

**GEWINNUNG UND IDENTIFIZIERUNG  
VON NUTZBAREN VERBINDUNGEN AUS DEN  
NÄHRLÖSUNGEN UND BIOMASSEN  
VON MIKROALGEN**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Christina Schulze**

Kiel 2000

Referent: Prof. Dr. P. Pohl

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

gez. Prof. Dr. H. König

-Dekan-

Meinen Eltern in Liebe

## INHALTSVERZEICHNIS

|  | Seite |
|--|-------|
| <b>A EINLEITUNG</b> .....  | 1     |
| <b>B MATERIAL UND METHODEN</b> .....   | 5     |
| <b>1 MATERIAL</b> .....  | 5     |
| 1.1 Algen .....  | 5     |
| 1.2 Chemikalien .....  | 6     |
| <b>2 METHODEN</b> .....  | 7     |
| 2.1 Kultivierung der Algen .....   | 7     |
| 2.1.1 Zusammensetzung der Nährlösung .....                                     | 7     |
| 2.1.2 Kultivierungsbedingungen .....   | 7     |
| 2.1.3 Ernte der Algen und deren Nährlösungen .....                             | 8     |
| 2.2 Aufarbeitung der Nährlösungen zu Extrakten .....                           | 9     |
| 2.2.1 Extraktion mit Ethanol und Aceton .....                                  | 9     |
| 2.2.2 XAD – Methode .....  | 10    |
| 2.3 Untersuchung der Nährlösungsextrakte .....                                 | 10    |
| 2.3.1 Auftrennung mit Dünnschichtchromatographie .....                         | 10    |
| 2.3.1.1 Dünnschichtchromatographie mit chemischen<br>Nachweisreagenzien .....  | 10    |
| 2.3.2 Auftrennung mit Säulenchromatographie .....                              | 11    |
| 2.3.3 Auftrennung mit HPLC .....   | 12    |
| 2.3.4 Spezielle Untersuchung des Extrakts von <i>Nodularia harveyana</i> ..... | 12    |
| 2.3.4.1 Isolierung von Norharman .....   | 12    |
| 2.3.4.2 Identifizierung von Norharman .....                                    | 13    |
| 2.3.4.2.1 UV/Vis-Spektroskopie .....   | 13    |
| 2.3.4.2.2 Fluoreszenzspektroskopie .....                                       | 13    |
| 2.3.4.2.3 Massenspektrometrie .....  | 13    |
| 2.3.4.2.4 NMR-Spektroskopie .....  | 14    |
| 2.3.4.3 Quantifizierung von Norharman .....                                    | 14    |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.3.5    | Testsysteme auf Wirksamkeiten .....  | 15 |
| 2.3.5.1  | Sprühtest auf Wachstumsinhibitoren gegen Cyanobakterien.....                                 | 15 |
| 2.3.5.2  | Brine Shrimps–Test .....   | 16 |
| 2.3.5.3  | Test auf biologische Aktivitäten .....   | 17 |
| 2.4      | Untersuchungen der Biomassen .....   | 18 |
| 2.4.1    | Quantitative und qualitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes .....                          | 18 |
| 2.4.2    | Quantitative und qualitative Bestimmung des Chlorophyll- und<br>Carotinoidgehaltes .....     | 20 |
| 2.4.3    | Quantitative und qualitative Bestimmung des<br>Phycobiliproteingehaltes .....                | 21 |
| 2.4.4    | Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes .....  | 22 |
| 2.4.5    | Untersuchung der Biomasse von <i>Nodularia harveyana</i> auf<br>Norharman mittels HPLC ..... | 23 |
| <b>C</b> | <b>ERGEBNISSE</b> .....  | 25 |
| <b>1</b> | <b>EXTRAKTIONSMETHODEN</b> .....   | 25 |
| 1.1      | Entwicklung eines Extraktionsverfahrens unter Verwendung von Ethanol und<br>Aceton .....     | 25 |
| 1.2      | Entwicklung der Extraktion mit Amberlite® XAD-1180 Adsorberharz .....                        | 27 |
| 1.3      | Zusammenfassung und Diskussion .....   | 28 |
| <b>2</b> | <b>ZUSAMMENSETZUNG DER EXTRAKTE</b> .....  | 30 |
| 2.1      | Entwicklung der verschiedenen Trennmethode n .....   | 30 |
| 2.1.1    | Dünnschichtchromatographie .....   | 30 |
| 2.1.2    | Säulenchromatographie .....  | 31 |
| 2.1.3    | HPLC .....   | 32 |
| 2.2      | Ergebnisse der verschiedenen Trennmethode n .....  | 34 |
| 2.2.1    | Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie .....  | 34 |
| 2.2.2    | Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit chemischen<br>Nachweisreagenzien .....         | 40 |
| 2.2.3    | Ergebnisse von HPLC und Dünnschichtchromatographie im Vergleich..                            | 42 |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 2.3      | Zusammenfassung und Diskussion .....   | 48         |
| <b>3</b> | <b>WIRKSAMKEIT DER EXTRAKTE</b> .....  | <b>53</b>  |
| 3.1      | Wachstumshemmer gegen Cyanobakterien .....   | 53         |
| 3.2      | Brine Shrimps-Test .....   | 65         |
| 3.3      | Test auf biologische Aktivität .....   | 70         |
| <b>4</b> | <b>STRUKTURAUFKLÄRUNG VON NORHARMAN AUS <i>Nodularia harveyana</i></b> .....   | <b>73</b>  |
| 4.1      | Isolierung .....   | 73         |
| 4.2      | Meßergebnisse .....  | 75         |
| 4.3      | Zusammenfassung und Diskussion .....   | 80         |
| <b>5</b> | <b>NORHARMANGEHALT IN MISCHKULTUREN VON <i>Nodularia harveyana</i> MIT <i>Spirulina laxissima</i></b> .....  | <b>82</b>  |
| 5.1.     | Versuchsaufbau .....   | 82         |
| 5.2.     | Ergebnisse .....   | 83         |
| 5.3.     | Zusammenfassung und Diskussion .....   | 88         |
| <b>6</b> | <b>CHARAKTERISIERUNG DER BIOMASSENZUSAMMENSETZUNG IM HINBLICK AUF EINE EVENTUELLE MASSENKULTIVIERUNG UND MEHRFACHE VERWENDUNG DER MIKROALGEN</b> ..... | <b>90</b>  |
| 6.1      | Untersuchung der Biomasse auf Fettsäuren .....   | 91         |
| 6.2      | Untersuchung der Biomasse auf Carotinoide und Chlorophylle .....   | 96         |
| 6.3      | Untersuchung der Biomasse auf Phycobiliproteine .....  | 102        |
| 6.4      | Untersuchung der Biomasse auf den Proteingehalt .....  | 106        |
| 6.5      | Untersuchung der Biomasse von <i>Nodularia harveyana</i> auf Norharman .....   | 109        |
| 6.6      | Zusammenfassung und Diskussion .....   | 112        |
| <b>D</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION</b> .....  | <b>116</b> |
| <b>E</b> | <b>LITERATUR</b> .....   | <b>124</b> |

Unter dem Oberbegriff Algen sind eine Vielzahl morphologisch stark voneinander abweichender, photosynthetisierender Pflanzen, die in der Regel im Wasser leben, zusammengefaßt. Sie grenzen sich von den Landpflanzen dadurch ab, daß sie nicht deren typische hochentwickelte Organe wie Wurzel, Sprosse und Blätter besitzen (VAN DEN HOEK,1993). Es handelt sich um ubiquitäre Organismen, das heißt, obwohl die Mehrzahl von ihnen im Salz- oder Süßwasser lebt, besiedeln sie auch Feuchtgebiete, Felsen, Erdböden und sogar heiße Quellen (FISH & CODD,1994). Mit einer Biomasse - Produktion von ca. 31 Gigatonnen pro Jahr leisten sie einen wesentlichen Anteil (rund 35%) an der Primärproduktion auf der Erde (SMETACEK,1991).

Diese Wasserpflanzen, die umgangssprachlich als „Algen“ bezeichnet werden, werden in der systematischen Gliederung in Prokaryoten, zu denen die Cyanobakterien (alte Bezeichnung: Blaualgen) gehören und Eukaryoten, zu denen die eigentlichen Algen zählen, aufgeteilt. Cyanobakterien besitzen wie die ebenfalls prokaryotischen Eubakterien keinen echten, von einer Kernhülle umgebenen Zellkern, sondern eine frei vorliegende DNA als Kernäquivalent (Nucleoid). Außerdem fehlen ihnen Zellorganellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum und Vakuole. Sie verfügen über 70S-Ribosomen, und ihre Zellwand besteht wie die Bakterienzellwand aus einer Stützmembran, die der Cytoplasmamembran aufliegt und aus dem Peptidoglykan Murein aufgebaut ist. Auf der anderen Seite besitzen Cyanobakterien auch Zellelemente, die sie mit den eukaryotischen Algen gemeinsam haben. So enthalten sie ebenfalls zwei Photosysteme mit den für Eukaryoten charakteristischen Pigmenten wie vor allem das Chlorophyll a. Deswegen werden die Cyanobakterien gelegentlich auch als Cyanophyta bezeichnet (STRASBURGER-LEHRBUCH DER BOTANIK FÜR HOCHSCHULEN,1998).

Die eukaryotischen Algen werden nach ihrer Größe in Makro- und Mikroalgen untergliedert. Unter Makroalgen werden meist die großen Tange aus den Klassen der Rot- und der Braunalgen (Rhodo- und Phaeophyceae) verstanden, während die Mikroalgen Größen von etwa 20 µm bis 200 µm aufweisen und aus verschiedenen systematischen Gruppen, vor allem aus der Abteilung der Grünalgen (Chlorophyta), den Klassen der Kieselalgen (Bacillariophyceae) und der Goldalgen (Chrysophyceae) stammen.

Allgemein ist es aber üblich, den Begriff „Mikroalgen“ sowohl für die eukaryotischen, mikroskopisch kleinen Algen als auch für die prokaryotischen Cyanobakterien zu verwenden.

Die beschriebenen Organismen werden durch den Menschen auf vielfältige Weise genutzt. Makroalgen werden vor allem wegen ihrer Zellwandpolysaccharide verwendet: Pharmazeutisch wichtige Polysaccharide sind zum Beispiel Agar aus *Gelidium*-Arten, Carrageen aus *Chondrus*- und *Gigartina*-Arten sowie Alginate aus *Laminaria*- und *Fucus*-Arten (PAINTER,1983).

Mikroalgen werden wegen ihres Gehalts an pharmazeutisch verwendbaren Inhaltsstoffen wie Lipiden, Proteinen und Pigmenten (vor allem Carotinoide und Phycobiliproteine) in größeren Maßstäben kommerziell genutzt.

Lipide und essentielle Fettsäuren werden von einigen Mikroalgen in großer Menge gebildet (POHL,1982). Sie können daher sowohl zur Nahrungsergänzung eingesetzt werden, wie zum Beispiel *Spirulina* sp. (RICHMOND,1988), als auch der gezielten Gewinnung von ungesättigten Fettsäuren dienen. Diese Inhaltsstoffe finden vielfache Verwendung in der pharmazeutischen Industrie, da sie einerseits Vorstufen von Prostaglandinen darstellen, andererseits aber auch direkt zur Behandlung verschiedener Krankheiten wie Hyperlipidämie und Bluthochdruck eingesetzt werden können (BOROWITZKA,1988 b).

Proteine, die einen hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren besitzen, werden ebenfalls aus Mikroalgen wie zum Beispiel aus *Spirulina*- und *Scenedesmus*-Arten gewonnen. Diese können nicht nur menschlichen Ernährungszwecken dienen, sondern werden auch als Futtermittel in Aquakulturen bei der Züchtung von Zooplankton eingesetzt (BECKER & VENKATAMARAN,1982). Zooplankton wird dann als Lebendfutter für die Aufzucht von Seefischen und Krebstieren verwendet.

Pigmente aus Mikroalgen wie Carotinoide und Xanthophylle werden als Farbstoffe in der Lebensmittelindustrie eingesetzt (HÖTZEL,1996). Zusätzlich wird  $\beta$ -Carotin als Vorstufe des Vitamin A aus Massenkulturen von zum Beispiel *Dunaliella* sp. pharmazeutisch genutzt (RICHMOND,1986). Auf diese Inhaltsstoffe wird in Kapitel 6 des Ergebnisteils genauer eingegangen.

Auch ist es möglich, aus Mikroalgen Vitamine, vor allem Vitamin B<sub>6</sub> und B<sub>12</sub> zu gewinnen (BOROWITZKA,1988 a). So wird *Nannochloropsis* sp. aufgrund ihres hohen Vitamingehalts als Fischfutter verwendet (BROWN et al.,1999).

Als weitere interessante Inhaltsstoffe findet man Sterole, vor allem Cholesterolderivate (KÖHLHASE & POHL,1988) sowie Polysaccharide (FISCHER et al.,1997), die als Geliermittel in der Lebensmitteltechnologie eingesetzt werden können.

Vor allem aber stellen Mikroalgen eine zum großen Teil bislang ungenutzte Quelle bioaktiver Verbindungen dar, die nicht nur als potentielle Arzneistoffe, sondern auch als Leitstrukturen für pharmakologische Untersuchungen dienen können.

Zu diesen Substanzen gehören unter anderem die Cyanotoxine, die durch das Verursachen giftiger Algenblüten bekannt geworden sind, und zu denen vor allem hepatotoxische Peptide wie die Microcystine und neurotoxische Alkaloide wie die Anatoxine zählen (CARMICHAEL, 1992). Weiterhin finden sich Verbindungen mit cytotoxischen, antibakteriellen, fungiziden, algiziden und antiviralen Eigenschaften (TEUSCHER et al.,1992; PATTERSON et al.,1993; BOROWITZKA,1995; FALCH et al.,1995), deren pharmazeutische Anwendung möglich ist. Auf cytotoxische und algizide Substanzen wird genauer in Kapitel 3 des Ergebnisteils eingegangen.

Auch unter umwelttechnologischen Aspekten betrachtet leisten Mikroalgen einen wertvollen Beitrag. So kann ihre Biomasse nach der Extraktion relevanter Inhaltsstoffe weiter verwendet werden, um schwermetallbelastete Abwässer durch Adsorptionsvorgänge zu reinigen (FEHRMANN,1993; FEHRMANN & POHL,1993). Weiterhin gibt es Versuche, Mikroalgen unter gleichzeitigem Verbrauch von Kohlendioxid aus Abgasen zu züchten (PAETOW & POHL,1999).

Aus diesen Gründen werden in der Abteilung Pharmazeutische Biologie am Pharmazeutischen Institut der Christian Albrechts Universität in Kiel Mikroalgen systematisch in Großkulturen unter definierten Bedingungen gezüchtet. Zunächst wurden die Biomassen auf nutzbare Produkte, wie sie oben beschrieben wurden, untersucht. Dabei fielen im Laufe der Zeit große Mengen an Kultur Nährlösungen an, die allerdings zunächst nicht weiter verwendet werden konnten. Mikroalgen sind jedoch offensichtlich in der Lage, unterschiedliche Metaboliten in ihr Kulturmedium abzugeben. So wurden bereits biogene Amine (HERRMANN & JÜTTNER,1977), Aminosäuren (POULE & MARTIN-JEZEQUEL,1983), Exopolysaccharide (FISCHER,1996) und cytotoxische (FISH & CODD,1994) sowie algizide (GROMOV,1991) Verbindungen in den Nährlösungen gefunden. Dennoch ist aber bisher nur wenig über solche extrazellulären Metaboliten in den Kulturüberständen bekannt.

Aufbauend auf der Arbeit von VOLK (1996), die nachwies, daß etliche Nährlösungen von Mikroalgen Wachstumsinhibitoren gegenüber Cyanobakterien enthielten, sollten nun im Rahmen dieser Dissertation Methoden entwickelt werden, solche Verbindungen aus den Nährlösungen zu extrahieren, aufzutrennen, ihre Wirksamkeit zu testen und, wenn möglich, ihre Strukturen aufzuklären.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird zunächst die Entwicklung geeigneter Extraktionsmethoden sowie eines chromatographischen Trennverfahrens für die erhaltenen Extrakte beschrieben. Anschließend wird die Wirksamkeit der Extrakte sowohl gegenüber pflanzlichen als auch tierischen Zellen und gegenüber Tumorzelllinien dargestellt. Es folgt die Strukturaufklärung eines der wirksamen Metaboliten aus *Nodularia harveyana* sowie dessen Quantifizierung und anschließend der Versuch, durch geeignete Kultivierungsbedingungen dessen Gehalt in der Nährlösung beziehungsweise in der Biomasse zu beeinflussen.

Zum Schluß der Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob eine Massenkultivierung der untersuchten Kulturen lohnend wäre. Dazu wurden die Biomassen einiger Cyanobakterien auf ausgewählte Inhaltsstoffe hin untersucht. Da eine kontrollierte Massenzucht in 250 Liter und 3000 Liter fassenden Photobioreaktoren in der Lage ist, ausreichend große Mengen an Biomasse und an Nährlösung zu liefern, könnten sowohl aus der Biomasse als auch aus der Nährlösung die gewünschten Inhaltsstoffe und Metaboliten in größerem Umfang gewonnen und genutzt werden. Anschließend wäre eine Verwendung der extrahierten und deshalb toten Biomasse als Adsorptionsmittel für zum Beispiel Schwermetalle denkbar, so daß sich daraus eine multiple Verwendung der Mikroalgen-Massenkultur ergäbe.

