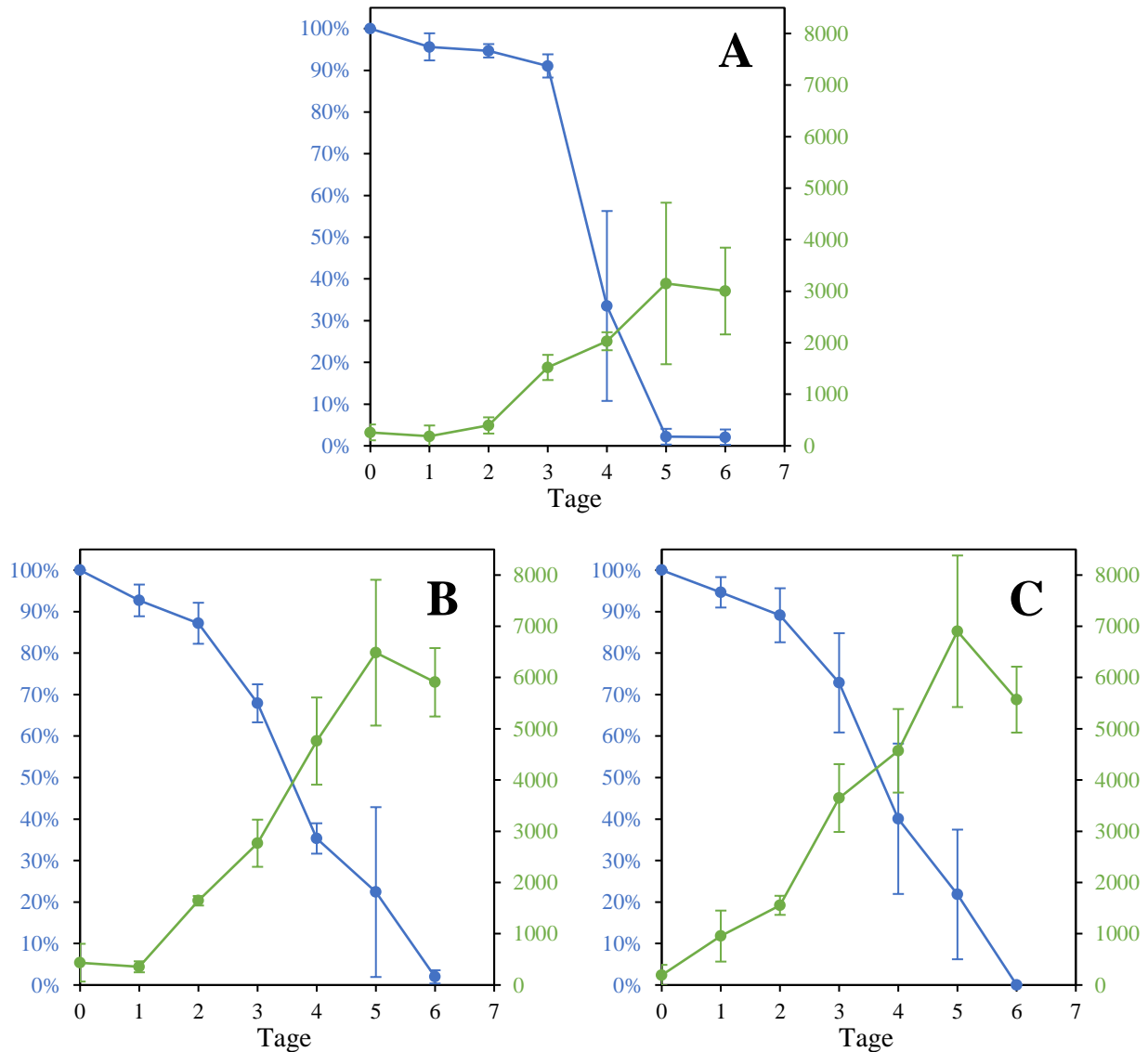


Abbildung 3. Abbau von Diclofenac durch Pilze der Flensburger Stammsammlung von Meeresspilzen (mFSC) über 6 Tage. A: *Absidia cylindrospora* MF 75, B: *Penicillium* sp. MF 76, C: *Penicillium* sp. MF 78. Blaue Linie und linke Y-Achse: Diclofenackonzentration (100% entsprechen 50 ng/mL). Grüne Linie und rechte Y-Achse: Pilzbiomasse in mg/L Medium. Die Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab.

