

FORSCHEN FÜR DIE UMWELT / 4. AUSGABE

WASSERPILZE UND UMWELTSCHADSTOFFE

Gudrun Krauß und Dietmar Schlosser

WASSERPILZE UND UMWELTSCHADSTOFFE

Dietmar Schlosser und Gudrun Krauß

Aquatische Hyphomyceten sind Wasserpilze. Zu Hause sind sie in Bächen, Flüssen, Seen, oder Teichen und ernähren sich vom dort vorhandenen organischen Material. Dass sie außergewöhnliche Fähigkeiten im Hinblick auf das Selbstreinigungspotenzial von Gewässern haben, fanden Wissenschaftler erst vor wenigen Jahren heraus. So können sie in erstaunlicher Weise Schwermetalle tolerieren, sie anreichern und der Ausbreitung über oberirdische Gewässerpfade oder dem Eintrag in das Grundwasser entgegenwirken.

Außerdem versetzt sie ein spezielles extrazelluläres Enzym – Laccase – in die Lage, unspezifisch eine Vielzahl von organischen Substanzen anzugreifen. Bereits Spurenkonzentrationen der unterschiedlichsten Substanzen mit bekanntem oder auch unbekanntem Risikopotenzial könnten so abgebaut werden. Für die Forschung ein interessantes Feld ...

Autoren:

Dietmar Schlosser, Dr. rer. nat., ist Leiter der Nachwuchsgruppe
»Mikrobiologie des unterirdischen Wassers« am UFZ

Gudrun Krauß, Dr. rer. nat., ist
wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Nachwuchsgruppe
»Mikrobiologie des unterirdischen Wassers« am UFZ

Dieser Beitrag entstand auf der Grundlage wissenschaftlicher
Arbeiten und Publikationen sowie unter Mitwirkung von

Dr. Kandikere Ramaiah Sridhar, wissenschaftlicher
Mitarbeiter in der Mangalore Universität, Indien;

Dr. Rainer Wennrich und Dr. Monika Möder,
wissenschaftliche Mitarbeiter in der Sektion Analytik des UFZ;

Dr. Gerhard Strauch, wissenschaftlicher Mitarbeiter
in der Sektion Hydrogeologie des UFZ;

Dr. Thomas R. Neu, wissenschaftlicher Mitarbeiter
in der Sektion Gewässerforschung des UFZ;

M.Sc. Deepak Jain, Doktorand in der Nachwuchsgruppe
»Mikrobiologie des unterirdischen Wassers« am UFZ.



Pilze haben viele Gesichter

Mit dem Begriff »Pilze« verbinden die meisten Menschen ohne Mikroskop sichtbare Gebilde, die häufig aus Hut und Stiel bestehen und teils essbar, teils aber auch giftig sind. Tatsächlich handelt es sich dabei lediglich um die der sexuellen Vermehrung dienenden Fruchtkörper von »Großpilzen« (Macrofungi), die zirka 90 Prozent der heute bekannten in etwa 100.000 Arten von Pilzen ausmachen. Schätzungen, die bisher noch nicht bekannte Pilzarten mit einbeziehen, gehen von zirka 250.000 bis 1,5 Millionen Arten aus. Der eigentliche, häufig nicht sichtbare Teil dieser Organismen existiert in Form so genannter Hyphen, fadenförmiger Stränge zusammenhängender Zellen, die in ihrer Gesamtheit das Mycel bilden. Großpilze werden in zwei Klassen eingeteilt, die der Ständerpilze (*Basidiomycetes*) und die der Schlauchpilze (*Ascomycetes*). Gemeinsam mit den »niederen Schimmelpilzen« (Microfungi) bilden sie das Reich der Echten Pilze (*Eumycota*). Im Gegensatz zu Pflanzen, zu denen Pilze früher gezählt wurden, sind sie nicht zur Photosynthese in der Lage und deshalb auf durch andere Organismen produzierte energiereiche Verbindungen als Lebensgrundlage angewiesen.