## **B MATERIAL UND METHODEN**

### **1 Material**

#### **1.1 Algen**

##### CYANOBAKTERIEN:

- *Anabaena flos-aquae* (Lyngbye) de Brébisson B 30.87 <sup>1)</sup>
- *Anabaena constricta* <sup>2)</sup>
- *Anabaena viguieri* (Denis) Frémy 27.79 <sup>1)</sup>
- *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli B 41.79 <sup>1)</sup>
- *Microcystis* species <sup>3)</sup>
- *Nodularia harveyana* (Thwaites) Thuret 44.85 <sup>1)</sup>
- *Nodularia spumigena* <sup>4)</sup>
- *Nostoc carneum* Vaucher, Dr. Mollenhauer, Forschungsinstitut Senkenberg
- *Nostoc commune* Vaucher B 1453-3 <sup>1)</sup>
- *Nostoc insulare* Borzi 54.79 <sup>1)</sup>
- *Phormidium corium* <sup>2)</sup>
- *Phormidium foveolarum* Gomont B 1462-1 <sup>1)</sup>
- *Phormidium* species I <sup>3)</sup>
- *Oscillatoria geminata* Meneghini B 1459-8 <sup>1)</sup>
- *Oscillatoria nigro-viridis* <sup>2)</sup>
- *Spirulina laxissima* G.S. West 1462.80 <sup>1)</sup>
- *Synechococcus rubescens* (Chang) Nägeli B 3.81 <sup>1)</sup>
- *Synechocystis aquatilis* Sauvageau B 90.79 <sup>1)</sup>

CHLOROPHYCEEN:

- *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard 11-32b <sup>1)</sup>
- *Chlorella vulgaris* Beijerinck 211-11b <sup>1)</sup>
- *Monoraphidium braunii* <sup>5)</sup>
- *Scenedesmus producto-capitatus* Schmula 21.81 <sup>1)</sup>
- *Tetracystis intermedium* <sup>5)</sup>

Herkunft:

- 1) SAG-Sammlung von Algenkulturen, Universität Göttingen (SCHLÖSSER,1994); der Zusatz „B“ bedeutet, daß die Algenkultur bakterienhaltig ist.
- 2) Universität von Kuwait
- 3) EAWAG, Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz, Dübendorf, Schweiz
- 4) Universität von Greifswald, Institut für Pharmazeutische Biologie
- 5) Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Abteilung Biotechnologie, Bergholz-Rehbrücke

## 1.2. Chemikalien

Soweit nichts anderes angegeben, wurden Chemikalien und Lösungsmittel der Fa. E. Merck, Darmstadt in p.a.-Qualität verwendet.

Das Amberlite<sup>®</sup> XAD-1180 Adsorberharz stammte von der Fa. Rohm and Haas Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Instant Ocean<sup>®</sup> (Künstliches Meersalz) stammte von der Fa. Aquarium Systems, Sarreboerg, Frankreich.

Die Eier von *Artemia salina* und das Artemia-Salz wurden von der Fa. Dohse Aquaristic, Bonn bezogen.

$\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin sowie Chlorophyll a und b lieferte die Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz.

## 2 Methoden

### 2.1 Kultivierung der Algen

#### 2.1.1 Zusammensetzung der Nährlösung

Die Cyanobakterien und Chlorophyceen wurden in einem anorganischen Süßwassermedium nach POHL et al. (1987) gezüchtet. Diese Nährlösung bestand zu 90% aus demineralisiertem Wasser, dem 10% Instant Ocean<sup>®</sup> (Künstliches Meersalz) zugegeben wurde, und zu 10% aus einer Lösung von Kaliumnitrat, Kaliumphosphat, und NatriumEDTA sowie Spurenelementen (MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> und FeCl<sub>3</sub>). Abweichend davon wurden den Kulturen von *Anabaena constricta*, *Phormidium corium* und *Oscillatoria nigro-viridis* 50% Instant Ocean<sup>®</sup> (Künstliches Meersalz) und der Kultur von *Oscillatoria geminata* 5% Instant Ocean<sup>®</sup> (Künstliches Meersalz) zugegeben.

#### 2.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die Züchtung erfolgte unter keimarmen Bedingungen in 8 Liter-Batchkulturen unter Belichtung (60 bis 150  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ständiger Belüftung und häufigem Umschütteln bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase. Die Temperierung der Kulturen erfolgte in klimatisierten Räumen bei 27°C.

Der Wachstumsverlauf wurde mit Hilfe photometrischer Messungen der Kultursuspensionsdichte verfolgt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 440 nm mit einem Hitachi U-1100 Spektrophotometer gegen Wasser als Blindwert.

Die Bestimmung der Lichtintensität erfolgte mit einem LI 185 B Quantum/Radiometer/Photometer (Fa. LI-COR, inc., Lincoln, USA), das mit einem Spherical Quantum Sensor ausgestattet war.

### 2.1.3 Ernte der Algen und deren Nährlösungen

Die Kulturen wurden mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (Heraeus Contifuge 17 S) bei 8000 bis 14000 x g abgeerntet. Die Biomassen wurden gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Beta 1-8 K, Fa. M.Christ, Osterode/Harz) und dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, während die Nährlösungen bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren und bei  $-4^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.



**Abb. 2.1.1**  
Kultivierung von Mikroalgen in 8 Liter-Batchkulturen

## 2.2 Aufarbeitung der Nährlösungen zu Extrakten

### 2.2.1 Extraktion mit Ethanol und Aceton

Die Nährlösung einer Kultur wurde auf Gefrierdosen zu je 250 ml verteilt, tiefgefroren und dann gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Beta 1-8 K, Fa. M.Christ, Osterode/Harz). Der getrocknete Rückstand wurde nach dem Zerreiben in einer Reibschale in ein 500 ml Becherglas gegeben, mit 100 bis 200 ml Ethanol 80% versetzt, mittels Magnetkern und Magnetrührer durchgerührt und der pH-Wert mit einem WTW pH 530 pH-Meter gemessen (Wissenschaftliche–Technische Werkstätten, Weilheim). Falls der pH-Wert sich unter 5

befand, wurde er so gelassen, ansonsten wurde mit Salzsäure 10 % auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurde die Suspension 10 Minuten lang gerührt, danach bei 5000 x g 10 Minuten lang abzentrifugiert (Heraeus Labofuge GL) und der Überstand in einen 250 ml Erlenmeyerkolben abdekantiert. Der Rückstand wurde noch zweimal mit jeweils der gleichen Menge Ethanol 80% 10 Minuten ohne weitere Zugabe von Salzsäure extrahiert. Die vereinigten Zentrifugationsüberstände wurden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt, damit eventuelle Salze ausfielen.

Diese Lösung wurde in einen entsprechenden Rundkolben filtriert und bei 40 °C am Rotationsverdampfer bis zur vollständigen Trocknung eingeengt. Der trockene Rückstand im Kolben wurde fein zerrieben, dann mit je 50 ml bis 100 ml Ethanol 96% so oft extrahiert, bis der Rückstand farblos wurde (meist zwei bis dreimal) und in einen Rundkolben filtriert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer vollständig einengt und über Nacht in einem evakuierten Exsiccator getrocknet.

Der Rückstand wurde mit der 5-fachen Menge Aceton/Aqua bidest. 95:5 versetzt, wobei Salze ausfielen und zwei Phasen entstanden. Die untere Phase war wässrig und meistens dunkelbraun gefärbt; die obere Phase war acetonisch und meistens gelb gefärbt. Diese Mischung wurde eine Minute auf einem Vortex-Gerät (Stufe 6) geschüttelt und bei 5000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert, bis die obere Phase klar war. Die ausgefallenen Salze wurden verworfen. Die Oberphase wurde abpipettiert. Die Unterphase wurde solange mit Aceton/Aqua bidest. wie oben beschrieben extrahiert und zentrifugiert, bis die Oberphase farblos blieb (meistens viermal). Die vereinigten Oberphasen sowie die Unterphase wurden mit demineralisiertem Wasser verdünnt, in 125 ml fassenden Gefrierdosen eingefroren, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.2 XAD – Methode

Die Nährlösung einer Kultur wurde mit Hilfe einer Soxhlet-Apparatur wie folgt extrahiert: Eine große Soxhlet-Hülse (44 x 230 mm) wurde mit feuchtem, gereinigtem Amberlite® XAD-1180 Adsorberharz gefüllt. Die Nährlösung wurde 24 Stunden lang über eine Schlauchpumpe durch die Hülse im Kreislauf umgepumpt. Das beladene Adsorberharz wurde mit 500 ml Methanol in einem 1 Liter-Erlenmeyerkolben 24 Stunden lang bei Raumtemperatur auf einer Schüttelapparatur extrahiert. Nach Filtration wurde das XAD nochmals in einer Hülse in einer

Soxhlet-Apparatur 24 Stunden lang mit 600 ml Methanol extrahiert. Die von beiden Extraktionen erhaltenen methanolischen Lösungen wurden am Rotationsverdampfer bei 40°C eingengt, mit 100 ml Ethanol 96% aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde wiederum am Rotationsverdampfer bei 40°C eingengt, mit demineralisiertem Wasser versetzt, eingefroren und gefriergetrocknet. Der erhaltene XAD-Extrakt wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 2.3 Untersuchung der Nährlösungsextrakte

#### 2.3.1 Auftrennung mit Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase dienten HPTLC-Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (10x10cm, Fa. Merck). Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5) verwendet. Von den aufzutragenden XAD-Extrakten wurden 10 bis 20 mg Extrakt in 5,0 ml Ethanol, Methanol oder dem HPLC-Fließmittel (s.dort) gelöst. 20–40 µl wurden bandenförmig mit Hilfe eines Linomaten der Fa. Camag mit Dosierspritze aufgetragen, so daß sich eine Auftragskonzentration von ca. 0,05 mg pro Bande ergab. Die Platten wurden in Horizontalkammern unter Kammersättigung bis zu einer Laufhöhe von 8 bis 9 cm entwickelt. Die Auswertung der entwickelten Platten erfolgte unter UV-Licht bei 365 nm und bei 254 nm.

##### 2.3.1.1 Dünnschichtchromatographie mit chemischen Nachweisreagenzien

Nach der Auswertung unter UV-Licht wurden die wie oben erhaltenen HPTLC-Platten mit folgenden Sprühreagenzien detektiert:

- Dragendorffs Reagenz:

Lösung a): 0,85 g basisches Wismutnitrat in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser.

Lösung b): 8 g Kaliumiodid in 20 ml Wasser.

Sprühlösung: 5 ml a) mit 5 ml b) mischen, mit 20 ml Eisessig versetzen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

- FeCl<sub>3</sub>/ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-Reagenz:

Lösung a): 0,5 g FeCl<sub>3</sub> in 10 ml Wasser (stabil)

Lösung b): 0,1 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in 10 ml Wasser (instabil)

Kurz vor Gebrauch beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen.

- Ninhydrin-Reagenz:

0,2 g Ninhydrin in 100 ml Methanol lösen.

Nachbehandlung: Bei 110°C bis zur optimalen Farbbildung trocknen.

- Orcin-Reagenz:

Lösung a): 1 g  $\text{FeCl}_3$  in 100 ml Schwefelsäure 10% lösen.

Lösung b): 0,6 g Orcin (3,5-Dihydroxy-Toluol-Monohydrat) in 10 ml Ethanol lösen.

Kurz vor Gebrauch 10 ml Lösung a) mit 1 ml Lösung b) mischen.

Nachbehandlung: 10-15 Minuten auf 100°C erhitzen.

- Naturstoffreagenz-Polyethylenglykol-Reagenz:

Lösung a): 1 g Naturstoffreagenz (Diphenylboryloxyethylamin) in 100 ml Methanol lösen.

Lösung b): 5 g Polyethylenglykol-4000 in 100 ml Ethanol lösen.

Nacheinander 10 ml Lösung a) und 8 ml Lösung b) aufsprühen und unter UV-Licht bei 365 nm auswerten.

### 2.3.2 Auftrennung mit Säulenchromatographie

Verwendet wurde eine Glassäule von 1,3 cm Durchmesser und 33 cm Länge mit einer Fritte und einem Tropfhahn sowie eine Säule von 5 cm Durchmesser und 55 cm Länge. Diese wurden mit Kieselgel 60 für Säulenchromatographie (Korngröße 0,063-0,200 mm) gefüllt. Als Fließmittel diente die für die Dünnschichtchromatographie verwendete Mischung.

Auf die Säule wurde der aus einer Kultur von *Nodularia harveyana* gewonnene XAD-Extrakt gegeben, gelöst in 20 ml Fließmittel. Der Verlauf der Säulenchromatographie wurde anhand einer Heraeus Fluoreszenzlampe (Hanau Fluotest) verfolgt, da die Substanzen bei 365 nm fluoreszierten. Die Abtropfgeschwindigkeit betrug durchschnittlich 25 Tropfen pro Minute.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden die aufgefangenen Fraktionen (2 ml bei der kleinen Säule bzw. 20 bis 25 ml bei der größeren Säule) am Rotationsverdampfer auf 0,5 ml eingengt und wie oben beschrieben auf HPTLC-Platten aufgetragen.

### 2.3.3 Auftrennung mit HPLC

Die HPLC wurde mit einer ET 250/4 Nucleosil 100–5 C18–Säule oder mit einer Hibar RT 250-4 LiChrosorb (5µm) RP-8 Säule durchgeführt, jeweils kombiniert mit einer Nucleosil 120-5 C18-Vorsäule (30 x 4 mm).

Die mobile Phase, eine Mischung aus wäßriger Natriumheptansulfonatlösung pH 3,2 und Acetonitril (PH.EUR.1997; Monographie Opium), wurde von einer Kontron Instruments HPLC PUMP 420 mit der Flußrate 1 ml min<sup>-1</sup> durch die Säule gepumpt.

Von den aufzutrennenden XAD-Extrakten wurden 10 bis 20 mg Extrakt in 5,0 ml HPLC-Fließmittel gelöst und durch einen Rheodyne Injector und eine 20 µl fassende Dosierschleife aufgebracht.

Die Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 250 nm mit einem Photo Dioden Array Detektor (L 3000, Fa. Merck/Hitachi) durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Shimadzu C-R3A Integrator oder mit einem HPLC-Software-Programm (D-6000 DAD Manager/HPLC Manager, Fa.Merck).

### 2.3.4 Spezielle Untersuchungen des Extrakts von *Nodularia harveyana*

#### 2.3.4.1 Isolierung von Norharman

Der gesamte aus einer Kultur von *Nodularia harveyana* gewonnene XAD-Extrakt wurde in etwa 40 ml Aqua bidest. suspendiert. Mit Weinsäurelösung 10% wurde die Suspension auf pH 3 gebracht und viermal mit jeweils 15 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphasen wurden verworfen. Die Wasserphase wurde mit Natriumhydroxidlösung 10% auf pH 12 gebracht und viermal mit jeweils 15 ml Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat siccatum getrocknet und danach viermal mit jeweils 15 ml Aqua bidest., das mit Salzsäure 10% auf pH 1 gebracht wurde, ausgeschüttelt. Die vereinigten Wasserphasen enthielten Norharman als Hydrochlorid. Nach dem Gefriertrocknen konnte der erhaltene Rückstand analysiert werden.

### 2.3.4.2 Identifizierung von Norharman

#### 2.3.4.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit einem Hewlett-Packard HP 8452A Diode-Array Spektrophotometer aufgenommen. Dazu wurden die vereinigten Wasserphasen – wie oben beschrieben erhalten – am Rotationsverdampfer auf 5 ml eingeeengt. Von dieser Lösung wurden zweimal 250 µl abgenommen. Ein Ansatz wurde mit 1,5 ml Aqua bidest., der andere mit 1,5 ml Natriumhydroxidlösung 10% versetzt. Beide Ansätze wurden mit Methanol auf 50,0 ml aufgefüllt und vermessen. Außerdem wurden die UV/Vis-Spektren der Norharman-Bande des dünnschichtchromatographisch aufgetrennten XAD-Extrakts von *Nodularia harveyana* direkt von der HPTLC-Platte mit Hilfe eines Camag TLC Scanners II aufgenommen.

#### 2.3.4.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem LS 50 B Perkin Elmer Lumineszenz Spektrophotometer aufgenommen. Vermessen wurden die bei der UV/Vis-Messung verwendeten Lösungen.

#### 2.3.4.2.3 Massenspektrometrie

Für die Aufnahme der Massenspektren wurde ein Hewlett-Packard HP 5989A-MS Engine Massenspektrometer verwendet: Elektronenstoßionisierung bei 70eV, Direkteinlaß: Schubstange IGT (Instrumente und Geräte Technik GmbH); Wolfram-Wendel, Temperatur der Ionenquelle: 250°C, Quadrupol-Temperatur: 120°C. Zum Vermessen wurden die vereinigten Wasserphasen, die wie oben bei der Isolierung beschrieben, erhalten wurden, zunächst gefriergetrocknet und dann in 1000 µl D<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.3.4.2.4 NMR-Spektroskopie

Für die Aufnahmen der  $^1\text{H}$ -NMR- und der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde ein Bruker ARX 300 NMR-Gerät mit der Meßfrequenz 300,13 MHz bzw. 75,47 MHz verwendet. Als innerer Standard wurde Tetramethylsilan benutzt (TMS). Vermessen wurde die bei der Massenspektrometrie verwendete Lösung.

### 2.3.4.3 Quantifizierung von Norharman

Der Gehalt von Norharman in den XAD-Extrakten wurde mittels HPLC quantitativ bestimmt. Die methodischen Parameter *Mobile Phase*, *Flußrate*, *Injektor* und *Detektion* wurden aus der Auftrennung der XAD-Extrakte übernommen (siehe 2.3.3)

Die HPLC wurde mit einer Hibar RT 250-4 LiChrosorb (5 $\mu\text{m}$ ) RP-8 Säule und einer Nucleosil 120-5 C18-Vorsäule (30 x 4 mm) durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Shimadzu C-R3A Integrator. Es wurde zuerst eine Kalibriergerade erstellt. Dafür wurden Lösungen mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  und 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Norharmanhydrochlorid Referenzsubstanz (Fa. Sigma-Aldrich). Jede dieser Lösungen wurde sechsmal analysiert. Von den erhaltenen Peakflächen wurden die Durchschnittswerte für die Aufstellung der Geradengleichung verwendet.

Von den aufzutrennenden XAD-Extrakten wurden 10 bis 20 mg Extrakt in 5,0 ml HPLC-Fließmittel gelöst. Die Norharmankonzentrationen wurden mit Hilfe der aufgestellten Geradengleichung berechnet.

### 2.3.5 Testsysteme auf Wirksamkeiten

#### 2.3.5.1 Sprühtest auf Wachstumsinhibitoren gegen Cyanobakterien

Dieser Test erfolgte nach der Methode von VOLK (1996). Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der XAD-Extrakte erfolgte auf 20 x 20 cm großen Glasplatten, die mit Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> selbst bestrichen wurden. Als Fließmittel diente eine Mischung aus Ethylacetat, Methanol und Wasser (100:16,5:13,5) sowie eine Mischung aus Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5). Die DC-Platten wurden vor dem Auftragen der Prüflösungen einmal im Fließmittel vorentwickelt, um im Kieselgel eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen (HAHN-DEINSTROP,1995). Dieses Vorwaschen erfolgte mit der obigen Mischung aus Ethylacetat, Methanol und Wasser.

Von den zu untersuchenden Extrakten wurden 10 mg in 250 µl Methanol 50% gelöst und 20 µl dieser Lösung (entsprechend 0,8 mg Extrakt) mit Hilfe einer Kapillare 1 cm breit aufgetragen. Die Platten wurden unter Kammersättigung bis zu einer Laufhöhe von 13 cm entwickelt und danach unter UV<sub>254</sub> und UV<sub>365</sub> fotografiert.