5.4. Klärschlamm

Der Klärschlamm für die Proof-of-Concept-Versuche wurde vom Technischen Betriebszentrum Flensburg (TBZ) bereitgestellt. Das TBZ betreibt ein Klärwerk an der Flensburger Förde mit einer Reinigungskapazität für 224.000 Einwohnerwerte. Das Klärwerk besitzt eine vierte Reinigungsstufe mit Aktivkohle. Eine solche vierte Reinigungsstufe hilft deutlich mehr Schadstoffe aus dem Abwasser heraus zu filtern. Doch trotz einer zusätzlichen Reinigungsstufe können nicht alle Schadstoffe entzogen werden. Daher sind Methoden, die einer vollständigen Eliminierung von Schadstoffen im Interesse der Gesellschaft. Als Substrat wurde zunächst der flüssige Teil des Klärschlammes verwendet, der nach der Entwässerung (Zentrifugation) des Klärschlammes anfällt. Der Abbaubersuch wurde für einen ersten Versuch auf eine Woche gesetzt. Die Ergebnisse zeigen keinen Abbau. Dies könnte allerdings damit zusammenhängen,

dass Diclofenac in der Matrix bereits vorhanden war (aufgrund der Verwendung durch Menschen). Dabei könnte der Stoff an Partikeln haften (adsorbiert sein) und während der Inkubation, bei der die Substrate ständig geschüttelt werden, allmählich freigesetzt werden.

6. Evaluation und Ausblick

6.1. Publikationen und Arbeiten zur Promotion

Bisher wurde ein Artikel in der Zeitschrift *Frontiers in Marine Science* veröffentlicht: *Mycoremediation of sewage sludge and manure with marine fungi for the removal of organic pollutants* (Stiebeling & Labes, 2022).

6.2. Sonstige akademische Arbeiten und persönliche Weiterentwicklung

6.2.1. Konferenzen

- Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2022, Onlinekonferenz, 21.–23.02.2022, mit Poster
- Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2022, Mainz, 23.–25.05.2022
- Molecular Biology of Fungi 2022, Kaiserslautern, 7.–9.09.2022
- Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2023, Göttingen, 10.–13.09.2023
- Molecular Biology of Fungi 2024, Kiel, 11.–13.09.2024, mit Vortrag
- 22nd Symposium on remediation in Jena “Jenaer Sanierungskolloquium“, 10.–11.10.2024

6.2.2. Vorträge

- „Microbial Remediation Potentials“, Aktuelles aus der blauen Biotechnologie, Online, 30.11.2021
- „Mycoremediation of Diclofenac with Marine Fungi“, Molecular Biology of Fungi 2024, Kiel, 13.09.2024
- „Planet der Pilze“ auf der Veranstaltung Gelehrte Gläser in Flensburg organisiert von der Hochschule Flensburg, 04.07.2024

6.2.3. Poster

„Marine fungi as a source for mycoremediation of manure and sewage sludge“, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2022, Onlinekonferenz, 21.–23.02.2022

6.2.4. Lehre

Zu meinen Tätigkeiten gehörte auch die Betreuung von Studierenden im Labor und während ihrer Ausarbeitung ihrer Thesis. Es waren sowohl deutsche Studierende als auch indonesische von unserer Partnerhochschule University of Jember.