Bild 1: Probenahme aus einem Grundwasserpegel im Mansfelder Land. Die Probenahme-Beutel enthalten Erlenblätter, auf denen sich die Pilze ansiedeln können. (Quelle: Dr. Gudrun Krauß).



Bild 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines von einem aquatischen Hyphomyceten besiedelten Erlenblattes, das zuvor in unbewachsenem Zustand in einen Grundwasserbrunnen ausgebracht wurde. (Quelle: Jim Ehrman, Kanada).

Pilze spielten und spielen für die Menschheit eine beträchtliche ökologische (Funktion für Stoffkreisläufe und Nahrungsnetze), wirtschaftliche (Wirkung als Nützlinge oder Schädlinge), medizinische (als Antibiotika-Bildner oder Parasiten) und auch kulturelle (Pilze als Kultgegenstände, halluzinogene Pilze) Rolle. Ein prominentes Beispiel für einen schädlichen Pilz ist der Erreger der Kartoffelfäule, *Phytophthora infestans*, der im vorletzten Jahrhundert in Irland mehrere Kartoffelernten vernichtete und somit dafür mit verantwortlich war, dass dort zwischen 1845 und 1850 ungefähr eine Million Menschen verhungerte; ein Ereignis, das maßgeblich zur Auswanderung vieler Iren in die USA beitrug. Ausgesprochen nützlich und wichtig für medizinische Anwendungen sind hingegen Antibiotika bildende Arten wie der zur Bildung von Penicillin befähigte Schimmelpilz *Penicillium notatum*, der 1928 von A. Fleming entdeckt wurde. Weitere Beispiele für nützliche Pilze in der Nahrungsmittelproduktion repräsentieren die zur Herstellung von Wein oder Bier notwendigen Hefen oder die zur Produktion mancher Käsesorten eingesetzten Edelschimmel.

Die Hyphomyceten gehören zu den so genannten mitosporen oder auch imperfekten Pilzen. Dabei handelt es sich um Pilze, in deren Entwicklungszyklus ein Sexualvorgang fehlt. Aquatische Hyphomyceten wiederum sind Pilze, die an das Leben in aquatischen Ökosystemen angepasst sind. Bis vor einigen Jahren war weitgehend unbekannt, dass solche Organismen nicht nur eine erstaunliche Toleranz gegenüber stofflichen Umweltbelastungen besitzen, sondern auch über spezielle katalytische und Anpassungsmechanismen für die Auseinandersetzung mit Schadstoffen verfügen. Aquatische Hyphomyceten wurden in erstaunlicher Vielfalt in hoch Schwermetall- und Organika belasteten Oberflächenwässern und deren Sedimenten gefunden. Der erste Nachweis einer beachtlichen Zahl unterschiedlicher Wasserpilzarten in kontaminierten Grundwässern gelang den Wissenschaftlern im Jahr 2002 (Bilder 1 und 2).

Wasserpilze als Biokatalysatoren

Seit zwei Jahren befasst sich eine interdisziplinär zusammengesetzte Gruppe von Wissenschaftlern des UFZ mit dem Thema Stadthydrologie, das heißt mit der Wirkung städtischer Nutzung auf ober- und unterirdische aquatische Systeme. Durch Oberflächenabflüsse, beispielsweise von versiegelten Flächen, durch Leckagen in Abwassersystemen, sowie durch unvollständigen Abbau von umweltbedenklichen Substanzen in Kläranlagen gelangen unterschiedlichste Wasserinhaltsstoffe in den urbanen Wasserkreislauf und können von dort aus über Versickerungs- und Transportprozesse das Grundwasser kontaminieren. Das geschieht

nicht erst seit »heute«, jedoch rückten einige Substanzen erst in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses. Der Grund dafür ist auch darin zu suchen, dass erst die Entwicklung neuer, sensiblerer analytischer Methoden ihren Nachweis möglich machte. Zu den genannten Substanzen gehören beispielsweise biologisch unvollständig abgebaute Tenside, in Plastikprodukten enthaltene »Weichmacher«, unterschiedliche Inhaltsstoffe von Kosmetika, sowie Steroidhormone und andere Arzneimittelin-