#### *Herstellung des Sprühreagenzes:*

Die zu versprühende Cyanobakterien-Suspension mußte eine bestimmte Dichte aufweisen, die dem theoretischen Absorptionswert von 40 entsprach. Dazu wurde zunächst durch die Absorptionsmessung der Ausgangskultur bei 440 nm ein Konzentrierungsfaktor ermittelt. Dann wurde die Biomasse der Kultur abzentrifugiert und in soviel frisch hergestellter Nährlösung resuspendiert, wie durch den Konzentrierungsfaktor berechnet wurde, so daß eine theoretische Absorption dieser Suspension von 40 resultierte. Für das Besprühen einer DC-Platte wurden 10 ml Cyanobakterien-Suspension benötigt.

Nach der Detektion der DC-Platten wurden diese in mit Wasser inwendig befeuchtete DC-Kammern gestellt, damit die versprühten Cyanobakterien ausreichend Feuchtigkeit erhielten. Damit die Kieselgelschicht nicht direkt mit dem Wasser in Kontakt kam, wurde etwa 1 cm der Kieselgelschicht am unteren Ende der Platte abgestrichen.

Die Kammern wurden in klimatisierten Räumen bei 25°C und unter ständiger Belichtung (40 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) bis zu vierzehn Tage aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde das Auftreten von Hemmhöfen durch Fotografieren unter Tageslicht dokumentiert.

Als Testorganismen wurden folgende Cyanobakterien verwendet:

- *Spirulina laxissima*
- *Nostoc insulare*
- *Phormidium* sp. I
- *Nostoc carneum*
- *Chroococcus minutus*
- *Synechocystis aquatilis*

### 2.3.5.2. Brine Shrimps-Test

Zwei Tage vor Testbeginn wurden 150 mg Eier von *Artemia salina* (Salinenkrebse, Fam. *Artemiidae*) und 100 ml Seewasser in einem Dreihalskolben angesetzt, der mittels eines Wasserbads konstant auf 23°C gehalten, permanent belüftet und belichtet wurde ( $60 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Das Seewasser bestand aus einer Mischung aus 500 ml Leitungswasser und 500 ml demineralisiertem Wasser, in der 32 g Artemia-Salz gelöst wurden. Nach 48 Stunden waren die Nauplien geschlüpft und konnten für den Test verwendet werden.

Von den zu testenden XAD-Extrakte wurden folgende Verdünnungen hergestellt:

$2000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  und  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Von jedem XAD-Extrakt wurden dreimal die drei Verdünnungen sowie dreimal ein Blindwert (ohne Extraktzusatz) getestet, so daß pro zu testenden Extrakt 12 Gläser angesetzt wurden. Für jeden Testansatz wurden in ein Glas 2,94 ml Seewasser, 0,06 ml der zu testenden XAD-Extraktlösung bzw. für den Blindwert 0,06 ml Aqua bidest., 2 Tropfen Hefesuspension und 10 Artemienlarven gegeben und geschüttelt. Die Hefesuspension bestand aus einer Lösung von 10-12 mg Backhefe (Dr.Oetker®) in 100 ml demineralisiertem Wasser.

Die offenen Testansätze wurden 24 Stunden unter Belichtung ( $60 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die noch lebenden und die toten Artemienlarven gezählt.

### 2.3.5.3 Test auf biologische Aktivitäten

Diese biologische Prüfung der XAD-Extrakte wurde vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung in Jena durchgeführt.

Dabei durchliefen die Extrakte zunächst eine Biologische Primärtestung, bei der mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  folgende Tests durchgeführt wurden:

- mehrere Wachstumshemmtests gegen mikrobielle gram-positive und -negative Keime, Pilze, Hefen (*C. albicans*) und Mykobakterien,
- ein Hemmtest auf zytopathische Effekte zur Bestimmung der antiviralen Wirkung gegenüber Coxsackievirus B 3, Influenzavirus A und Herpes simplex Virus Typ 1,
- ein Cytotoxizitätstest, bei dem die Toxizität und Proliferationshemmung in L-929-, K562- und HeLa-Zelllinien bestimmt wurde,
- ein In-Vitro Chemiluminiszenzassay auf die substanzmodulierende Aktivität von phagozytischen Zellen,
- drei Transkriptionsassays in Hefe zur Suche nach Agonisten und Antagonisten des humanen Progesteron- und Estrogenrezeptors sowie nach Inhibitoren der Protein-Protein-Interaktion des onkogenen Transkriptionsfaktors CREB mit dem viralen Tax Protein,
- ein ELISA auf Effektoren der Protein-Tyrosin-Phosphatase,
- ein Chemiluminiszenzassay zur Suche nach Inhibitoren der Xanthin-Oxidase,
- zwei In-Vitro Assays zur Suche nach Inhibitoren der  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und der Peroxidase,
- ein Zweihybridassay in Hefe zur Suche nach Inhibitoren der Protein-Protein-Interaktion des onkogenen Transkriptionsfaktors Myc mit dem Partnerprotein Max.

Der Test auf cytotoxische Aktivität wurde anschließend mit einer 10fach höheren Konzentration wiederholt. Dabei wurde die Wirksamkeit auf L-929-, K562- und HeLa-Zelllinien bestimmt. Bei der L-929 Zelllinie handelt es sich um eine Mäuse-Fibroblasten Zelllinie, während die K-562 Zelllinie aus humanen Leukämiezellen besteht.

## 2.4. Untersuchungen der Biomassen

### 2.4.1 Quantitative und qualitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes

Die quantitative und qualitative Bestimmung des Fettsäuregehalts erfolgte anhand der von GARCÉS und MANCHA (1993) angegebenen Methylierungsmethode mit Hilfe der Gaschromatographie.

#### *Probenvorbereitung:*

Etwa 20 mg gefriergetrocknete Biomasse, genau gewogen und 0,5 mg Heptadecansäure als interner Standard wurden mit einem Methylierungsgemisch, bestehend aus Methanol, Toluol, konzentrierte Schwefelsäure und 2,2-Dimethoxypropan im Verhältnis 39:10:2:1 sowie 1,5 ml Heptan versetzt. Methanol und Schwefelsäure fungierten dabei als Umesterungsreagenzien, Toluol wurde benötigt, um die unpolaren Lipide zu lösen und um die Umesterungsreaktion bei der Reaktionstemperatur von 80°C in einer Phase ablaufen zu lassen, Dimethoxypropan vollendete die Reaktion, indem es mit überschüssigem Wasser und mit dem entstehenden Glycerol reagierte, und Heptan diente als Extraktionsmittel für die Lipide sowie als Bestandteil der oberen Phase, die sich nach dem Abkühlen bildete und die die Fettsäuremethylester enthielt. Nach kurzer Begasung mit Stickstoff wurde die kräftig geschüttelte und gut verschlossene Mischung 2 Stunden bei 80°C im Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur bildeten sich zwei Phasen. Die Oberphase enthielt die Fettsäuremethylester und wurde für die Gaschromatographie verwendet.

#### *Gaschromatographie:*

Die Gaschromatographie wurde mit einem Hewlett Packard HP 5890 Series II Gaschromatographen und einer WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica), SPB™-1 von 25 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser und 0,25 µm Beschichtungsdicke der Fa. Supelco durchgeführt.

Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Flußrate von 1,5 ml min<sup>-1</sup> verwendet. Das Splitverhältnis betrug 1/100 und das Temperaturprogramm verlief folgendermaßen: 4 Minuten lang wurde eine Temperatur von 150°C gehalten, dann stieg die Temperatur mit einer Heizrate von 3°C min<sup>-1</sup> auf 250°C, die dann isotherm bis zum Ende der Laufzeit von 45 Minuten gehalten

wurde.

Die Injektor- und die Detektortemperatur betrug 250°C.

Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor, und die Integration wurde mit dem Software Programm HP 3365 Series II Chemstation durchgeführt.

Die Identifizierung der Fettsäuren gelang mit Hilfe verschiedener Fettsäurenstandardgemische (Bacterial Acid Methyl Esters Mix, Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix und Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix; alle von der Fa. Supelco). Dabei wurden die relativen Retentionszeiten, bezogen auf Heptadecansäure als interner Standard miteinander verglichen. Die prozentualen Anteile am Gesamtfettsäuregehalt wurden über die in der Analyse erhaltenen Peakflächen in Relation zu der Peakfläche des internen Standards berechnet. Um diejenigen Fettsäuren zu identifizieren, die nicht in den Fettsäurenstandardgemischen enthalten waren und um die Identifizierung der Fettsäuren zu überprüfen, wurde eine gaschromatographische Analyse gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt.

### *Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie:*

Die GC-MS Analyse wurde mit einem Hewlett Packard HP 5890 Series II Gaschromatographen und einer WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica), FFAP-DF-0.10 mit 25 m Länge und 0,25 mm Innendurchmesser der Fa. Macherey & Nagel durchgeführt.

Als Trägergas wurde Helium mit einer Flußrate von 1 ml min<sup>-1</sup> verwendet. Das Splitverhältnis betrug 1/100 und das Temperaturprogramm verlief folgendermaßen: 10 Minuten lang wurde eine Temperatur von 120°C gehalten, dann stieg die Temperatur mit einer Heizrate von 3°C min<sup>-1</sup> auf 220°C, die dann isotherm 15 Minuten lang gehalten wurde.

Die Injektortemperatur betrug 250°C.

Die Detektion erfolgte mit einem Hewlett-Packard HP 5989A-MS Engine Massenspektrometer mit Elektronenstoßionisierung bei 70eV.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe des Software Programms HP G 1034 C-Software für MS Chemstation. Damit gelang die Identifizierung der Fettsäuren durch den Vergleich ihrer Massenspektren mit denen bekannter Fettsäuren aus einer in der Arbeitsgruppe erstellten Spektrenbibliothek.

#### 2.4.2 Quantitative und qualitative Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes

##### *Probenvorbereitung:*

Die gefriergetrocknete Biomasse wurde in einer Reibschale einige Minuten kräftig verrieben. Etwa 25 mg dieses Pulvers, genau gewogen, wurden dann in einem Zentrifugenglas mit einer Mischung aus Aceton und Methanol im Verhältnis 3:1 folgendermaßen extrahiert:

1.Extraktion mit 20 ml Lösungsmittelgemisch für eine Minute auf einem Vortex-Gerät (Stufe 8), 2.Extraktion mit 10 ml Lösungsmittelgemisch für eine Stunde auf einer Schüttelmaschine (mittlere Stufe), 3.Extraktion mit 10 ml Lösungsmittelgemisch über Nacht auf einer Schüttelmaschine (mittlere Stufe), 4.Extraktion mit 5 ml Lösungsmittelgemisch für eine Stunde auf einer Schüttelmaschine (mittlere Stufe). Nach jeder Extraktion wurde die erhaltene Lösung bei 3000 x g abzentrifugiert. Die vereinigten Lösungen wurden filtriert und mit Lösungsmittelgemisch auf 50,0 ml aufgefüllt. Alle Arbeitsschritte wurden unter Lichtschutz durchgeführt.

##### *Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehaltes:*

Die Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehaltes erfolgte photometrisch nach der bei DAVIES (1976) angegebenen Methode. Die bei der Probenvorbereitung erhaltenen acetonisch-methanolischen Lösungen wurden mit einem Hitachi U 1100 Spektrophotometer bei 450 nm gegen die Mischung aus Aceton und Methanol vermessen. Anhand des spezifischen Absorptionswertes von Carotinoiden ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}=2500$ ) konnte der Gehalt berechnet werden. Da die Chlorophylle bei der Absorptionsmessung miterfaßt wurden, wurde dieser Wert nach Erhalt der Einzelwerte für Carotinoide und Chlorophylle mittels HPLC um den Chlorophyllanteil korrigiert.

##### *Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehaltes:*

Die acetonisch-methanolischen Lösungen wurden wie bei der Gesamtcarotinoidbestimmung photometrisch bei 646 nm und bei 663 nm vermessen. Die Berechnung des Gesamtchlorophyllgehaltes wurde unter Anwendung der bei HARBOURNE (1984) angegebenen Formel durchgeführt:

$$\text{Gesamtchlorophyll (mg} \cdot \text{l}^{-1}\text{)} = 17,3 \cdot A(646 \text{ nm}) + 7,18 \cdot A(663 \text{ nm})$$

### *Quantitative und qualitative Bestimmung der Carotinoid- und Chlorophyllzusammensetzung mittels HPLC-Analyse*

Die HPLC-Analyse basierte auf den Arbeiten von NELIS und DE LEENHEER (1983 und 1988).

Die bei der Probenvorbereitung erhaltenen acetonischen bzw. acetonisch-methanolischen Lösungen wurden am Rotationsverdampfer schonend eingeengt. Der Rückstand wurde in 4,0 ml HPLC-Fließmittel (Zusammensetzung siehe unten) aufgenommen und vor Licht geschützt aufbewahrt.

Die HPLC wurde mit einer 250 x 4,6 mm Zorbax ODS (5µm) Säule und einer Nucleosil 120-5 C18-Vorsäule (30 x 4 mm) durchgeführt.

Die mobile Phase bestand aus Acetonitril, Dichlormethan und Methanol (60:20:20) und wurde von einer Kontron Instruments HPLC PUMP 420 mit der Flußrate 1ml min<sup>-1</sup> durch die Säule gepumpt.

Die Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Photo Dioden Array Detektor (L 3000, Fa. Merck/Hitachi) durchgeführt.

Die Identifizierung der Carotinoide und Chlorophylle gelang über den Vergleich mit den Retentionszeiten und den spezifischen Absorptionsspektren von Referenzsubstanzen mit Hilfe des HPLC-Software-Programms (D-6000 DAD Manager/HPLC Manager, Fa.Merck), während die quantitative Auswertung über die Peakflächen mit einem Shimadzu C-R3A Integrator erfolgte.

#### 2.4.3 Quantitative und qualitative Bestimmung des Phycobiliproteingehaltes

##### *Probenvorbereitung:*

Etwa 20 mg gefriergetrocknete Biomasse, genau gewogen, wurden mit 1,5 g Seesand (Quarzsand, feinkristallin, 0,1-0,7 mm) in einer Reibschale einige Minuten kräftig verrieben, so daß das Material an der Reibschalenwand haftete. Dieses Pulver wurde dann in einem Zentrifugenglas mit Phosphatpuffer pH 7 folgendermaßen extrahiert: 1.Extraktion mit 20 ml Phosphatpuffer für eine Stunde auf einer Schüttelmaschine (mittlere Stufe), 2. und 3.Extraktion mit jeweils 10 ml Phosphatpuffer für eine halbe Stunde unter den gleichen Bedingungen. Vor jeder Extraktion wurde das Zentrifugenglas für eine Minute auf einem

Vortex-Gerät (Stufe 8) geschüttelt. Nach jeder Extraktion wurde die erhaltene Lösung bei 3000 x g abzentrifugiert. Die vereinigten Lösungen wurden filtriert und mit demineralisiertem Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt. Alle Arbeitsschritte wurden unter Lichtschutz durchgeführt.

*Bestimmung des Phycobiliproteingehaltes:*

Die Gehaltsbestimmung erfolgte wie bei den Carotinoiden und den Chlorophyllen photometrisch bei 562 nm, 615 nm und 652 nm. Zur Berechnung wurden die bei BENNETT und BOGORAD (1973) angegebenen Formeln herangezogen:

$$\text{Phycocyanin PC (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{A(615 \text{ nm}) - 0,474 \cdot A(652 \text{ nm})}{5,34}$$

$$\text{Allophycocyanin APC (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{A(652 \text{ nm}) - 0,208 \cdot A(615 \text{ nm})}{5,09}$$

$$\text{Phycoerythrin PE (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{A(562 \text{ nm}) - 2,41 \cdot (\text{Konz. PC}) - 0,849 \cdot (\text{Konz. APC})}{9,62}$$

#### 2.4.4 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes

Der Gesamtstickstoffgehalt wurde mit Hilfe der Mikro-Kjeldahl-Methode nach ZURHEIDE (1979) bestimmt. Dazu wurden etwa 25 mg gefriergetrocknete Biomasse, genau gewogen, mit 1 g Selen-reaktionsgemisch und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure Suprapur<sup>®</sup> in einem Büchi 430-Digestor drei Stunden lang aufgeschlossen. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung nach Zugabe von 25 ml demineralisiertem Wasser, 25 ml Natronlauge 30% und zwei bis drei Tropfen Methylrotlösung mittels einer Büchi 321-Destillationseinheit in eine Vorlage von 20,0 ml Salzsäure 0,01 N Titrisol<sup>®</sup> und zwei Tropfen Mischindikatorlösung destilliert. Die überschüssige Salzsäure wurde mit Natronlauge 0,01 N Titrisol<sup>®</sup> zurücktitriert. Parallel dazu wurde ein Blindversuch ohne Probe durchgeführt, und der hierbei ermittelte Blindwert von dem Natronlaugenverbrauch der Probe abgezogen.

Der Gesamtstickstoffgehalt der Probe ergab sich folgendermaßen:

$$\%N = \frac{\text{Verbrauch HCl } 0,01N \text{ (ml)} \cdot 14}{\text{Einwaage (mg)} \cdot 100}$$

### 2.4.5 Untersuchung der Biomasse von *Nodularia harveyana* auf Norharman mittels HPLC

#### Methode A:

Etwa 500 mg gefriergetrocknete Biomasse, genau gewogen, wurden in einem Zentrifugenglas mit 10 ml Methanol Lichrosolv<sup>®</sup> durch einminütiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät (Stufe 6) extrahiert. Diese Extraktion wurde dreimal wiederholt, wobei nach jedem Mal bei 3000 x g abzentrifugiert wurde und die überstehenden Lösungen in einem Spitzkolben vereinigt wurden. Der methanolische Extrakt wurde zur Trockene eingengt, mit 25 ml Aqua bidest. aufgenommen und mit Salzsäure (10%) auf pH 2 gebracht, damit das Alkaloid als Salz vorlag und nicht beim anschließenden Ausschütteln mit viermal 20 ml Dichlormethan im Scheidetrichter zusammen mit den Carotinoiden und Chlorophyllen entfernt wurde. Anschließend wurde die Wasserphase mit Natronlauge (10%) auf pH 12 alkalisiert und viermal mit 20 ml Ether ausgeschüttelt, um die hydrophilen Phycobiliproteine zu entfernen, wobei das Alkaloid als Base in die Etherphase gelangte. Danach wurde mit jeweils 15 ml angesäuertem Aqua bidest. (pH 1) viermal ausgeschüttelt, eingengt und der Rückstand für die HPLC in einer definierten Menge (150 µl) mobiler Phase gelöst.