6.2.5. Zusammenarbeit mit Wissenschaftler*innen anderer Institute

Die UHPLC-MS wurde auch für Untersuchungen im Rahmen externer Projekte bereitgestellt. Dank der Partnerschaft mit der University of Jember in Indonesien gibt es einen starken Austausch mit Wissenschaftler*innen dieser Hochschule. In diesem Rahmen habe ich an einer massenspektrometrischen Untersuchung von lokalen Pilzmetaboliten mitgewirkt. Außerdem habe ich mit einer Wissenschaftlerin der CAU Kiel eine Analysemethode entwickelt, um nach Metaboliten zu suchen, die beim Plastikabbau durch Pilze entstehen.

6.3. Ausblick

6.3.1. Angestrebte Promotion

Die Promotion ist an der CAU Kiel angemeldet und wird voraussichtlich 2026 finalisiert.

6.3.2. Vorschläge für nächste Versuche

Auf Grundlage der im Labormedium gewonnenen Befunde werden die Kultivierungsbedingungen weiter optimiert und gezielt Mischkulturen etabliert, um die Abbauleistung insbesondere bei hartnäckigen Schadstoffen wie PFAS zu steigern. Anschließend werden in-situ-Versuche in realen Klärschlamm- und Gülleproben durchgeführt, um die Effektivität der ausgewählten Pilzstämme unter praxisnahen Bedingungen zu überprüfen. Mit den so gesammelten Erkenntnissen entsteht ein integriertes Sanierungskonzept, das die langfristige Nutzung von Klärschlamm und Gülle als sichere, organische Dünger für die Kohlenstoffsequestrierung und den Nährstoffkreislauf gewährleisten kann.

7. Literaturverzeichnis

- Adler, N., Balzer, F., Blondzik, K., Brauer, F., Chorus, I., Ebert, I., et al. (2018). Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt: Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen. German Environment Agency. Dessau-Roßlau, Germany. ISSN: 2363-829X.
- Ahumada-Rudolph, R., Novoa, V., Becerra, J., Cespedes, C. and Cabrera-Pardo, J.R. (2021). Mycoremediation of oxytetracycline by marine fungi mycelium isolated from salmon farming areas in the south of Chile. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112198. doi: 10.1016/j.fct.2021.112198.
- Batista-García, R.A., Kumar, V.V., Ariste, A., Tovar-Herrera, O.E., Savary, O., Peidro-Guzmán, H., et al. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *Journal of Environmental Management*, 198(Pt 2), 1–11. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.05.010.
- Birilli, W.G., A Santos, D. de, Alvarenga, N., Garcia, A.C.F.S., Romão, L.P.C. and Porto, A.L.M. (2018). Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 525–533. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.10.023.
- civcity Management Consultants (2017). Arzneimittelverbrauch im Spannungsfeld des demografischen Wandels: Die Bedeutung des wachsenden Medikamentenkonsums in Deutschland für die Rohwas-