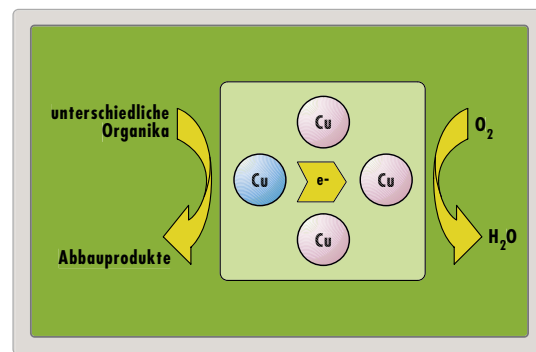


Bild 3: Das extrazelluläre Enzym Laccase kann unspezifisch eine Vielzahl von organischen Verbindungen oxidieren, im Gegenzug wird Luftsauerstoff zu Wasser reduziert. Das katalytische Zentrum des Enzyms enthält vier Kupferatome.

haltsstoffe. Einige dieser Substanzen stellen offensichtlich ein Risiko für die menschliche Nutzung von Wässern sowie für natürliche Ökosysteme dar. So wurden für eine Reihe von Verbindungen hormonähnliche Wirkungen bei Wirbeltieren nachgewiesen. Ob und in welchem Maße diese Verbindungen durch Mikroorganismen, die in Gewässerökosystemen natürlicherweise vorkommen, beseitigt werden, ist oft nur teilweise oder gar nicht bekannt.

Während beispielsweise natürliche Steroidhormone recht schnell in der Umwelt abgebaut werden, scheinen künstliche Steroide, wie sie in der »Pille« verwendet werden, bedeutend langsamer umgesetzt zu werden.

Generell findet der biologische Abbau von Schadstoffen schrittweise über mehrere Zwischenprodukte statt. Erfolgt er vollständig, führt er letztendlich zu Kohlendioxid und Wasser. Zur Anreicherung von Abbauprodukten in der Umwelt kommt es dann, wenn die Substanzen nicht vollständig abgebaut werden oder wenn die weiteren Abbauschritte langsamer verlaufen als die den Abbau einleitenden Schritte. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum vollständigen Abbau fehlen oder konkrete Umweltbedingungen, wie die Konzentration an verfügbarem Sauerstoff, ihn nicht begünstigen.

Kommt es unter diesen Umständen zu einer Anreicherung von Abbauprodukten, ist es wichtig, daraus resultierende potenzielle neue Risiken zu untersuchen. So besteht ein häufig beobachteter



Effekt darin, dass Abbaureaktionen bei schlecht wasserlöslichen (hydrophoben) Kontaminanten zur Bildung besser wasserlöslicher Produkte führen, die dann verstärkt in der Umwelt verbreitet, beispielsweise in das Grundwasser transportiert werden. Auch sind mögliche Wirkungen von Abbauprodukten auf Gewässerorganismen und den Menschen zu berücksichtigen.

Für eine nachhaltige und sichere Nutzung von Wasserressourcen ist es also unumgänglich zu wissen, wie Mikroorganismen organische Wasserschadstoffe abbauen und welche Folgeprodukte entstehen. Doch welche Rolle spielen dabei aquatische Pilze?

Arbeiten der Nachwuchsgruppe Mikrobiologie des unterirdischen Wassers konnten im Jahr 2002 belegen, dass viele aquatische Pilze ein spezielles extrazelluläres, Laccase genanntes Enzym besitzen und dieses in der Lage ist, unspezifisch organische Verbindungen, darunter eine Vielzahl von Umweltschadstoffen, zu oxidieren (Bild 3). Pilzliche Laccasen waren bislang im Wesentlichen bei Land bewohnenden Arten bekannt, die Holz und anderes natürliches Material zersetzen. Dort sind diese Enzyme am Abbau des Lignins, der am schwierigsten biologisch abbaubaren Komponente verholzter pflanzlicher Zellwände, beteiligt. Als weitere natürliche Funktion vermuten die Wissenschaftler die Fähigkeit zur Oxidation und damit Detoxifizierung von phenolischen Pflanzeninhaltsstoffen, die für Pilze gefährlich werden können.