#### Methode B:

Etwa 500 mg gefriergetrocknete Biomasse, genau gewogen, wurden in einem Zentrifugenglas mit angesäuertem Aqua bidest. (pH 1) befeuchtet und mit 10 ml Dichlormethan durch einminütiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät (Stufe 6) extrahiert, wobei die Carotinoide und Chlorophylle extrahiert wurden, während das Alkaloid als Salz in der Biomasse verblieb. Diese Extraktion wurde dreimal wiederholt, wobei nach jedem Mal bei 3000 x g abzentrifugiert wurde und die überstehenden Lösungen verworfen wurden.

Anschließend wurde die Biomasse mit 10 ml angesäuertem Aqua bidest. (pH 1) versetzt und das Alkaloid durch einminütiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät (Stufe 6) extrahiert. Diese Extraktion wurde dreimal wiederholt, wobei nach jedem Mal bei 3000 x g abzentrifugiert

wurde und die überstehenden Lösungen in einem Spitzkolben vereinigt wurden. Anschließend wurde die Wasserphase mit Natronlauge (10%) auf pH 12 alkalisiert und viermal mit 20 ml Ether ausgeschüttelt, um die hydrophilen Phycobiliproteine zu entfernen, wobei das Alkaloid als Base in die Etherphase gelangte. Danach wurde mit jeweils 15 ml angesäuertem Aqua bidest. (pH 1) viermal ausgeschüttelt, eingengt und der Rückstand für die HPLC in einer definierten Menge (150 µl) mobiler Phase gelöst.

Endgültig verwendete Methode:

Etwa 150 mg gefriergetrocknete Biomasse, genau gewogen, wurden in einem Zentrifugenglas mit 2 ml Methanol Lichrosolv<sup>®</sup> durch einminütiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät (Stufe 6) extrahiert. Diese Extraktion wurde fünfmal wiederholt, wobei nach jedem Mal bei 3000 x g abzentrifugiert wurde und die überstehenden Lösungen in einem Spitzkolben vereinigt wurden. Der methanolische Extrakt wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und der Rückstand in 500,0 µl Methanol Lichrosolv<sup>®</sup> aufgenommen. Mit dieser Lösung wurde die HPLC-Analyse durchgeführt. Dazu wurde eine Hibar RT 250-4 LiChrosorb (5µm) RP8-Säule sowie eine Nucleosil 120-5 C18-Vorsäule (30 x 4 mm) verwendet.

Die mobile Phase bestand aus einer Mischung aus wäßriger Natriumheptansulfonatlösung pH 3,2 und Acetonitril (Ph.Eur.1997; Monographie Opium) und wurde von einer Kontron Instruments HPLC PUMP 420 mit der Flußrate 1 ml min<sup>-1</sup> durch die Säule gepumpt.

Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 250 nm mit einem Photo Dioden Array Detektor (L 3000, Fa. Merck/Hitachi).

Die Identifizierung des Norharmanpeaks gelang über den Vergleich der Retentionszeit und des spezifischen Absorptionsspektrums von Norharmanhydrochlorid Referenzsubstanz mit Hilfe des HPLC-Software-Programms (D-6000 DAD Manager/HPLC Manager der Fa. Merck), während die quantitative Auswertung über die Peakfläche mit einem Shimadzu C-R3A Integrator erfolgte. Dafür wurde zunächst eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen 10 µg ml<sup>-1</sup>, 50 µg ml<sup>-1</sup> und 100 µg ml<sup>-1</sup> Norharmanhydrochlorid erstellt, und dann über die Geradengleichung die Konzentration in der Probe errechnet.

## **C** **ERGEBNISSE**

### **1 Extraktionsmethoden**

#### **1.1 Entwicklung eines Extraktionsverfahrens unter Verwendung von Ethanol und Aceton**

Um die in den Mikroalgen-Nährlösungen vorkommenden Metaboliten untersuchen zu können, sollte zunächst eine geeignete Extraktionsmethode für deren Gewinnung aus den Nährlösungen gefunden werden. Zunächst mußten die in den Nährlösungen in nur sehr geringer Konzentration vorliegenden Substanzen aufkonzentriert werden. Da es sich um große Mengen eines wäßrigen Mediums handelte, war das Einrotieren am Rotationsverdampfer zu langwierig (Siededruck von Wasser bei  $T_s = 40^\circ\text{C}$ : 65 mbar). Deshalb wurden die Volumina, die pro Kultur anfielen (8 Liter), zunächst gefriergetrocknet.

Bei der Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels mußte einerseits die hohe Polarität der Substanzen berücksichtigt werden, andererseits mußte eine Möglichkeit gefunden werden, um die der Nährlösung zur Ernährung der Mikroalgen zugesetzten und ebenfalls gut wasserlöslichen Salze abzutrennen. Es mußte also ein Lösungsmittel wie Methanol und Ethanol verwendet werden, welches genügend polar war, in dem sich aber Salze nicht lösen. Wegen der geringeren Toxizität wurde zunächst auf Ethanol zurückgegriffen.

Da die genaue Polarität der Substanzen nicht bekannt war, wurden zunächst verschiedene Ethanol/Wasser-Gemische getestet, wobei sich Ethanol 80% als am besten geeignet erwies. Der Nachteil, daß sich in dem Wasseranteil ein Teil der Salze löste, wurde mit einer anschließenden Extraktion mit absolutem Ethanol, bei der die Salze ausfielen, auszugleichen versucht.

Bei vielen der erhaltenen Extrakte waren nun tatsächlich anhand der Dünnschichtchromatographie bei Betrachtung unter UV-Licht zahlreiche Flecken von Substanzen zu sehen. Ihre Zahl variierte von zwei bis neun, je nach Kultur.

Da allerdings am Start der DC-Platten noch immer große verlaufende Flecken, die auf Salze hindeuteten, zu sehen waren, mußte eine weitere Extraktion mit einem etwas unpolaren Lösungsmittel angefügt werden. Ausprobiert wurden verschiedene Aceton/Wasser-Gemische, wobei sich die Mischung Aceton/Wasser im Verhältnis 95:5 als am besten geeignet erwies, die Salze abzutrennen. Bei Zugabe dieser Mischung fielen nicht nur Salze aus, sondern der Extrakt bildete auch zwei Phasen. Die meistens hellgelb gefärbte obere Phase bestand aus Aceton mit einem wäßrigen Anteil, während die wäßrige untere Phase meistens dunkelbraun gefärbt war. Anhand der DC konnte man sehen, wie sich die im Extrakt enthaltenen Salze verteilten:

Die ausgefallenen und wieder in Wasser gelösten Salze zeigten deutlich die großen am Start verlaufenden Salzflecken. Die wäßrige Unterphase wies ebenfalls diese Salzflecken auf, allerdings in geringerem Ausmaß, während sie in der Oberphase nicht mehr auftraten. Die Verteilung der hier interessierenden eigentlichen Substanzen auf diese beiden Phasen verlief dagegen anders:

Diese Substanzen waren nicht nur in der Oberphase zu finden, sondern verteilten sich gleichmäßig auf die Ober- und die Unterphase; in der Unterphase war ihre Konzentration sogar noch etwas erhöht. Die Hoffnung, die Substanzen nur in der salzfreien Oberphase zu finden, erfüllte sich somit nicht.

Anhand der dünnschichtchromatographischen Auftrennung war die Verteilung der Substanzen je nach Polarität auf die beiden Fraktionen gut zu sehen: Die wäßrige Unterphase enthielt neben den Salzflecken sehr polare Verbindungen mit niedrigeren R<sub>f</sub>-Werten, während die acetonische Oberphase die Substanzen mittlerer und niedrigerer Polarität enthielt, die auf der DC-Platte relativ hohe R<sub>f</sub>-Werte aufwiesen.

Bei der Untersuchung dieser Fraktionen mittels HPLC stellte sich zudem heraus, daß bei Verwendung einer unpolaren Säule (RP-8 oder RP-18 Kieselgel) und einem relativ polaren Fließmittel (siehe Kapitel 2 des Ergebnisteils unter 2.1.3) nur die Auftrennung der Oberphase gelang, während die wäßrige Unterphase lediglich einen großen ungetrennten Peak gleich zu Beginn des Laufes zeigte. Auch diese Beobachtung wies darauf hin, daß dieser Anteil Salze beziehungsweise sehr hydrophile Verbindungen enthielt, die keine Wechselwirkungen zu dem reversed-phase Material eingingen.

Um zu sehen, ob der pH-Wert bei der Extraktion eine Rolle spielt, wurde zu Beginn der Untersuchungen die Extraktion auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt. Die gefriergetrocknete Nährlösung wurde zuerst bei pH 10 extrahiert, anschließend auf pH 5 gebracht und ein weiteres Mal extrahiert. Diese Methode wurde mit der umgekehrten Reihenfolge, also zuerst Extraktion bei pH 5, anschließend Extraktion bei pH 10, verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß der pH-Wert eine gewisse Rolle spielte. Aus der Extraktion, die erst im sauren, dann im basischen Milieu stattfand, ergab sich eine um etwa 20% höhere Ausbeute, die sich eventuell auf das Vorhandensein von basisch reagierenden Verbindungen zurückführen ließ, da diese im sauren Milieu Salze bilden und damit gut hydrophil zu extrahieren sind. Aus diesem Grund wurde schließlich die folgende Extraktionsmethode als am besten geeignet erachtet:

Die Extraktion der Nährlösung wurde zuerst unter sauren, danach unter alkalischen Bedingungen mit Ethanol 80% durchgeführt. Nach dem Einengen wurde mit absolutem Ethanol extrahiert, die ausgefallenen Salze wurden verworfen, und der Extrakt erneut eingengt. Der Rückstand wurde mit einer Aceton/Wasser-Mischung aufgenommen, die restlichen ausgefallenen Salze verworfen, und die beiden erhaltenen Phasen für weitere Untersuchungen verwendet.

### **1.2 Entwicklung der Extraktion mit Amberlite® XAD-1180 Adsorberharz**

Bei dieser Extraktionsmethode wurde die Nährlösung einer ganzen Kultur (8 Liter) erschöpfend mit Amberlite® XAD-1180 Adsorberharz 24 Stunden lang extrahiert. Bei den Amberlite® XAD-Harzen handelt es sich um unspezifische Adsorber auf Basis von vernetzten Kettenpolymeren. Die Harzkügelchen weisen eine hohe Porosität auf, da sie ihrerseits aus einer großen Zahl von Mikro-Kügelchen aufgebaut sind. Es gibt verschiedene XAD-Harze, unter anderem Anionenaustauscherharze wie XAD-7, nicht-ionische Harze wie XAD-8 und Polystyrolharze wie XAD-16. Bei dem hier verwendeten Amberlite® XAD-1180 handelt es sich um ein nicht-ionisches hydrophobes Polystyrol-Copolymer, dessen Grundgerüst aus Polystyrol, das mit Divinylbenzol vernetzt ist, besteht. Es ist besonders gut zur Adsorption von wasserlöslichen organischen Verbindungen aus wäßrigen Lösungen geeignet. Die Adsorption erfolgt über unspezifische Bindungskräfte wie Van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Die in der Nährlösung vorhandenen Salze wurden von dem

Adsorberharz nicht erfaßt. Das beladene Adsorberharz wurde anschließend mit Methanol extrahiert, in dem sich die an das Harz adsorbierten Substanzen lösten.

Um sowohl das Beladen des Harzes mit den Nährlösungsmetaboliten als auch das anschließende Extrahieren des Harzes erschöpfend zu gestalten, wurde hier eine Methode entwickelt, die gleichzeitig eine gewisse Automatisierung des Prozesses gestattete. Zu diesem Zweck wurde das Adsorberharz in Soxhlet-Hülsen gefüllt. Dann wurde die Extraktion der Nährlösung als auch die anschließende Behandlung des beladenen Harzes mit Methanol in dieser Soxhlet-Apparatur durchgeführt. Das verwendete Methanol ließ sich danach wieder am Rotationsverdampfer entfernen. Dann wurde der Rückstand in Ethanol gelöst, filtriert und erneut zur Trockene eingengt. Abschließend wurde der gewonnene Extrakt mit Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Allgemein werden diese Adsorberharze viel verwendet, um im Kulturüberstand enthaltene Sekundärmetaboliten zu adsorbieren, so auch kleinmolekulare organische Komponenten wie zum Beispiel Fulvinsäuren aus Trinkwasser (HAMBSCHE et al.,1993) oder Cytokine aus Ostseewasser (SYNAK et al.,1986). Auch für Naturstoffextraktionen wie Flavonoide aus Ginkgo (YOON et al.,1997) oder Anthocyane aus *Vigna subterra* (PALE et al.,1997) wurden verschiedene Polymerharze eingesetzt. Daß Metaboliten aus Algennährlösungen mit XAD-Adsorberharzen extrahiert werden konnten, zeigten die Untersuchungen von FISH & CODD (1994) an *Phormidium* sp.. Dieses Cyanobakterium gab antimikrobiell wirkendes extrazelluläres Material in die Nährlösung ab, welche mit XAD-7 extrahiert werden konnte. Aus der Nährlösung von *Nostoc commune* wurden antibakteriell wirkende Diterpene mit Hilfe von XAD-2 eluiert (JAKI et al.,1998). Andere Untersuchungen zeigten, daß Abscisinsäure, ein Phytohormon, welches Algen in ihre Kulturlösung abgeben, daraus mit XAD-7 extrahiert werden konnte (ZAHRADNICKOVA et al.,1990).

### 1.3 Zusammenfassung und Diskussion

Mit den beiden oben beschriebenen Methoden konnte man auf unterschiedliche Art die Metaboliten aus der Nährlösung extrahieren. Welche Methode im Endeffekt ausgewählt wurde, hing von folgenden Fragestellungen ab:

Erstens: Wie hoch war die Ausbeute an Extrakt?

Zweitens: Wurden alle Metaboliten von der Extraktion erfaßt?

Drittens: Gelang es, die der Nährlösung zugesetzten Salze zu entfernen oder gelangten diese mit in den Extrakt?

Viertens: Wie hoch war der Material - und Zeitaufwand?

Um dieses zu beurteilen, wurden die Extrakte zunächst gewogen und danach die Substanzflecken nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung auf Anzahl und Ausprägung hin betrachtet. Insgesamt war die Ausbeute mit der Methode 1.1 (Extraktion mit Ethanol/Aceton) geringer als mit der XAD-Methode: Die erhaltenen Extraktmengen betrugen je nach Kultur 400 mg bis 500 mg, aus etwa 50 mg Oberphase und 450 mg Unterphase bestehend. Letztere enthielt noch einen Salzanteil. Die XAD-Extrakte enthielten dagegen zwischen 800 mg und 3500 mg.

Aus der dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurde ersichtlich, daß die Extrakte beider Verfahren die gleichen Substanzflecken auf der DC-Platte zeigten, folglich waren beide Methoden, was das Erfassen der Metaboliten aus der Nährlösung betraf, gleichwertig.

Unterschiede gab es jedoch bezüglich des Salzanteils der Extrakte. Der mit der Methode 1.1 erhaltene Extrakt zeigte auf der DC-Platte neben den Substanzflecken noch deutliche Salzflecken am Start. Deren Abtrennung gelang nicht, ohne dabei auch einen Teil der sehr hydrophilen Substanzen mitabzutrennen, wie die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Ober- und Unterphase zeigte. Der XAD-Extrakt dagegen wies keinerlei zusätzliche Salze auf, da diese von dem Adsorberharz nicht erfaßt wurden.

Der Zeitaufwand war für beide Methoden vergleichbar. Die Herstellung eines Extrakts dauerte mit beiden Methoden drei Tage. Allerdings unterschieden sich die beiden Herstellungen bezüglich des Arbeitsaufwandes. Die XAD-Methode gestaltete sich wesentlich effektiver, da aufgrund des Einsatzes von Soxhlet-Apparaturen mehrere Extraktionen parallel laufen konnten.

Für beide Methoden waren außer den Lösungsmitteln Ethanol, Methanol und Aceton keine weiteren Chemikalien nötig. Für die XAD-Methode war der Bedarf an Methanol wesentlich höher, da sowohl für das Reinigen des Harzes als auch für die Extraktion etwa drei Liter benötigt wurden. Allerdings konnte dieses Lösungsmittel nach Redestillation wiederverwendet werden.

Im Laufe dieser Dissertation wurde schließlich die XAD-Methode als letztlich besser geeignet für die Extraktionen ausgewählt, vor allem wegen der Tatsache, daß keine Salze erfaßt wurden und die Extraktausbeute höher war.

## 2 Zusammensetzung der Extrakte

### 2.1 Entwicklung der verschiedenen Trennmethode

#### 2.1.1 Dünnschichtchromatographie

Um schnell eine Übersicht zu gewinnen, ob in den zu untersuchenden Nährlösungsextrakten Substanzen enthalten waren, bot sich die Dünnschichtchromatographie als eine schnelle und einfache Methode an. Für die dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Extrakte mußte zunächst ein geeignetes Fließmittel gefunden werden. Hier erwies sich das Fließmittelgemisch Ethylacetat, Methanol und Wasser (100:16,5:13,5) (HÖRHAMMER et al.,1963) zunächst als gut geeignet. Da eine doppelte Entwicklung der DC-Platten oft zu einem besseren Trennergebnis führt, wurden einige Platten zuerst mit der Oberphase einer Mischung aus n-Butanol, Eisessig und Wasser (4:1:5), dem „Partridge-Gemisch“ entwickelt, bevor sich die Entwicklung mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat, Methanol und Wasser (100:6,5:13,5) anschloß. Dieses Verfahren ergab allerdings keine signifikante Verbesserung gegenüber der alleinigen Entwicklung mit Ethylacetat, Methanol und Wasser.

Die Trennung war auf den DC-Platten, die mit Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> selbst bestrichen wurden, einigermaßen gut, allerdings zeigte sich selbst auf den HPTLC-Fertigplatten, die normalerweise zu einer schärferen Trennung führen, daß die Substanzflecken nicht vollständig voneinander getrennt wurden, sondern daß ein mehr oder weniger ausgeprägtes Tailing zu sehen war.

Eine deutliche Verbesserung wurde durch Zusatz von Säure zum Fließmittel erzielt. Die Mischung Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5) zeigte eine bessere Trennung, die wahrscheinlich auf die Protonierung einiger Verbindungen zurückzuführen war, die dadurch stärkere Wechselwirkungen mit dem Kieselgel eingingen.