- serressourcen. Eine Studie der civity Management Consultants im Auftrag des BDEW. Berlin, Germany. Available from: https://civity.de/asset/de/sites/3/2018/05/anzneimittelstudie_final_20171218.pdf [Accessed 23 February 2024].
- Ebert, I., Amato, R., Hein, A. and Konradi, S. (2014). Arzneimittel in der Umwelt - vermeiden, reduzieren, überwachen. German Environment Agency. Dessau-Roßlau, Germany. Available from: https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/01.08.2014_hintergrundpapier_arzneimittel_final_.pdf [Accessed 23 February 2024].
- Esterhuizen-Londt, M., Hendel, A.-L. and Pflugmacher, S. (2017). Mycoremediation of diclofenac using *Mucor hiemalis*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99(5-6), 795–808. doi: 10.1080/02772248.2017.1296444.
- Flessa, H., Don, A., Jacobs, A., Dechow, R., Tiemeyer, B. and Poeplau, C. (2018). Humus in landwirtschaftlich genutzten Böden Deutschlands: Ausgewählte Ergebnisse der Bodenzustandserhebung. Thünen-Institute of Climate-Smart Agriculture. Available from: https://www.thuenen.de/media/institute/ak/Allgemein/news/Bodenzustandserhebung_Landwirtschaft_Kurzfassung.pdf [Accessed 23 February 2024].
- Green, R.E., Newton, I., Shultz, S., Cunningham, A.A., Gilbert, M., Pain, D.J., et al. (2004). Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *Journal of Applied Ecology*, 41(5), 793–800. doi: 10.1111/j.0021-8901.2004.00954.x.
- International Agency for Research on Cancer (2017). Some Chemicals Used as Solvents and in Polymer Manufacture. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
- Kaewlaoyong, A., Cheng, C.-Y., Lin, C., Chen, J.-R., Huang, W.-Y. and Sriprom, P. (2020). White rot fungus *Pleurotus pulmonarius* enhanced bioremediation of highly PCDD/F-contaminated field soil via solid state fermentation. *The Science of the Total Environment*, 738, 139670. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139670.
- Migliore, L., Fiori, M., Spadoni, A. and Galli, E. (2012). Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium: a mycoremediation technique. *Journal of Hazardous Materials*, 215-216, 227–232. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.02.056.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., et al. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630–633. doi: 10.1038/nature02317.
- Passarini, M.R.Z., Rodrigues, M.V.N., Da Silva, M. and Sette, L.D. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(2), 364–370. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.003.
- Paustian, K., Larson, E., Kent, J., Marx, E. and Swan, A. (2019). Soil C Sequestration as a Biological Negative Emission Strategy. *Frontiers in Climate*, 1. doi: 10.3389/fclim.2019.00008.
- Roskosch, A. and Heidecke, P. (2018). Klärschlamm Entsorgung in der Bundesrepublik Deutschland. German Environment Agency. Dessau-Roßlau, Germany. ISSN: 2363-832X.
- Sadañoski, M.A., Benítez, S.F., Fonseca, M.I., Velázquez, J.E., Zapata, P.D., Levin, L.N., et al. (2019). Mycoremediation of high concentrations of polychlorinated biphenyls with *Pleurotus sajor-caju* LBM 105 as an effective and cheap treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(6), 103453. doi: 10.1016/j.jece.2019.103453.
- Sanderman, J., Hengl, T. and Fiske, G.J. (2017). Soil carbon debt of 12,000 years of human land use. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36), 9575–9580. doi: 10.1073/pnas.1706103114.
- Shang, Z., Salim, A.A., Khalil, Z., Bernhardt, P.V. and Capon, R.J. (2016). Fungal Biotransformation of Tetracycline Antibiotics. *The Journal of Organic Chemistry*, 81(15), 6186–6194. doi: 10.1021/acs.joc.6b01272.
- Stiebeling, D.A. and Labes, A. (2022). Mycoremediation of sewage sludge and manure with marine fungi for the removal of organic pollutants. *Frontiers in Marine Science*, 9. doi: 10.3389/fmars.2022.946220.

- Tribskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R. and Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 68(2), 151–166. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.015.
- Umweltbundesamt (2023). *Arzneimittelwirkstoffe in Oberflächengewässern*. Available from: https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/styles/fullsize/public/medien/384/bilder/5_abb_amw-konz-ueber-0-1mg-ofg-2021_2023-08-23.png?itok=-coz89_f [Accessed 22 February 2024].
- United Nations Environment Programme (2024). Emissions Gap Report 2024: No more hot air ... please! With a massive gap between rhetoric and reality, countries draft new climate commitments. Nairobi, Kenya. UNEP Emissions Gap Reports. doi: 10.59117/20.500.11822/46404.
- Vidaurre, R., Lukat, E., Steinhoff-Wagner, J., Ilg, Y., Petersen, B., Hannappel, S., et al. (2016). Konzepte zur Minderung von Arzneimitteleinträgen aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung in die Umwelt. German Environment Agency. Dessau-Roßlau, Germany. ISSN: 2363-832X.