Im Gegensatz zu vielen intrazellulären mikrobiellen Enzymen, die häufig nur eine oder wenige chemisch eng verwandte Verbindungen angreifen und außerdem oft erst ab einer bestimmten Konzentration der Fremdstoffe entstehen, ist die Bildung von Laccasen infolge ihrer Funktion beim Abbau natürlichen organischen Materials Bestandteil der natürlichen Lebensweise von Pilzen und damit vom Vorhandensein eines Schadstoffes unabhängig. Aufgrund der geringen Substratspezifität solcher Enzyme können bereits Spurenkonzentrationen unterschiedlicher Fremd- oder Schadstoffe gewissermaßen »nebenbei« mit abgebaut werden, eine Eigenschaft, die sie für die Forscher interessant macht.

Neben ihrer Umweltrelevanz besitzen Laccasen ein sehr großes Potenzial für die Biotechnologie, denn sie können in Abhängigkeit von den jeweiligen Ausgangssubstraten und Reaktionsbedingungen sowohl den Abbau organischer Verbindungen als auch deren Umwandlung in wirtschaftlich interessante Substanzen mit neuen Eigenschaften katalysieren – und das bei reduziertem Einsatz Umwelt belastender Chemikalien und weniger energieintensiv. Beispiele hierfür sind Delignifizierungs- und Bleicheprozesse in der Holz- und Zellstoffindustrie, die enzymatische Fasermodifizierung, die Bleichung von Textilfarbstoffen, oder die Herstellung

von Verbundwerkstoffen aus nachwachsenden Rohstoffen. Weitere potenzielle Anwendungen bestehen in der Synthese von Pigmenten für die Kosmetikindustrie (enzymatische Haarcolorierung), in biologischen Abwasserreinigungsverfahren, sowie im Einsatz in Enzymsensoren, Immunoassays und Brennstoffzellen.

Forschungsbeispiel Saale

Wasserproben aus der Saale im Stadtgebiet von Halle wiesen eine Reihe kritischer Verbindungen auf, zum Beispiel Nonylphenole, Bisphenol A (Bestandteil von Kunststoff-Weichmachern) und polyzyklische Moschusverbindungen (Einsatz als Duftstoffe in Kosmetika, in Seifen, als Waschmittelzusätze sowie in Haushaltsreinigern). Für Nonylphenole und Bisphenol A wurden hormonelle Wirkungen bei Wirbeltieren nachgewiesen. Während Bisphenol A nach gegenwärtigem Kenntnisstand relativ gut in der Umwelt abgebaut und nur in geringem Maße in Gewässerorganismen angereichert wird, stellt sich die Situation für Nonylphenole komplexer dar. Diese Verbindungen entstehen in Kläranlagen infolge des unvollständigen biologischen Abbaus von in großem Umfang eingesetzten Tensiden (Alkylphenol-Ethoxylaten), und werden mit dem geklärten Abwasser in die Umwelt freigesetzt. Die wichtigste Gruppe bilden die so genannten technischen Nonylphenole, Verbindungen gleicher Summenformel, jedoch unterschiedlicher Struktur (Bild 4). Die Verbindung mit der einfachsten Struktur, das 4-Nonylphenol mit einer linearen Seitenkette,

Verbindung	Verwendung	Struktur
Tonalid	cyclischer Moschusriechstoff (Kosmetik, Haushalt)	
Galaxolid	cyclischer Moschusriechstoff (Kosmetik, Haushalt)	
Techn. Nonylphenole	Abbauprodukte von Industriewaschmitteln	
Bisphenol A	Epoxydharzadditiv, Lacke für Konservendosen, Dentalplastikwerkstoffe	

Bild 4: In der Saale bei Halle nachgewiesene Wasserkontaminationen.