Die Detektion der entwickelten HPTLC-Platten erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm und 365 nm. Um die Fluoreszenz bei 365 nm zu verstärken, wurden die Platten mit Naturstoffreagenz-Polyethylenglykol-Reagenz besprüht. Anhand dieser Methode konnte leicht festgestellt werden, ob sich Substanzen in den Extrakten befanden, da diese sich als dunkle Flecken unter UV<sub>245</sub> beziehungsweise als fluoreszierende Flecken unter UV<sub>365</sub> zeigten. Die Fluoreszenzen waren meist bläulich, manchmal intensiv hellblau, oft auch gelblich.

### 2.1.2 Säulenchromatographie

Mit Hilfe dieser Methode sollte zum einen versucht werden, größere Extraktmengen zu fraktionieren, zum anderen sollte untersucht werden, ob durch anschließende dünnschichtchromatographische Auftrennung der erhaltenen Säulenfraktionen noch weitere Substanzen sichtbar gemacht werden konnten.

Zunächst wurde eine kleine Säule mit 1,3 cm Durchmesser und 33 cm Länge verwendet. Der aufzutrennende Extrakt einer Kultur von *Nodularia harveyana* wurde zuvor nach der Extraktionsmethode mit Ethanol und Aceton hergestellt. Auf die Säule wurde die nach der Behandlung mit dem Aceton/Wasser-Gemisch entstehende Oberphase gebracht. Nach dem Vorlauf wurden 35 Fraktionen aufgefangen und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

Es stellte sich heraus, daß keine vollständige Trennung des Extrakts in Einzelsubstanzen möglich war. Es entstand nur eine Fraktionierung in Gruppen von mehr und weniger hydrophilen Verbindungen. Außerdem ergab die Säulenchromatographie, daß bereits durch die Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie, wenn auch in sehr viel geringeren Mengen, eine vollständige Erfassung und Trennung der im Extrakt vorhandenen Substanzen möglich war. Anhand des Vergleichs des ungetrennten Extrakts mit den aufgetrennten Fraktionen war zu erkennen, daß kein nicht bereits schon vorher erkannter Substanzfleck auftauchte.

Die Säulenchromatographie zeigte zwar die gleiche Zahl von Verbindungen in den Extrakten, brachte aber keine Verbesserung gegenüber der dünnschichtchromatographischen Trennung. Dies zeigte sich auch bei der Verwendung einer größeren Säule mit 5 cm Durchmesser und 55 cm Länge. Hierbei wurden 113 Fraktionen zu je 20 bis 25 ml aufgefangen und auf DC-Platten aufgetragen. Die bereits durch den Versuch mit der kleinen Säule gewonnenen Erkenntnisse bestätigten sich. Die Trennung verbesserte sich nicht; nur die Anzahl der Fraktionen, auf die sich die gleichen Substanzen verteilten, erhöhte sich: so wiesen u.a. die Fraktionen 30 bis 38 ein identisches Muster auf der DC-Platte auf.

### 2.1.3 HPLC

Nachdem eine gute dünnschichtchromatographische Auftrennung der Extrakte ermöglicht worden war, sollte anschließend auch eine Auftrennung mit Hilfe der HPLC erreicht werden. Die HPLC ist nicht nur in der Lage, geringere Substanzmengen aufgrund der hohen Empfindlichkeit der UV/Vis-Detektoren (NEUGEBAUER,1992) zu erfassen, sondern ermöglicht zusätzlich eine Quantifizierung der Inhaltsstoffe.

Zuerst wurde versucht, mit Hilfe der Normalphasenchromatographie die Trennverhältnisse der Dünnschichtchromatographie auf die HPLC zu übertragen. Dazu wurde eine Nucleosil 50-7 ET250/4 Kieselgelsäule und als Fließmittel eine Mischung aus Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5), die sich bei der dünnschichtchromatographischen Trennung als vorteilhaft erwiesen hatte, verwendet. Die Trennung der Extrakte gelang damit nur unvollständig, da die Substanzen sehr schnell hintereinander und nicht voneinander getrennt im Chromatogramm erschienen. Das Problem bei der Normalphasenchromatographie bestand darin, daß das Fließmittel wegen der hier vorliegenden polaren Verbindungen ebenfalls hydrophil sein mußte, da ein unpolares Fließmittel dazu geführt hätte, daß die Substanzen nicht von der Kieselgel-säule eluiert worden wären. Da aber alle Komponenten - Säulenmaterial, Fließmittel und zu trennender Extrakt - polar waren, führte diese Methode zu keiner aussagekräftigen Trennung.

Viele HPLC-Trennmethode, auch des Arzneibuchs, werden mit unpolaren Säulen, die mit reversed phase-Material wie RP-8 oder RP-18 Kieselgel gefüllt sind, durchgeführt, weswegen die folgenden beschriebenen Versuche mit einer RP-18 Nucleosil 100-5 ET 250-Säule durchgeführt wurden.

Da die dünnschichtchromatographische Auftrennung mit der Mischung Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5), welches ein Fließmittel für die Untersuchung von Flavonoiden darstellt (PACHALY,1991), gute Resultate erbracht hatte, wurde zunächst eine HPLC-Methode für Flavonoidbestimmungen getestet. Als Vertreter dieser Substanzgruppe wurden Chlorogensäure und Kaffesäure neben dem Nährlösungsextrakt dünnschichtchromatographisch untersucht, um zu sehen, welche Position diese beiden Flavonoide bezüglich der Substanzflecken im Extrakt aufwiesen. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Wasser, Ethylacetat und Essigsäure (95,6:4,1:0,3) verwendet (SHAHRZAD & BITSCH,1996).

Die Auftrennung des Extrakts verlief nur wenig zufriedenstellend, so daß diese Methode vor allem wegen der sehr langen Retentionszeiten wieder verworfen wurde. Die Substanzen wurden zuerst sehr rasch aufeinander folgend eluiert, während die letzten Substanzpeaks bei einer Flußrate von  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$  erst nach 40 Minuten erschienen. Die Flußrate ließ sich wegen des hohen Drucks aufgrund des Wasseranteils in dem Eluenten nicht mehr steigern. Auch die Einführung eines Fließmittelgradienten konnte keine Verbesserung bringen, da Wasser und Ethylacetat nur begrenzt miteinander mischbar sind (max. 75 g Ethylacetat in 1000 g Wasser).

Außerdem wurden folgende Fließmittel ausprobiert:

Acetonitril, Dichlormethan und Methanol (60:20:20): Diese Mischung erwies sich als ungeeignet, da sie zu lipophil war. Das Gleiche galt für die Mischung aus wäßriger Essigsäurelösung 0,1% und Acetonitril (85:15). Mit Methanol und Wasser (50:50) verlief die Trennung ebenfalls ungenügend, weil die Substanzen zu schnell aufeinanderfolgend eluiert wurden.

Da inzwischen durch die parallel durchgeführten Untersuchungen bekannt war, daß das Alkaloid Norharman als Inhaltsstoff im Nährlösungsextrakt von *Nodularia harveyana* enthalten war (siehe Kapitel 4 des Ergebnisteils), wurde die Auftrennung mit Hilfe der HPLC-Methode aus dem Europäischen Arzneibuch für die Analyse der Alkaloide in Opium durchgeführt. Dieses Fließmittel besteht aus einer Mischung aus wäßriger Natriumheptansulfonatlösung, welche auf den pH-Wert 3,2 eingestellt wird, und Acetonitril. Es handelt sich hierbei um eine Ionenpaarchromatographie für dissoziierende Verbindungen, bei der die Alkaloide bei pH 3,2 protoniert werden. Mit den Natriumheptansulfonationen im Eluenten bilden sie Ionenpaare, die Wechselwirkungen zur stationären Phase eingehen.

Das Chromatogramm zeigte bei der Verwendung dieser HPLC-Methode mehrere voneinander getrennte Peaks, deren Natur jedoch noch nicht aufgeklärt ist. Der Norharmanpeak, dessen Identifizierung über sein spezifisches Absorptionsspektrum gelang, erschien deutlich von den anderen Extraktinhaltsstoffen getrennt, so daß auch eine sichere Quantifizierung des Norharmans in den Extrakten möglich war.

## 2.2 Ergebnisse der verschiedenen Trennmethoden

### 2.2.1 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie

Die Nährlösungen der folgenden Mikroalgen wurden nach der Extraktionsmethode mit Ethanol und Aceton extrahiert und die acetonische Oberphase dünnschichtchromatographisch untersucht. Diese Extrakte wiesen alle im unteren Teil des Chromatogramms eine mehr oder weniger deutliche Salzspur auf, die durch das Extraktionsverfahren bedingt war.

#### CYANOBAKTERIEN:

- *Anabaena flos-aquae*
- *Anabaena constricta*
- *Anabaena viguieri*
- *Microcystis* sp.
- *Nostoc carneum*
- *Nostoc commune*
- *Nostoc insulare*
- *Phormidium corium*
- *Phormidium foveolarum*
- *Oscillatoria geminata*
- *Oscillatoria nigro-viridis*
- *Synechococcus rubescens*

#### CHLOROPHYCEEN:

- *Chlamydomonas reinhardtii*
- *Chlorella vulgaris*
- *Monoraphidium braunii*
- *Tetracystis intermedium*

Aus den Nährlösungen der folgenden Mikroalgen wurden XAD-Extrakte hergestellt und dünnschichtchromatographisch untersucht:

#### CYANOBAKTERIEN:

- *Chroococcus minutus*
- *Nodularia harveyana*
- *Nodularia spumigena*
- *Spirulina laxissima*

#### CHLOROPHYCEEN:

- *Scenedesmus producto-capitatus*

Die Extrakte wurden in Methanol gelöst und in einer Konzentration von 0,05 mg bandenförmig auf HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> aufgetragen. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5) verwendet. Die Platten wurden bis zu einer Laufhöhe von 8 bis 9 cm entwickelt und anschließend unter UV-Licht bei 365 nm ausgewertet. Die angegebenen Rf-Werte stellen Durchschnittswerte dar.

#### BLINDWERTE

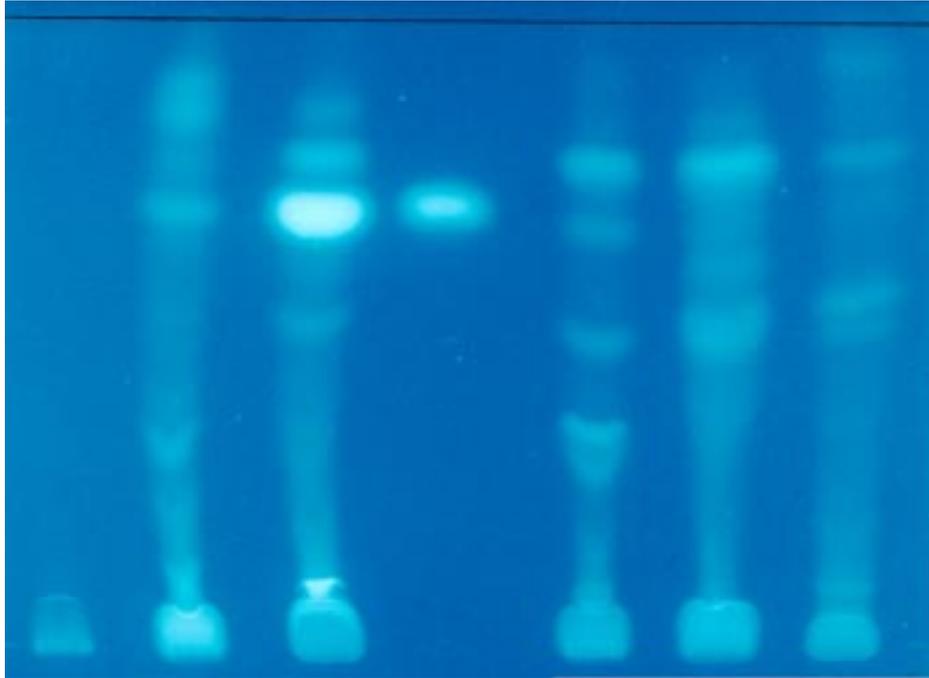
- Blindwert, hergestellt nach der Ethanol/Aceton-Methode:  
Im unteren Teil des Chromatogramms fielen drei schwache Flecken mit den Rf-Werten 0,09, 0,14 und 0,2 auf. Ein etwas stärkerer Fleck war in Höhe des Rf-Wertes 0,3 zu sehen.
- Blindwert, hergestellt nach der XAD-Methode:  
Es war nur ein sehr schwacher, leicht verwischter Fleck in Höhe der Fließmittelfront zu sehen.

#### CYANOBAKTERIEN:

- Extrakt von *Anabaena flos-aquae*:  
Der Extrakt zeigte drei deutliche gelbe Hauptflecken mit den Rf-Werten 0,74 und 0,3 sowie kurz über dem Start bei 0,1. Ein weiterer Fleck war bei dem Rf-Wert 0,84 sowie unterhalb der Fließmittelfront bei dem Rf-Wert 0,9 zu erkennen.
- Extrakt von *Anabaena constricta*:  
Es zeigten sich lediglich ein bis zwei unscharfe Substanzflecken mit den Rf-Werten 0,6 und 0,7.
- Extrakt von *Anabaena viguieri*:  
Auch dieser Extrakt zeigte nur zwei schwach ausgeprägte Substanzflecken im oberen Rf-Bereich bei Werten von 0,72 und 0,8.
- Extrakt von *Chroococcus minutus*:  
Im unteren Rf-Bereich waren mehrere bläuliche Flecken mit den Rf-Werten 0,08, 0,1, 0,15, 0,2, und 0,22 zu sehen. Auf der Höhe des Rf-Wertes 0,5 erschien ein deutlicher ebenfalls bläulich erscheinender Fleck, dem sich weiter oberhalb ein schwacher Fleck mit dem Rf-Wert 0,55 und zwei etwas deutlichere Flecken mit den Rf-Werten 0,7 und 0,78 anschlossen.

- Extrakt von *Microcystis* sp.:  
Es waren zwei Flecken im mittleren Rf-Bereich mit den Rf-Werten 0,55 und 0,64 zu sehen, ferner darüberliegend ein etwas schwächerer Fleck mit dem Rf-Wert 0,68. Kurz oberhalb des Starts war ein weiterer schwächerer Fleck mit dem Rf-Wert 0,1 zu erkennen.
- Extrakt von *Nodularia harveyana*:  
Der Extrakt wurde dominiert von einem stark hellblau erscheinenden Fleck mit dem Rf-Wert 0,25. (Dieser wurde später als das Alkaloid Norharman identifiziert.) Darunter sah man einen schwächer hellblauen Fleck mit dem Rf-Wert 0,2 sowie zwei dicht über dem Startfleck liegende leicht ineinander übergehende Flecken mit den Rf-Werten 0,08 und 0,10. Oberhalb des Norharmanflecks konnte man einen etwas schwächeren Fleck mit dem Rf-Wert von 0,5 erkennen. Weiterhin fiel ein stark gelber Fleck mit dem Rf-Wert von 0,75 auf. Zwischen diesem und einem verwischten Fleck an der Fließmittelfront (Rf-Wert 0,95) befanden sich zwei weitere leicht ineinander übergehende Flecken mit den Rf-Werten 0,8 und 0,85.
- Extrakt von *Nodularia spumigena*:  
Im unteren Rf-Bereich fiel ein deutlicher Substanzfleck mit dem Rf-Wert 0,18 auf. Dicht darunter lag ein etwas schwächerer Fleck, während sich darüber zwei Flecken mittlerer Intensität mit den Rf-Werten 0,2 und 0,25 anschlossen. Über diesen lag ein wiederum deutlicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,3.
- Extrakt von *Nostoc carneum*:  
Sehr deutlich war hier ein gelblicher Fleck mit dem Rf-Wert von 0,78 zu sehen. Dicht darunter lagen ein leicht orange erscheinender Fleck mit dem Rf-Wert von 0,69 und ein schwächerer, ebenfalls gelblicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,6. Außerdem zeigte sich ein schwacher Fleck kurz oberhalb des Starts bei 0,18.
- Extrakt von *Nostoc commune*:  
Im unteren Rf-Bereich kurz oberhalb des Starts waren zwei schwache leicht ineinander übergehende Flecken zu sehen. Deutlicher zeigten sich dagegen zwei Flecken mit den Rf-Werten 0,35 und 0,55.
- Extrakt von *Nostoc insulare*:  
Auch hier befanden sich im unteren Rf-Bereich bei 0,08 und 0,1 zwei schwache Flecken. Mit den Rf-Werten 0,2 und 0,35 waren zwei deutliche bläuliche Flecken zu erkennen, wobei unterhalb des ersten noch ein weiterer schwacher Substanzfleck zu sehen war. Auch unterhalb der Fließmittelfront (Rf-Wert 0,97) zeigte sich noch ein schwacher Fleck.

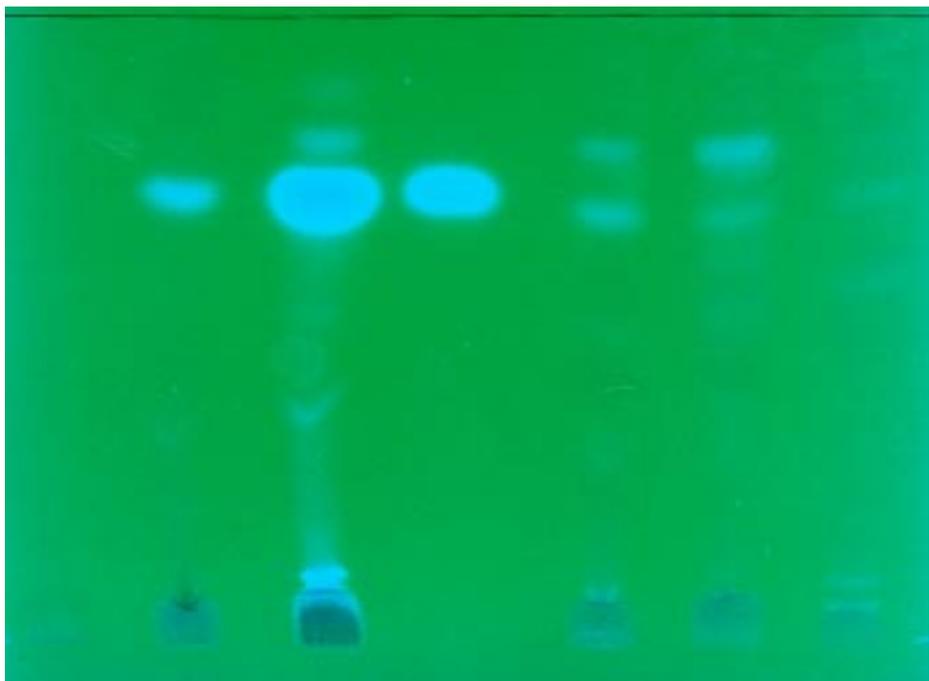
- Extrakt von *Phormidium corium*:  
Hier zeigten sich lediglich zwei schwache Substanzflecken mit den Rf-Werten 0,18 und 0,4.
- Extrakt von *Phormidium foveolarum*:  
Im unteren Rf-Bereich befand sich ein schwacher Substanzfleck mit dem Rf-Wert 0,15. Ebenfalls nur schwach ausgeprägt waren die beiden Flecken weiter oberhalb mit den Rf-Werten 0,45 und 0,6.
- Extrakt von *Oscillatoria geminata*:  
In diesem Extrakt war ein deutlich gelber Fleck mit dem Rf-Wert 0,71 zu erkennen, außerdem ein schwacher gelblicher Fleck direkt unterhalb der Fließmittelfront.
- Extrakt von *Oscillatoria nigro-viridis*:  
Ein schwach ausgeprägter Substanzfleck zeigte sich bei einem Rf-Wert von 0,6.
- Extrakt von *Spirulina laxissima*:  
Auffällig war ein bläulicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,3 sowie ein stark gelber Fleck mit dem Rf-Wert 0,75. Oberhalb des Starts befanden sich zwei dicht aufeinander folgende Flecken mit den Rf-Werten 0,12 und 0,15. Außerdem konnte man einen verwischten Fleck an der Fließmittelfront mit dem Rf-Wert 0,95 erkennen.
- Extrakt von *Synechococcus rubescens*:  
Im oberen Rf-Bereich befanden sich drei schwache, teilweise ineinander übergehende Substanzflecken mit den Rf-Werten 0,65, 0,7 und 0,8.



**Abb. 2.2.1**

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Mikroalgen-Nährlösungsextrakten; von links nach rechts: Blindwert (hergestellt nach XAD-Methode), Extrakte von *Chroococcus minutus* und *Nodularia harveyana*, Norharmanreferenzsubstanz, Extrakte von *Nodularia spumigena*, *Scenedesmus producto-capitatus* und *Nostoc insulare*.

Aufnahme der DC unter UV<sub>365</sub>. Fließmittel Ethylacetat/Methanol/Wasser (100:16,5:13,5)



**Abb. 2.2.2**

Dieselbe DC-Platte wie in Abb. 2.2.1, aufgenommen unter UV<sub>254</sub>.

CHLOROPHYCEEN:

- Extrakt von *Chlamydomonas reinhardtii*:  
Auffällig war hier der hellblaue Fleck mit dem Rf-Wert 0,25. Unterhalb davon befanden sich drei weitere etwas schwächer hellblau erscheinende Flecken mit den Rf-Werten 0,1, 0,15 und 0,18. Im oberen Rf-Bereich war ein schwacher gelblicher Fleck mit dem Rf-Wert von 0,78 zu erkennen.
- Extrakt von *Chlorella vulgaris*:  
Hier wurde ein Fleck im mittleren Rf-Bereich mit dem Wert 0,35 sichtbar sowie zwei weiter oben liegende ebenfalls wenig ausgeprägte Flecken mit den Rf-Werten 0,65 und 0,75. Außerdem zeigte sich ein unscharfer Fleck nahe der Fließmittelfront bei dem Rf-Wert 0,98.
- Extrakt von *Monoraphidium braunii*:  
Dieser Extrakt wies vier bis fünf schwache Flecken im unteren Rf-Bereich von 0,12 bis 0,22 auf sowie einen unscharfen Fleck nahe der Fließmittelfront bei dem Rf-Wert 0,98.
- Extrakt von *Scenedesmus producto-capitatus*:  
Kurz oberhalb des Starts war ein nur schwacher Fleck sichtbar. Auffälliger waren zwei aufeinander folgende Flecken mit den Rf-Werten 0,3 und 0,37 sowie ein Fleck gleicher Intensität mit dem Rf-Wert 0,52. Kurz unterhalb der Fließmittelfront erschien ein weiterer schwacher Fleck.
- Extrakt von *Tetracystis intermedium*:  
Im unteren Rf-Bereich waren zwei deutliche Flecken mit den Rf-Werten 0,15 und 0,3 zu sehen. Dazwischen befand sich ein etwas schwächerer Fleck mit dem Rf-Wert 0,23. Oberhalb davon war ein etwas hellerer Fleck mit dem Rf-Wert 0,6 zu erkennen sowie ein unscharfer Fleck nahe der Fließmittelfront mit dem Rf-Wert 0,99.

*Zusammenfassung*

Die Nährlösungsextrakte der verschiedenen Mikroalgen wiesen durchschnittlich vier bis fünf Substanzflecken auf. Wenige und nur schwache Substanzflecken zeigten die Extrakte von *Anabaena constricta*, *Anabaena viguieri*, *Phormidium corium* und *Phormidium foveolarum*. Auch die Extrakte von *Oscillatoria geminata*, *Oscillatoria nigro-viridis* und *Synechococcus rubescens* zeigten wenig Auffälligkeiten, da jeweils nur ein bis drei schwache Flecken zu

erkennen waren.

Eine komplexe Zusammensetzung dagegen besaßen vor allem die Extrakte von *Nodularia harveyana* und *Chroococcus minutus*. Beide wiesen jeweils neun Substanzflecken auf, wobei in dem Extrakt von *Nodularia harveyana* die Intensität der Flecken deutlicher war. Der bei dem Rf-Wert von 0,2 hellblau erscheinende Substanzfleck im Extrakt von *Nodularia harveyana* zeigte die stärkste Intensität aller Substanzflecken insgesamt.

Es fiel auf, daß fast alle Extrakte einen etwas schwächeren Fleck knapp unterhalb der Fließmittelgrenze aufwiesen. Da dieser Fleck auch bei dem Blindwert, der mittels XAD-Extraktion gewonnen wurde, zu sehen war, liegt die Vermutung nahe, daß es sich um keinen echten Substanzfleck handelt, sondern um ein Produkt aus dem XAD-Harz. Eine weitere Gemeinsamkeit vieler Extrakte war ein gelblich erscheinender Substanzfleck um den Rf-Wert 0,7 bis 0,8.

### 2.2.2 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit chemischen Nachweisreagenzien

Untersucht wurde die acetonische Oberphase aus der Extraktionsmethode mit Ethanol und Aceton von folgenden Mikroalgen: *Anabaena flos-aqua*, *Nostoc carneum*, *Microcystis* sp., *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*. Nach dem Betrachten der dünn-schicht-chromatographisch aufgetrennten Extrakte unter UV-Licht wurden verschiedene Sprühreagenzien eingesetzt, die erste Hinweise auf die Art der enthaltenen Verbindungen geben sollten.

Verwendet wurden Dragendorffs Reagenz zum Nachweis von Alkaloiden und stickstoffhaltigen Verbindungen, Ninhydrin-Reagenz zum Nachweis von Aminosäuren, Aminen und Aminoszuckern,  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Reagenz zum Nachweis von reduzierenden Verbindungen und Orcin-Reagenz zum Nachweis von Pentosen.

- Dragendorffs Reagenz:

Eine deutliche positive Reaktion zeigte der unter UV-Licht intensiv hellblau fluoreszierende Substanzfleck im Extrakt von *Nodularia harveyana*. Eine schwächere positive Dragendorff-Reaktion zeigte der Extrakt von *Microcystis* sp., die allerdings keinem Substanzfleck zugeordnet werden konnte, da die Färbung sich über die gesamte Laufstrecke verteilte. Die Extrakte von *Anabaena flos-aqua*, *Nostoc carneum*, und *Spirulina laxissima* zeigten keine Reaktion.

- Ninhydrin-Reagenz:

Lediglich die Extrakte von *Nodularia harveyana* und von *Microcystis* sp. zeigten eine schwache positive Reaktion, die bei beiden Extrakten einer oder mehreren Verbindungen zugeschrieben werden konnte, die sich im unteren Rf-Bereich knapp oberhalb der Salzsäure befanden. Die Extrakte von *Anabaena flos-aqua*, *Nostoc carneum*, und *Spirulina laxissima* zeigten keine Reaktion.

- $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  -Reagenz:

Bei den Extrakten von *Anabaena flos-aqua*, *Nostoc carneum*, und *Spirulina laxissima* zeigte sich eine positive Reaktion der Substanzflecken direkt unterhalb der Fließmittelfront. Die Extrakte von *Nodularia harveyana* und von *Microcystis* sp. wiesen ebenfalls eine schwache positive Reaktion auf, die sich bei beiden über die gesamte Laufstrecke zog.

- Orcin-Reagenz:

Alle fünf Extrakte reagierten positiv, wobei sich sämtliche Substanzflecken, die vorher nur unter UV-Licht sichtbar waren, anfärbten.

### Zusammenfassung

Die Detektion mit den verwendeten chemischen Nachweisreagenzien lieferte als wichtigste Aussage den deutlich positiven Alkaloidnachweis mit Dragendorffs Reagenz des hellblau erscheinenden Flecks mit dem Rf-Wert 0,25 im Extrakt von *Nodularia harveyana*. Der bei vielen Extrakten knapp unterhalb der Fließmittelfront auftretende Fleck erbrachte einen positiven Nachweis auf reduzierende Verbindungen. Auffällig war weiterhin der sämtliche Substanzflecken betreffende positive Ausfall der Reaktion mit Orcin-Reagenz. Dagegen fiel der Nachweis von Aminosäuren, Aminen und Aminosukzern mit Ninhydrin-Reagenz bei allen Extrakten entweder negativ oder so schwach aus, daß sich keine Aussage machen ließ.

### 2.2.3 Ergebnisse von HPLC und Dünnschichtchromatographie im Vergleich

Um die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Nährlösungsextrakte mit deren Auftrennung mittels HPLC zu vergleichen, wurden die XAD-Extrakte folgender Kulturen untersucht: *Nodularia harveyana*, *Spirulina laxissima* und eine Mischkultur, die durch Beimpfen der Nährlösung mit *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* zu gleichen Teilen entstand. Diese Mischkultur wurde angesetzt, um zu überprüfen, inwieweit der Norharmangehalt in den Kulturen von *Nodularia harveyana* durch die Gegenwart eines anderen Cyanobakteriums beeinflusst wurde (siehe Kapitel 5 des Ergebnisteils). Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung wurden zwei verschiedene Fließmittel verwendet, zum einen Ethylacetat, Methanol und Wasser (100:16,5:13,5) und zum anderen Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5).

#### 1. Dünnschichtchromatographie mit Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser

- Extrakt von *Nodularia harveyana*:

Dicht über dem Start lagen zwei leicht ineinander übergehende Flecken mit den Rf-Werten 0,08 und 0,10. Darüber sah man einen schwächer hellblauen Fleck bei Rf-Wert 0,2. Es folgte der dominierende stark hellblau erscheinenden Fleck mit dem Rf-Wert 0,25. Oberhalb dieses Substanzflecks konnte man einen etwas schwächeren Fleck mit dem Rf-Wert von 0,5 erkennen. Weiterhin fiel ein stark gelber Fleck mit dem Rf-Wert von 0,75 auf. Zwischen diesem und einem verwischten Fleck an der Fließmittelfront (Rf-Wert 0,95) befanden sich zwei weitere leicht ineinander übergehende Flecken mit den Rf-Werten 0,8 und 0,85.

- Extrakt von *Spirulina laxissima*:

Oberhalb des Starts befanden sich zwei dicht aufeinander folgende Flecken mit den Rf-Werten 0,12 und 0,15. Auffällig war ein bläulicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,3 sowie ein stark gelber Fleck mit dem Rf-Wert von 0,75, der sich auch in dem Extrakt von *Nodularia harveyana* befand. Außerdem konnte man einen verwischten Fleck an der Fließmittelfront mit dem Rf-Wert 0,95 erkennen.

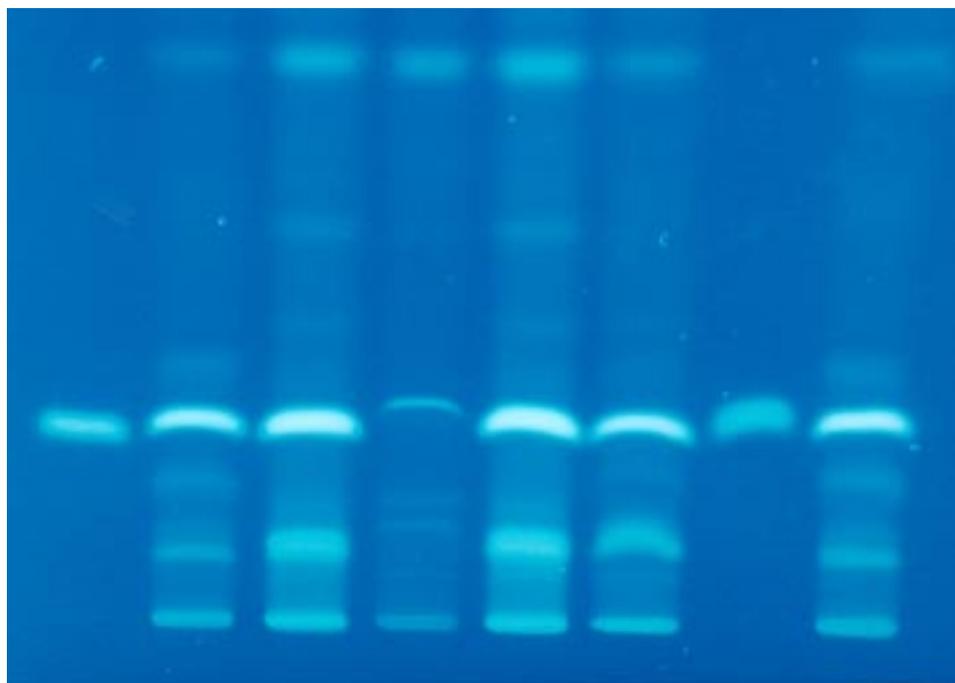
- Extrakt der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*:  
Der obere Teil des Chromatogramms entsprach dem des Extrakts von *Nodularia harveyana*, einschließlich des dominierenden hellblau erscheinenden Flecks mit dem Rf-Wert 0,2. Abweichend gestaltete sich der untere Rf-Bereich: Hier erschienen die beiden dicht aufeinander folgenden Flecken mit den Rf-Werten 0,12 und 0,15, die auch in dem Extrakt von *Spirulina laxissima* zu sehen waren. Dicht darunter fand sich außerdem ein auffälliger Substanzfleck mit dem Rf-Wert 0,1, der so weder im Extrakt von *Nodularia harveyana* noch bei *Spirulina laxissima* erschien.

## 2. Dünnschichtchromatographie mit Ethylacetat, Methanol und Wasser

- Extrakt von *Nodularia harveyana*:  
Bis zur Höhe des Rf-Werts von 0,3 zog sich das Tailing der drei aufeinanderfolgenden Substanzflecken im unteren Teil des Chromatogramms mit den Rf-Werten 0,2, 0,24 und 0,28. Darüber befand sich ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,35, bevor sich der stark ausgeprägte hellblau erscheinende Hauptfleck anschloß. Dicht darüber folgte ein gelblicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,54 sowie zwei schwache Flecken (Rf-Werte 0,51 und 0,6) unterhalb der Fließmittelfront.
- Extrakt von *Spirulina laxissima*:  
Auch hier wiesen die Substanzflecken im unteren Rf-Bereich ein Tailing auf, das sich bis zur Höhe des ersten Flecks mit dem Rf-Wert 0,13 erstreckte. Es schlossen sich zwei weitere Flecken mit den Rf-Werten 0,17 und 0,25 an. Darüber befand sich ein schmaler bläulicher Fleck, gefolgt von einem gelblicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,54, der ebenfalls auch in dem Extrakt von *Nodularia harveyana* zu sehen war.
- Extrakt der Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*:  
Das Chromatogramm der Mischkultur entsprach auch hier in weiten Bereichen ab dem Fleck mit dem Rf-Wert 0,32 dem des Extrakts von *Nodularia harveyana*. Ein Substanzfleck mit dem Rf-Wert 0,42 war auch hier zusätzlich zu sehen, allerdings knapp unterhalb des hellblau erscheinenden Hauptflecks. Im unteren Rf-Bereich befand sich lediglich ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,25 samt Tailing, der auch in dem Extrakt von *Spirulina laxissima* zu erkennen war.

*Vergleich der beiden dünnenschichtchromatographischen Trennungen 1. und 2.*

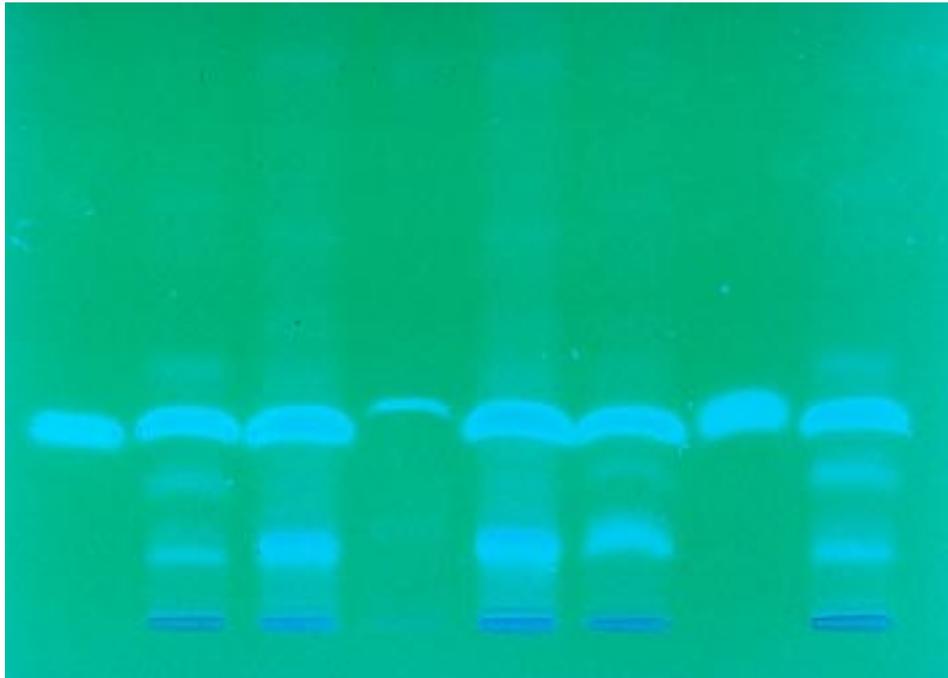
Die Anzahl und Intensität der Substanzflecken in den drei Nährlösungsextrakten blieb gleich - der Extrakt von *Nodularia harveyana* zeigte neun, der Extrakt von *Spirulina laxissima* wies fünf Flecken auf. Allerdings änderte sich die Reihenfolge der Flecken. Allen drei Extrakten gemeinsam war der gelbliche Fleck mit dem Rf-Wert von 0,75 mit dem Fließmittel Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser, beziehungsweise mit dem Rf-Wert von 0,54 mit dem Fließmittel Ethylacetat, Methanol und Wasser. Der Extrakt von der Mischkultur ähnelte in seinem chromatographischen Bild überwiegend dem Extrakt von *Nodularia harveyana*, vor allem in den oberen Rf-Bereichen. Auffällig war auch hier der zusätzliche blau erscheinende Fleck mit dem Rf-Wert von 0,1 mit dem Fließmittel Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser, beziehungsweise mit dem Rf-Wert von 0,42 bei Benutzung des Fließmittels Ethylacetat, Methanol und Wasser, der weder in dem Chromatogramm von *Nodularia harveyana* noch in dem von *Spirulina laxissima* erschien.