das in Abbaustudien häufig als Modellverbindung eingesetzt wurde, ist gut biologisch abbaubar, spielt aber bei technischen Nonylphenolen nur eine untergeordnete Rolle. Von weit größerer Relevanz sind Verbindungen mit verzweigten Seitenketten, diese bilden den Hauptteil der technischen Nonylphenole. Hier existieren nur wenige und zum Teil widersprüchliche Daten zur biologischen Abbaubarkeit in der Umwelt. Aufgrund ihrer chemischen



Bild 5: Probenahme (Quelle: Barbara Krause, UFZ)

Eigenschaften werden Nonylphenole an feste Partikel in Gewässern gebunden und in Gewässersedimenten und in Geweben von Wasserorganismen, beispielsweise Fischen, angereichert. Die polyzyklischen Moschusverbindungen Galaxolid und Tonalid repräsentieren gegenwärtig zirka 70 Prozent der weltweit hergestellten und in Umlauf gebrachten synthetischen Moschusverbindungen – mit ansteigender Tendenz. Es handelt sich um fettlösliche (lipophile) Verbindungen, die ebenfalls in Geweben von Wasserorganismen (Fische, Muscheln) angereichert und von solchen Organismen wahrscheinlich in gewissem Umfang metabolisiert werden. Polyzyklische Moschusverbindungen wurden auch

in menschlichem Fettgewebe und Muttermilch nachgewiesen und stehen im Verdacht, über die Haut aufgenommen zu werden und chronische toxische Effekte zu verursachen. Sie werden in Kläranlagen offensichtlich nur sehr schlecht abgebaut und besitzen offenbar eine hohe Stabilität in natürlichen Gewässersystemen.

Verblüffend für die Wissenschaftler war, dass zusammen mit den genannten Wasserkontaminanten beachtliche Keimzahlen von Wasserpilzen, die extrazelluläre Abbauenzyme bilden, im Wasser und in oberflächennahen Gewässersedimenten der Beprobungsstandorte nachgewiesen wurden (Bilder 6 und 7). Sie vermuten deshalb, dass diese Organismen beim natürlichen Abbau der genannten Wasserkontaminanten eine beträchtliche Rolle spielen. Um die Relevanz von Wasserpilzen für den Umweltmetabolismus von Wasserkontaminationen (Bild 8) umfassend aufzuklären, werden gegenwärtig unterschiedliche, sich ergänzende wissenschaftliche Ansätze, in die mehrere internationale und nationale Kooperationspartner ihr Know-How einbringen, verfolgt. Im UFZ werden beispielsweise im Rahmen eines DFG-Graduiertenkollegs gemeinsam mit dem Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg der Abbau von Wasserkontaminanten und die dabei entstehenden Abbauprodukte anhand von Metabolismusmodellen untersucht. Dabei setzen die Forscher sowohl Gesamtorganismen als auch isolierte Abbauenzyme ein.

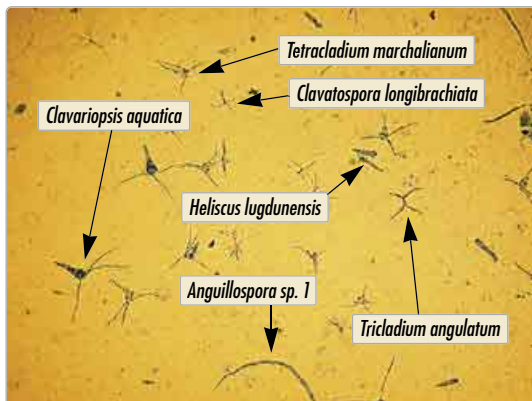


Bild 6: Sporen unterschiedlicher Arten aquatischer Hyphomyceten aus der Saale bei Halle (Quelle: Dr. Kandikere Ramaiah Sridhar, Indien)