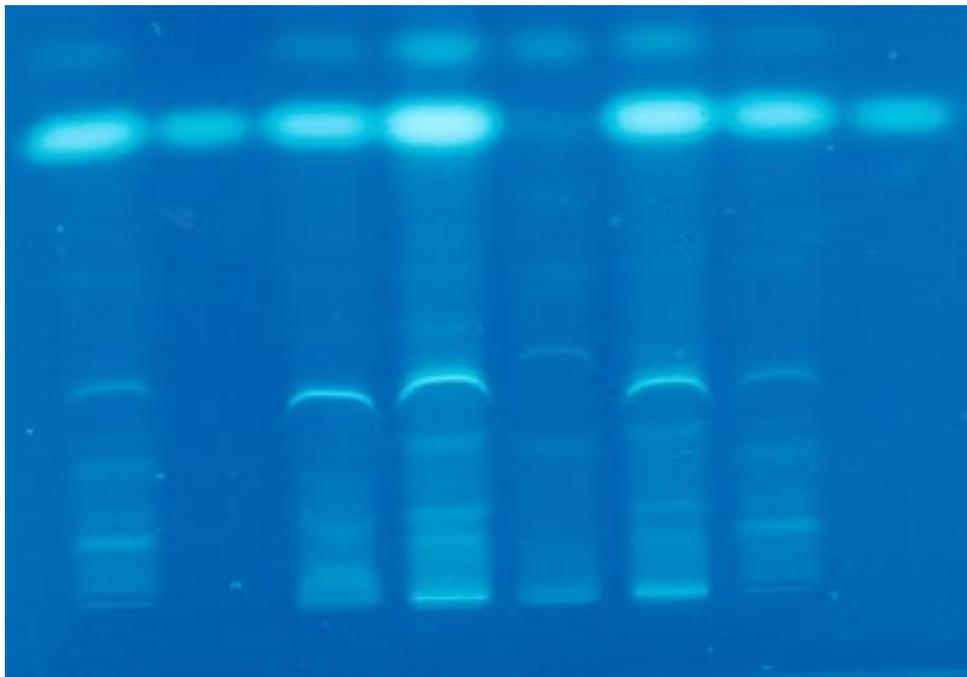
**Abb. 2.2.3.1**

Dünnenschichtchromatographische Auftrennung von Mikroalgen-Nährlösungsextrakten. Von rechts nach links: Norharmanreferenzsubstanz, Extrakte von *Nodularia harveyana*, Mischkultur, *Spirulina laxissima*, Mischkultur, *Nodularia harveyana*, Norharmanreferenzsubstanz, *Nodularia harveyana*.

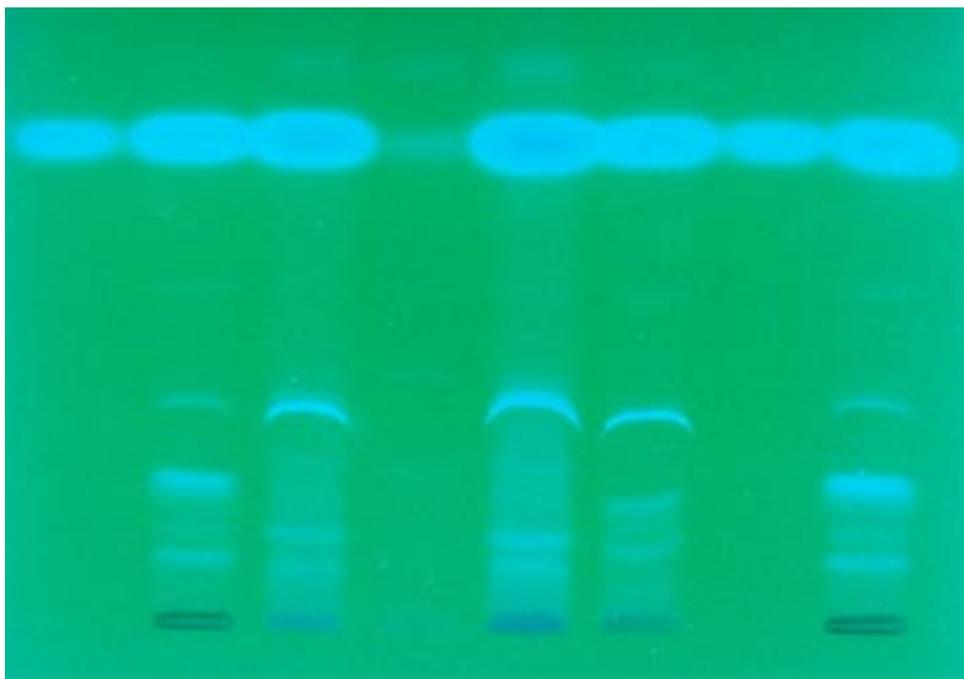
Aufnahme der DC unter UV<sub>365</sub>. Fließmittel Ethylacetat/Ameisensäure/Wasser (100:10:5).



**Abb. 2.2.3.2**  
Dieselbe DC-Platte wie in Abb. 2.2.3.1, aufgenommen unter UV<sub>254</sub>.



**Abb. 2.2.3.3**  
Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Mikroalgen-Nährlösungsextrakten aus Abb. 2.2.3.1. Aufnahme der DC unter UV<sub>365</sub>.  
Fließmittel Ethylacetat/Methanol/Wasser (100:16,5:13,5).



**Abb. 2.2.3.4**  
Dieselbe DC-Platte wie in Abb. 2.2.3.3, aufgenommen unter UV<sub>254</sub>.

### 3. HPLC

Die HPLC wurde mit einer RP-8 Säule und einem Fließmittel aus wäßriger Natriumheptansulfonatlösung (pH-Wert 3,2) und Acetonitril durchgeführt. Die Flußrate betrug  $1\text{ ml min}^{-1}$  und die Detektion erfolgte bei UV<sub>254</sub>. Die Retentionszeiten sind Durchschnittswerte und in Minuten angegeben.

- Extrakt von *Nodularia harveyana*:

Bis zur Retentionszeit von 2,3 bis 4,4 trat ein ungetrennter Peakhaufen auf, aus dem zwei deutliche Peaks bei 3,0 und 3,3 herausragten. Es folgten zwei gut getrennte Peaks bei 5 und 6, bevor der Hauptpeak von Norharman bei 8 erschien, gefolgt von einem kleineren Peak bei 9. Bei 13,5 sah man einen kleineren Peak. Das Chromatogramm endete mit einem deutlichen Peak bei 17. Oft trat noch ein Signal um 25 auf, das aber meistens zu gering war, um noch integriert zu werden.

- Extrakt von *Spirulina laxissima*:

Auch hier trat bis zur Retentionszeit von 2,3 bis 4,4 ein ungetrennter Peakhaufen auf, allerdings ohne die beiden herausragenden Peaks. Es folgten zwei kleinere Peaks um 4,6 und ein größerer bei 5,7. Bei 6 und 7 erschienen wieder zwei gut getrennte Peaks, dann ein

einzelner Peak bei 11. Auch hier konnte man bei 13,5 einen kleineren Peak erkennen, bevor das Chromatogramm mit dem letzten deutlichen Peak bei 17 endete.

- Extrakt der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*:  
Das Chromatogramm enthielt alle bei dem Extrakt von *Nodularia harveyana* beschriebenen Peaks und unterschied sich davon lediglich durch einen kleinen zusätzlichen Peak bei 7,7. Gelegentlich trat das Signal um 25 stärker auf, so daß es integriert wurde.

#### *Vergleich der HPLC mit den beiden Dünnschichtchromatographie-Methoden*

Die mit Hilfe der HPLC erhaltenen Chromatogramme bestätigten das Bild, das anhand der beiden Dünnschichtchromatographie-Methoden (siehe 1. und 2.) gewonnen worden war:

Im Vergleich der drei Extrakte untereinander wurde deutlich, daß der Extrakt der Mischkultur vor allem dem Extrakt von *Nodularia harveyana* glich. Beide Chromatogramme, sowohl das dünnschichtchromatographische als auch das der HPLC, wiesen interessanterweise daneben einen zusätzlichen Substanzfleck beziehungsweise Peak auf.

Eine eindeutige Zuordnung der dünnschichtchromatographischen Substanzflecken zu den Peaks war schwierig, weil die Verhältnisse der DC sich nicht ohne weiteres auf die HPLC übertragen lassen. Eine grobe Zuordnung war dennoch möglich, wenn man sich klarmacht, daß die dünnschichtchromatographischen Substanzflecken mit niedrigen Rf-Werten eher polare Eigenschaften hatten und dementsprechend auch im Chromatogramm der HPLC niedrigere Retentionszeiten aufwiesen, da sie mit der unpolaren Säule keine starken Wechselwirkungen eingingen. Außerdem stand mit dem Norharman, welches eindeutig sowohl in der Dünnschichtchromatographie als auch in der HPLC lokalisiert werden konnte, ein verlässlicher innerer Standard zur Verfügung.

Zur Vereinfachung beziehen sich die folgenden Überlegungen auf die DC mit dem Fließmittel Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser.

- Der auf der DC-Platte erscheinende Hauptschubstanzfleck mit dem Rf-Wert 0,2 (Norharman) entsprach dem bei der HPLC aufgetretenden Hauptpeak bei 8.
- Das Signal um 25, das bei der Mischkultur gelegentlich stärker auftrat, könnte durch den verwischten Substanzfleck an der Fließmittelfront verursacht worden sein.
- Der deutliche Peak bei 17, der bei allen drei Extrakten auftrat, könnte der gelb

erscheinende Fleck mit dem Rf-Wert 0,75 gewesen sein, den ebenfalls alle drei Extrakte aufwiesen.

- Der kleinere Peak bei 13,5 könnte der schwache Substanzfleck mit dem Rf-Wert 0,5 im Extrakt von *Nodularia harveyana* gewesen sein.
- Die beiden deutlichen Peaks bei 5 und 6 könnten den beiden Substanzflecken mit den Rf-Werten 0,08 und 0,10 im Extrakt von *Nodularia harveyana* entsprechen.
- Der Peak kurz nach dem Norharmanpeak bei 9 entsprach möglicherweise dem kurz vor dem Norharmanfleck liegende Substanzfleck mit dem Rf-Wert von 0,2, ebenfalls im Extrakt von *Nodularia harveyana*.
- Der bei 11 aufgetretende Peak im Extrakt von *Spirulina laxissima* könnte der Substanzfleck mit dem Rf-Wert von 0,3 gewesen sein, da er sowohl auf der DC-Platte als auch im HPLC-Lauf nach dem Norharmanfleck bzw -peak im Extrakt von *Nodularia harveyana* zu erkennen war.
- Die Peaks mit den niedrigen Retentionszeiten entsprachen den Substanzflecken im unteren Rf-Bereich, wobei eine genaue Zuordnung nicht möglich war. Diese Substanzen schienen sich bezüglich ihrer Polarität so sehr zu ähneln, daß bereits die veränderte Fließmittelzusammensetzung die dünnenschichtchromatographischen Reihenfolge der Substanzen veränderte. Deswegen war deren Reihenfolge aus dem HPLC-Chromatogramm nicht eindeutig ersichtlich.

### 2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die chromatographischen Untersuchungen machten den komplexen Inhalt der Nährlösungsextrakte deutlich. Es fiel auf, daß die untersuchten Extrakte ein ausgesprochen uneinheitliches Bild zeigten. Die Anzahl der ausgeschiedenen Verbindungen variierte von eins bis neun, und die vorhandenen Rf-Werte reichten vom Start bis zur Fließmittelgrenze. Es stellte sich nun die Frage, ob die ausgeschiedenen Metaboliten nach Anzahl und Art mit den taxonomischen Verwandtschaften der untersuchten Mikroalgen korrelierten.

Cyanobakterien lassen sich, wie in Tabelle 2.3.1 zu sehen, in die beiden Unterklassen der ein- oder wenigzelligen kugeligen Coccogoneae und der fädigen Hormogoneae einteilen, zu denen wiederum verschiedene Ordnungen gehören. Die hier untersuchten Grünalgen lassen sich, wie aus Tabelle 2.3.2 zu entnehmen, hauptsächlich zwei Ordnungen zuteilen: den Volvocales und

den Chlorococcales.

Cyanobakterien: Beim Vergleich der dünn-schicht-chromatographischen Erscheinungsbilder der zu den Chroococcales zählenden *Synechococcus rubescens*, *Chroococcus minutus* und *Microcystis* sp. fiel vor allem der Extrakt von *Chroococcus minutus* heraus, da dieser deutlich mehr Substanzflecken aufwies als die beiden anderen, die jeweils nur drei bis vier schwache Flecken hauptsächlich im oberen Rf-Bereich Bereich zeigten.

Bei den Oscillatoriales waren selbst zwischen den Arten untereinander kaum Übereinstimmungen zu beobachten: Zwar wiesen beide *Oscillatoria*- und *Phormidium*-Arten nur wenige und eher schwache Substanzflecken auf, diese aber in unterschiedlicher Anzahl und mit unterschiedlichen Rf-Werten. Der Extrakt von *Spirulina laxissima* fiel aufgrund seiner deutlich höheren Anzahl an Substanzflecken völlig aus der Reihe.

**Tab. 2.3.1** Taxonomische Einteilung der hier untersuchten Cyanobakterien

| Unterklasse | Coclogoneae  | Hormogoneae  |  |
|-------------|--|--|--|
| Ordnung     | Chroococcales  | Oscillatoriales  | Nostocales   |
|             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Synechococcus rubescens</i></li> <li>• <i>Chroococcus minutus</i></li> <li>• <i>Microcystis</i> sp.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Oscillatoria geminata</i></li> <li>• <i>Oscillatoria nigroviridis</i></li> <li>• <i>Phormidium foveolarum</i></li> <li>• <i>Phormidium corium</i></li> <li>• <i>Spirulina laxissima</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Anabaena flos-aquae</i></li> <li>• <i>Anabaena constricta</i></li> <li>• <i>Anabaena viguieri</i></li> <li>• <i>Nostoc carneum</i></li> <li>• <i>Nostoc commune</i></li> <li>• <i>Nostoc insulare</i></li> <li>• <i>Nodularia harveyana</i></li> <li>• <i>Nodularia spumigena</i></li> </ul> |

**Tab. 2.3.2** Taxonomische Einteilung der hier untersuchten Chlorophyceen

| Ordnung | Volvocales   | Chlorococcales  | weitere Ordnungen  |
|---------|--|---|--|
|         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chlorella vulgaris</i></li> <li>• <i>Scenedesmus productocapitatus</i></li> <li>• <i>Monoraphidium braunii</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Tetracystis intermedium</i></li> </ul> |

Auch bei den Nostocales bestätigten sich diese Beobachtungen. Die Extrakte von *Anabaena constricta* und *Anabaena viguieri* besaßen zwar insofern eine gewisse Ähnlichkeit miteinander, als beide lediglich zwei schwache Substanzflecken im oberen Rf-Bereich zeigten. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Extraktes von *Anabaena flos-aquae* bot jedoch ein völlig anderes Bild. Die beiden *Nodularia* sp. wiesen ebenfalls keine Flecken mit gleichen Rf-Werten und gleichen Intensitäten auf. Eine Gemeinsamkeit besaßen die Extrakte der *Nostoc* sp.: Alle drei zeigten im unteren Rf-Bereich ein bis zwei schwache Substanzflecken, während die Flecken mit den höheren Rf-Werten deutlicher zu sehen waren. Allerdings endeten damit die Gemeinsamkeiten, da der Extrakt von *Nostoc insulare* deutlich mehr Flecken aufwies als die anderen beiden, die sich wiederum bezüglich der Farben der Substanzflecken stark unterschieden. Auch zwischen den Extrakten aller Nostocales waren keine Gemeinsamkeiten zu erkennen.

Chlorophyceae: Auch bei den Grünalgen sahen die Extrakte der zu der gleichen Ordnung der Chlorococcales zählenden Arten *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus producto-capitatus* und *Monoraphidium braunii* nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung völlig unterschiedlich aus. Man konnte anhand der Dünnschichtchromatogramme auch nicht erkennen, ob es sich um Extrakte von Cyanobakterien oder von Chlorophyteen handelte.

Da praktisch keine Übereinstimmungen hinsichtlich der Zusammensetzung der in die Nährlösung ausgeschiedenen Metaboliten zwischen Mikroalgen einer Ordnung zu erkennen waren, konnte man aus den Nährlösungsextrakten keine Rückschlüsse auf die botanische Verwandtschaft des betreffenden Organismus ziehen.

Verschiedene Beobachtungen lassen Rückschlüsse auf den Charakter der in den Nährlösungen enthaltenen Verbindungen zu:

Es handelte sich zunächst einmal um Substanzen mit einem sehr ähnlichem Grad an Polarität beziehungsweise Hydrophilie. Daraus waren auch die Schwierigkeiten, die Substanzen völlig voneinander zu trennen, zu erklären, was vor allem bei der Säulenchromatographie deutlich wurde.

Die Detektion der Substanzen erfolgte am besten unter UV-Licht bei 254 nm und 365 nm. Alle Verbindungen, die Licht der Wellenlänge 254 nm absorbieren, müssen Chromophore entweder nur aus  $\pi$ -Elektronen oder aus  $\pi$ - und n-Elektronen besitzen. Zu ersteren gehören Alkene, Alkine und alle aromatischen Verbindungen, während unter die letztgenannten Carbonylverbindungen und heterocyclische Verbindungen fallen. Auffällig war, daß die

meisten Substanzen unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm fluoreszierten, was auf starre und planare Moleküle mit anregbaren  $\pi$ -Elektronensystemen, wie aromatische Systeme, Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen, Carbonylverbindungen und kondensierte Heterocyclen hinwies. Es läßt sich also vermuten, daß es sich bei der Mehrzahl der Verbindungen um aromatische Systeme handelte, deren Hydrophilie entweder durch Substitution mit Hydroxyl- oder Carbonylresten oder durch die Fähigkeit zur Salzbildung durch Protonierung zustande kam.