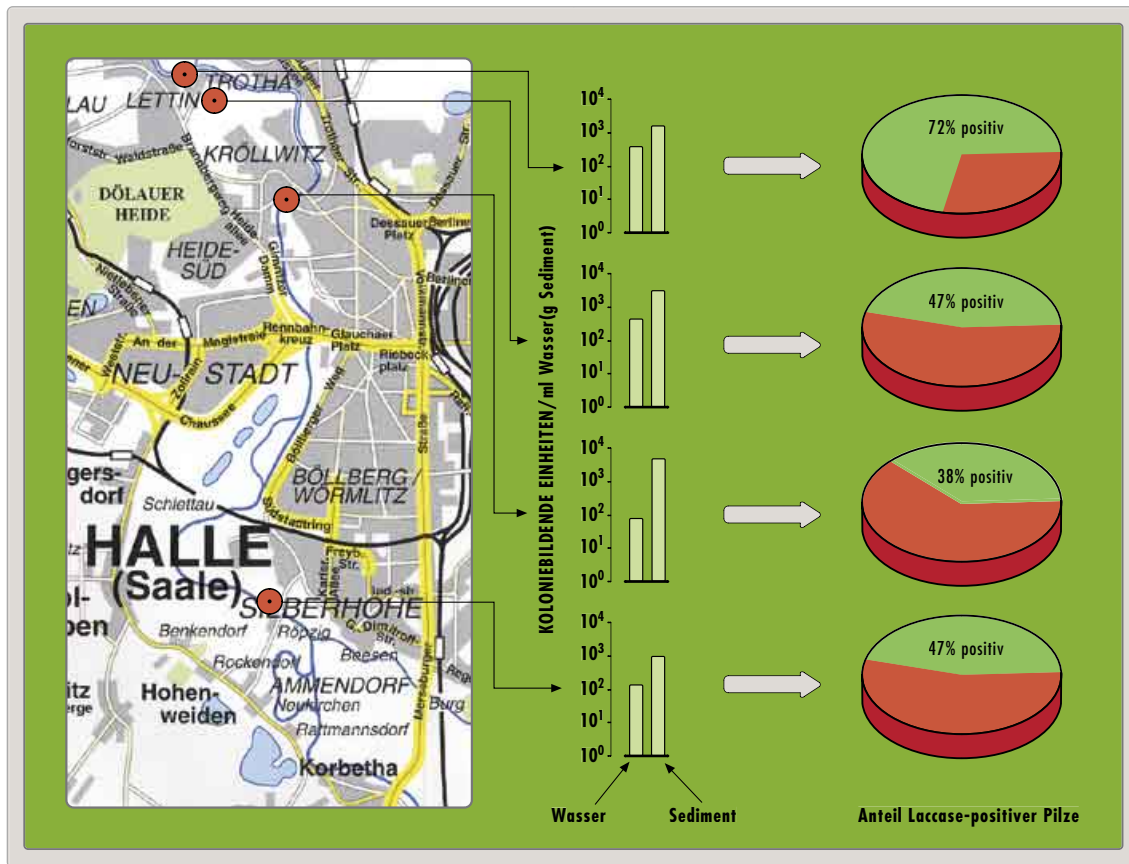


Bild 7: Keimzahlen und Anteil von Lacase bildenden Wasserpilzen aus der Saale an unterschiedlichen Probenahmestellen im Stadtgebiet von Halle.

Die Charakterisierung von proteinbiochemischen und katalytischen Eigenschaften von Abbauenzymen erfolgt in Kooperation mit dem Institut für Molekularbiologie der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia. In Kooperation mit der Mangalore Universität, Mangalagangotri, Indien, und der Masaryk Universität, Brno, Tschechische Republik, finden Arbeiten zum Nachweis,

zur Artenvielfalt, sowie zur Häufigkeit des Auftretens dieser Organismen an den natürlichen Standorten statt. Gerade die Kolleginnen und Kollegen aus diesen beiden Einrichtungen bringen vieljährige Erfahrungen bezüglich der Taxonomie von Wasserpilzen und der ökologischen Bewertung ihrer Artenvielfalt ein. Weiterführende mikrobiologische Untersuchungen widmen

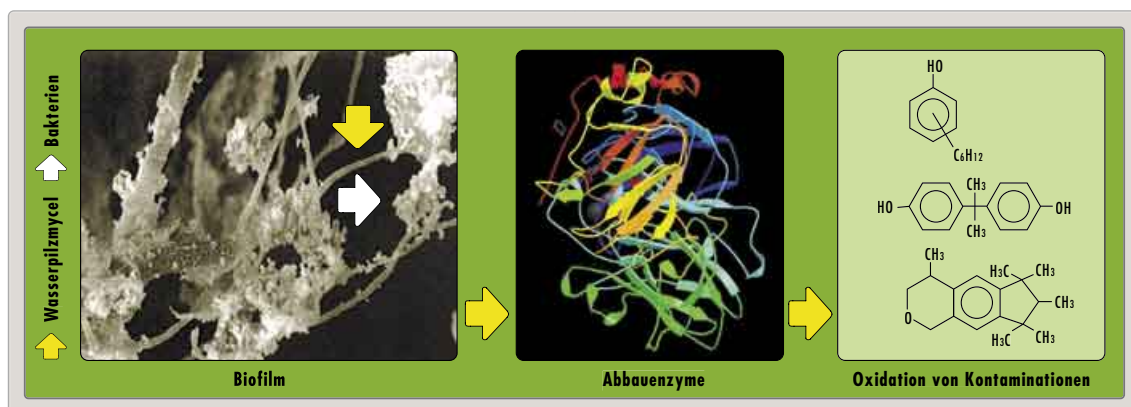


Bild 8: Mit Bakterien vergesellschaftete Wasserpilze (Biofilm, rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Jim Ehrmann, Kanada) und die mögliche Funktion beim Abbau von Wasserkontaminationen.



Bild 9: Die hauptsächliche Tätigkeit eines Mikrobiologen besteht aus Laborarbeiten (Quelle: Dr. Dietmar Schlosser, UFZ)

sich der Rolle von Wasserpilzen in natürlichen Biofilmen, die durch Besiedlung von Oberflächen durch Mikroorganismen entstehen. Wasserpilze sind neben Bakterien typische Komponenten in solch komplexen Lebensgemeinschaften, von denen man annimmt, dass sie auf vielfältige Weise an den Stoffumsetzungen in einem Gewässer beteiligt sind.

Wasserpilze und Schwermetalle

Wie Bakterien sind auch Pilze in der Lage, die Mobilität und das Umweltverhalten von Metallen in aquatischen Lebensräumen zu beeinflussen. Im Mansfelder Land (Mitteldeutschland), das geprägt ist durch 800 Jahre Kupferschiefererz-Förderung und -Verhüttung, fließen aus Armerz- und Schlacke-Halden stark mit Zink, Kupfer, Cadmium und Blei belastete Sickerwässer ab und kontaminieren dadurch angrenzende Gewässersysteme (Bilder 10 und 11). Auch in diesen hoch Schwermetall belasteten Oberflächenwässern konnten die Wissenschaftler aquatische Hyphomyceten nachweisen, sie isolieren und systematisieren. Die Arbeiten sind seit Ende 1996 eingebunden in ein BMBF-Projekt deutsch-kanadischer Kooperation zwischen dem UFZ, der Mount Allison University, Sackville, und dem Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg. Auch innerhalb dieses Kooperationsnetzwerkes werden sich gegenseitig ergänzende wissenschaftliche Ansätze verfolgt, um ökologische Funktionen aquatischer Hyphomyceten aufzuklären und sie für Bioremediationsprozesse zu nutzen. Einige seien in diesem Rahmen genannt.

So ist es die Aufgabe von UFZ-Wissenschaftlern zu untersuchen, ob und in welchem Maße aquatische Hyphomyceten Schwermetalle binden. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese und zeigen,

dass unterschiedliche Pilze Schwermetalle wie beispielsweise Cadmium und Zink effizient anreichern und auch bei beträchtlichen Konzentrationen noch wachsen können (Bild 12). Dies legt das Vorhandensein entsprechender Abwehr- und Detoxifikationsmechanismen nahe. Eine Kooperation mit Wissenschaftlern der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg brachte beispielsweise ans Tageslicht, dass Schwermetall bindende Peptide, so genannte Phytochelatine, unter anderem dafür verantwortlich sind. Laborexperimente bestätigten diese These: zwei Stämme des aquatischen Hyphomyceten *Heliscus lugdunensis* – isoliert aus jeweils



Bild 10: Austritt von Schwermetall kontaminiertem Sickerwasser aus einer Schlackehalde der Kupfererzverhüttung im Mansfelder Land. Die grüne Färbung der Steine resultiert aus Ausfällungen von Kupfer, Zink und Aluminium enthaltenden Mineralien. (Quelle: Dr. Gudrun Krauß, UFZ)

	Standort 1 (belastet)	Standort 2 (belastet)	Kontrolle (unbelastet)
As	46 ± 34	7 ± 3	0.36 ± 0.05
Cd	38 ± 7	0.5 ± 0.2	0.12 ± 0.08
Cu	6800 ± 2300	37 ± 13	<10
Fe	340 ± 140	900 ± 660	136 ± 5
Hg	0.08 ± 0.01	<0.05	<0.05
Mn	114 ± 11	390 ± 210	121 ± 21
Ni	28 ± 3	<25	<25
Pb	1500 ± 500	<0	<30
Sb	23 ± 16	2.7 ± 0.6	0.6 ± 0.3
Zn	24500 ± 3300	320 ± 150	90 ± 12

Bild 11: Schwermetallkonzentrationen von Erlenblättern, die in Oberflächenwässern an unterschiedlichen Standorten im Mansfelder Land ausgebracht wurden. Die Blätter dienen der Isolierung von Wasserpilzen, die sich darauf ansiedeln.

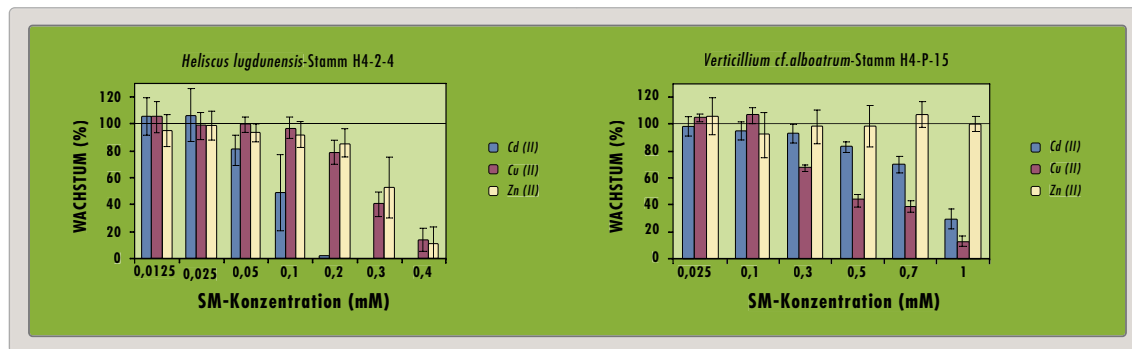


Bild 12: Einfluss der Konzentration unterschiedlicher Schwermetalle auf das Wachstum von Wasserpilzen.

einem hoch und einem moderat Schwermetall belasteten Habitat des Mansfelder Landes – wiesen ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Schwermetallen auf. Unter Cadmium-Exposition bildete der aus dem hoch belasteten Habitat stammende Pilz ein Phytochelatin und zeigte eine geringere Wachstumshemmung als der aus dem moderat belasteten Standort isolierte Organismus, der kein Phytochelatin bildete. Zusammen mit deutlichen Unterschieden in der Morphologie der Pilzsporen deutet dies darauf hin, dass beide Stämme unterschiedliche Ökotypen repräsentieren, die aufgrund individueller genetischer und physiologischer Anpassungen in den lokalen, unterschiedlich belasteten Lebensräumen entstanden sein könnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die aquatischen Hyphomyceten zu den viel versprechenden Organismen im Hinblick auf eine Verringerung von durch den Menschen verursachten Verschmutzungen in Gewässern gehören. Wissenschaft ist gefragt, um dieses Potenzial weiter auszuloten und gezielt nutzbar zu machen.