Die Detektion der Substanzen mit chemischen Nachweisreagenzien erwies sich als nur bedingt aussagekräftig, weil die Reaktionen meistens nur sehr schwach waren. Auffallend war lediglich der positive Alkaloidnachweis der hellblau fluoreszierenden Substanz (Norharman) im Extrakt von *Nodularia harveyana* mit Dragendorffs Reagenz, was zur Isolierung und Struktur-aufklärung dieser Verbindung führte. Auffallend war weiterhin die durchgehend positive Reaktion auf das Orcin-Reagenz bei allen Extrakten. Bei diesem Reagenz (auch Bials-Reagenz genannt), handelt es sich um 3,5-Dihydroxy-Toluol-Monohydrat, welches mit Pentosen, Lignin, Saccharose, Arabinose und  $\beta$ -Amylase farbige Reaktionsprodukte ergibt. Über den genauen Wirkmechanismus scheint wenig bekannt zu sein. Möglicherweise geht Orcin dabei oxidative Phenolkupplungen zu einem farbigen Komplex ein, wie zum Beispiel in dem Flechtenfarbstoff Orcein. Voraussetzung sind anscheinend eine gewisse Mindestanzahl von Hydroxylgruppen, was auch wieder die hydrophile Natur der Verbindungen in den Nährlösungsextrakten erklären würde. Das Orcin-Reagenz ist daher wenig spezifisch, kann aber gut dazu genutzt werden, die Substanzen unter Tageslicht überhaupt sichtbar zu machen. Um weitere Informationen über die Natur der Verbindungen in den Nährlösungen zu erhalten, könnte man die HPLC mit einem massenspektroskopischen Detektor koppeln, der Auskunft über die Molekulargewichte geben kann. Zu diesem Zweck müßte man allerdings ein anderes Fließmittel einsetzen, da es nicht ionisch sein darf und flüchtig sein muß.

Eine weitere Besonderheit, die bei der Untersuchung des Extrakts aus der Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* aufgefallen war, war das Auftreten eines zusätzlichen Substanzflecks, der weder bei der dünn-schichtchromatischen Auftrennung des Extrakts von *Nodularia harveyana* noch von *Spirulina laxissima* zu sehen war. Bei der Benutzung des Fließmittels Ethylacetat, Ameisensäure, Wasser besaß er einen R<sub>f</sub>-Wert von 0,1, während er bei Verwendung des Fließmittels Ethylacetat, Methanol, Wasser einen R<sub>f</sub>-Wert von 0,42 aufwies. Diese Beobachtung wiederholte sich im HPLC-Chromatogramm des Extrakts aus der Mischkultur: Es trat ein zusätzlicher Peak nach 7,7 Minuten auf, der weder

im HPLC-Chromatogramm des Extrakts von *Nodularia harveyana* noch von *Spirulina laxissima* zu sehen war. Es schien sich um eine im Vergleich zu Norharman polarere Verbindung zu handeln, da sie sowohl niedrigere Rf-Werte als auch eine kürzere Retentionszeit als das Alkaloid aufwies. Da diese zusätzliche Substanz in den beiden Reinkulturen von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* nicht zu finden war, wurde sie vermutlich erst in Gegenwart beider Cyanobakterien gebildet, wobei unklar blieb, ob *Nodularia harveyana* oder *Spirulina laxissima* dafür verantwortlich war. Möglicherweise ging von dieser zusätzliche Komponente die artemientoxische Wirkung aus, die im Kapitel 3.2 des Ergebnisteils diskutiert wird. Ihre chemische Identität konnte noch nicht aufgeklärt werden.

### 3 Wirksamkeit der Extrakte

#### 3.1 Wachstumsinhibitoren gegen Cyanobakterien

Auf die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von Verbindungen aus den Nährlösungen verschiedener Mikroalgen wurde bereits in der Einleitung eingegangen. Hier sollte nun speziell die Wirkung beziehungsweise Toxizität solcher Substanzen auf andere Cyanobakterien getestet werden, um zu sehen, ob sich in den Nährlösungsextrakten Verbindungen mit algizider Wirkung befanden.

Bereits in den 70er-Jahren hatten HARRIS (1971) und KEATING (1978) gezeigt, daß einige Mikroalgen - Cyanobakterien und Grünalgen - Metaboliten produzieren, die das Wachstum anderer Cyanobakterien hemmen. Durch das Ausscheiden solcher Wachstumsinhibitoren verschaffen sich die Organismen offenbar Vorteile beim Konkurrieren um wachstums-limitierende Faktoren wie Licht und Nährstoffe (SCHLEGEL et al.,1999). Weitere Untersuchungen bestätigten die Existenz von Wachstumsinhibitoren, die sich sowohl intra- als auch extrazellulär finden. So produziert das Cyanobakterium *Hapalosiphon fontinalis* extrazelluläre Substanzen, sogenannte Hapalindole, die vor allem das Wachstum von *Anabaena* sp. hemmen (MOORE et al.,1984). Das Cyanobakterium *Phormidium tenue* ist in der Lage, Hemmstoffe gegen das eigene Wachstum zu bilden (YAMADA et al.,1993). Dabei handelt es sich um ein Gemisch von ungesättigten Fettsäuren, welches aus der filtrierten Kultur gewonnen wurde.

Neuere Studien zeigten die chemische Vielfalt von natürlich vorkommenden Algiziden. Aus *Scytonema hofmannii* wurde Cyanobacterin isoliert, ein chlorhaltiges  $\gamma$ -Lacton (GLEASON et al.,1986), sowie ein weiteres Algizid, welches in geringerer Konzentration enthalten ist und ein Hydroxyl-Analoges zu Cyanobacterin darstellt (LEE & GLEASON,1994). Das Cyanobakterium *Fischerella muscicola* produziert die beiden Algizide Fischerellin A (GROSS et al.,1991) und Fischerellin B (PAPKE et al.,1997). Fischerellin A hemmt das Wachstum sowohl von Cyanobakterien als auch - in geringerem Ausmaß - von Grünalgen, indem es am Photosynthesystem II angreift. Fischerellin B ist in geringerer Konzentration enthalten und stellt ebenso wie Fischerellin A einen Pyrrolidinabkömmling mit einer mehrfach ungesättigten Seitenkette dar.

Eine andere Substanz, die das Wachstum von Cyanobakterien hemmt, wurde in *Oscillatoria late-virens* gefunden (BAGHI,1995). Diese Verbindung enthält in ihrer Strukturformel wahrscheinlich einen Phenolring und einen gesättigten Fettsäurerest. In *Nostoc linckia* wurde ein Wachstumsinhibitor gegen Cyanobakterien und Grünalgen gefunden, der Cyanobacterin LU-1 genannt wurde (GROMOV,1991). Diese Substanz besteht aus einem stickstoffhaltigen Heterozyklus mit Zucker- und Phenolresten und reichert sich während des Wachstums in dem Kulturmedium an. Weitere algizide Verbindungen, ebenfalls aus *Nostoc* sp. stammend, sind das Nostocyclamid, das auch gegen Grünalgen wirkt (TODOROVA & JÜTTNER,1996) und eine Verbindung, die Cyanobacterin LU-2 genannt wurde und ebenfalls eine phenolische Struktur mit einem Aminozucker besitzt (VEPRITSKIY et al.,1991).

Auch höhere Pflanzen, wie die Wasserschafgarbe, sind in der Lage, sich mit Hilfe von Wachstumshemmern gegen das übermäßige Wachstum von Cyanobakterien zur Wehr zu setzen (SAITO et al.,1989; GROSS et al.,1996). Bei diesen Substanzen handelt es sich um hydrolysierbare Polyphenole.

Cyanobakterien stellen in vielen Seen und Gewässern ein Umweltproblem dar, da sie sogenannte Wasserblüten hervorrufen können. Dabei handelt es sich um eine massive Vermehrung der Cyanobakterien unter besonders günstigen Bedingungen, zum Beispiel bei hohem Stickstoffeintrag. Da einige Arten starke Toxine produzieren, wird das Wasser für Wild- und Nutztiere ungenießbar und hat teilweise schon zu spektakulären Massensterben geführt. Auch für den Menschen sind die Wasserblüten nicht ungefährlich: Falls diese in offenen Trinkwasser-Reservoirs oder an Badestellen von Seen und Teichen auftreten, werden auch Menschen einer erhöhten Dosis der Toxine ausgesetzt. Bei der Trinkwasseraufbereitung werden die Cyanobakterien nur teilweise abfiltriert und ihre Giftstoffe, die nicht nur Leber- oder Nervenschäden hervorrufen, sondern auch zur Entstehung von Krebs beitragen können, lediglich verdünnt (CARMICHAEL,1994). Als Gegenmittel wird häufig Kupfersulfat eingesetzt. Dessen Anwendung ist problematisch, weil es die Zellen der Algen zerstört und dadurch vermehrt deren intrazelluläre Toxine in die Gewässer gelangen, wo sie zu den oben beschriebenen Vergiftungen führen. Außerdem zählen Kupferionen zu den toxischen Schwermetallen, die nur begrenzt im Trinkwasser enthalten sein dürfen. Daher könnten solche natürlichen Wachstumshemmer, aus Biomasse isoliert oder nachsynthetisiert, möglicherweise eine Alternative zu herkömmlichen Algiziden darstellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit zu testenden Nährlösungsextrakte wurden zuerst dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Anschließend wurden die DC-Platten mit einer Suspension

bestehend aus den lebenden Zellen des jeweiligen Testorganismus (Testorganismen siehe unten) besprüht. Die Mikroalgen konnten mehrere Tage auf der Kieselgelschicht der DC-Platte existieren, so daß während dieser Zeit die Ausbildung von Hemmhöfen an den Stellen, an denen sich algizide Verbindungen befanden, zu beobachten war.

Es wurden die XAD-Nährlösungsextrakte folgender Mikroalgen getestet:

CYANOBAKTERIEN:

- *Chroococcus minutus*
- *Nodularia harveyana*
- *Nodularia spumigena*
- *Spirulina laxissima*
- Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*

CHLOROPHYCEEN:

- *Scenedesmus producto-capitatus*

Obwohl die dünnschichtchromatographische Trennung auf den HPTLC-Fertigplatten besser verlief, wurden für diese Testung mit Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> selbstbestrichene 20 x 20 cm große Glasplatten verwendet. Diese im Vergleich zu den Fertigplatten dickere und grobere Kieselgelschicht nahm die Sprühsuspension besser auf und konnte sie über längere Zeit feucht halten.

Als Fließmittel wurde wieder Ethylacetat, Methanol und Wasser (100: 16,5:13,5) verwendet. Die Mischung aus Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (100:10:5) wurde, obwohl sie bezogen auf die Fertigplatten bessere Trennergebnisse lieferte, nicht verwendet, weil die DC-Platten nach dem Vorwaschen mit diesem Fließmittel Flecken unter UV-Licht zeigten, die vermutlich durch den längeren Kontakt der Kieselgelschicht mit der Ameisensäure entstanden. Die Untersuchungslösungen wurden in einer Konzentration von 0,8 mg Extrakt pro Bande mit Hilfe einer Kapillare 1 cm breit aufgetragen.

Von folgenden Testorganismen wurden Sprühsuspensionen hergestellt:

- *Spirulina laxissima*
- *Nostoc insulare*
- *Phormidium* sp. I
- *Nostoc carneum*
- *Chroococcus minutus*
- *Synechocystis aquatilis*

Diese Mikroalgen wurden ausgewählt, weil sie sich gut und gleichmäßig versprühen ließen und sich in vorhergegangenen Untersuchungen als ausreichend sensibel gegenüber Wachstums-inhibitoren gezeigt hatten.

Nach der Detektion wurden die DC-Platten in mit Wasser angefeuchtete DC-Kammern gestellt, um die Mikroalgenschicht feucht zu halten.

Zur Dokumentation wurden die entwickelten DC-Platten vor dem Besprühen unter UV-Licht fotografiert. Die fotografische Dokumentation der entstandenen Hemmhöfe erfolgte nach einigen Tagen unter Tageslicht.

- **XAD-Extrakt aus reiner Nährlösung als Blindwert**

Es war lediglich direkt über dem Start ein leichter Auftragsfleck zu sehen.

Bei keinem der Testorganismen bildete sich ein Hemmhof aus.

- **Extrakt von *Chroococcus minutus***

Das Chromatogramm zeigte, wie bereits vorher beschrieben, im unteren Rf-Bereich vier Flecken mit den Rf-Werten 0,1 und 0,16 sowie 0,2 und 0,3, wobei der obere der stärkste war. Es folgte ein deutlicher Substanzfleck mit dem Rf-Wert von 0,53, ein schwächerer Fleck dicht darüber sowie zwei leicht ineinander übergehende Flecken mit den Rf-Werten 0,78 und 0,86.

1. DETEKTION MIT *Spirulina laxissima*

Eine schwache Hemmwirkung ging von dem ganzen Extrakt aus, da sich - allerdings erst nach fünf Tagen - ein schwacher Hemmhof über die gesamte Laufstrecke zeigte.

2. DETEKTION MIT *Nostoc insulare*

Hier waren keine Hemmhöfe erkennbar.

3. DETEKTION MIT *Phormidium species I*

Es war ein deutlicher Hemmhof im oberen Rf-Bereich erkennbar, der eventuell dem oberen Fleck mit dem Rf-Wert von 0,86 zugeschrieben werden konnte.

4. DETEKTION MIT *Nostoc carneum*

Hier war zum einen ein großer Hemmhof in dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront zu sehen, der allerdings keinem Substanzfleck zugeordnet werden konnte; zum anderen ein etwas schwächerer Hemmhof im mittleren Rf-Bereich auf Höhe des deutlichen Flecks mit dem Rf-Wert 0,53.

5. DETEKTION MIT *Chroococcus minutus*

Es waren keine Hemmhöfe sichtbar.

6. DETEKTION MIT *Synechocystis aquatilis*

Auch hier ging eine schwache Hemmwirkung von dem ganzen Extrakt aus, da sich ein schwacher Hemmhof über die gesamte Laufstrecke zeigte.

*Interpretation:*

Die Ergebnisse zeigten, daß *Chroococcus minutus* mehrere wachstumshemmende Substanzen in seinem Extrakt enthielt. Diese konnten jedoch außer dem Fleck im oberen Rf-Bereich mit dem Wert von 0,86 keinem Substanzfleck auf der DC eindeutig zugeordnet werden. Die weniger empfindlichen Testorganismen *Nostoc insulare* und *Chroococcus minutus* zeigten keine Reaktion.

• **Extrakt von *Nodularia harveyana***

Das Chromatogramm zeigte drei aufeinander folgende Substanzflecken im unteren Teil des Chromatogramms mit den Rf-Werten 0,2, 0,24 und 0,28. Darüber befand sich ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,35, bevor sich der stark ausgeprägte, hellblau erscheinende Hauptfleck (Norharman, Rf-Wert 0,5) anschloß. Dicht darüber folgte ein gelblicher Fleck mit dem Rf-Wert 0,54 sowie zwei schwache Flecken (Rf-Werte 0,51 und 0,6) unterhalb der Fließmittelfront.

1. DETEKTION MIT *Spirulina laxissima*

Eine deutliche Hemmwirkung ging von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus.

2. DETEKTION MIT *Nostoc insulare*

Auch hier ging eine deutliche Hemmwirkung von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus. Zusätzlich war ein schwacher Hemmhof im unteren Rf-Bereich erkennbar, der sich auf der Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,28 befand.

3. DETEKTION MIT *Phormidium* sp. I

Der Haupthemmhof auf Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,5 war auch hier deutlich ausgeprägt. Außerdem war ein schwacher Hemmhof im unteren Rf-Bereich erkennbar, der sich wiederum auf der Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,28 befand.

4. DETEKTION MIT *Nostoc carneum*

Bei dieser Mikroalge waren zwei deutliche Hemmhöfe zu erkennen: der eine ging von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus, während der andere sich über den unteren

Teil des Chromatogramms im Rf-Bereich von 0,2 bis 0,3 erstreckte. Außerdem befand sich ein schwacher Hemmhof direkt unterhalb der Fließmittelfront sowie ein weiterer schwacher Hemmhof am Start.

5. DETEKTION MIT *Chroococcus minutus*

Eine deutliche Hemmwirkung ging nur von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus.

6. DETEKTION MIT *Synechocystis aquatilis*

Neben dem Haupthemmhof auf Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,5 war noch ein schwacher Hemmhof direkt oberhalb des Hauptflecks zu erkennen.

*Interpretation:*

Auffallend war hier die deutliche wachstumsinhibitorische Wirkung des hellblau fluoreszierenden Hauptflecks, der als Norharman identifiziert wurde.

Auf einige DC-Platten wurde zusätzlich eine Lösung von Norharman als Referenzsubstanz in einer Konzentration von 3,75 µg Substanz pro Bande aufgetragen.

Dabei bestätigte sich die wachstumsinhibitorische Wirkung dieser Verbindung.

Außerdem wurden ein bis zwei weitere wachstumshemmende Substanzen detektiert; diese schienen aber wesentlich schwächer zu wirken, da vor allem die empfindlichen Testorganismen *Nostoc carneum* und *Synechocystis aquatilis* auf sie reagierten. Diese Substanzen befanden sich im unteren Rf-Bereich und konnten teilweise dem Fleck mit dem Rf-Wert 0,28 zugeordnet werden.

• **Extrakt von *Spirulina laxissima***

Im unteren Rf-Bereich wies das Chromatogramm ein Tailing auf, das sich bis zur Höhe der ersten beiden Flecken mit den Rf-Werten 0,13 und 0,18 erstreckte. Es schlossen sich zwei weitere Flecken mit den Rf-Werten 0,2 und 0,3 an, von denen der untere stärker war. Darüber befand sich ein schwächerer bläulicher Fleck (Rf-Wert 0,5), gefolgt von einem deutlichen Fleck mit dem Rf-Wert 0,54. Bis zur Fließmittelfront waren noch zwei schwache leicht ineinander übergehende Flecken mit den Rf-Werten 0,78 und 0,85 zu sehen.

1. DETEKTION MIT *Spirulina laxissima*

Es waren bis auf einen leichten Hemmhof auf der Höhe des Starts keine Hemmwirkungen zu sehen.

2. DETEKTION MIT *Nostoc insulare*

Auch hier waren keine Hemmhöfe erkennbar.

3. DETEKTION MIT *Phormidium species I*

Es waren keine Hemmhöfe zu erkennen.

4. DETEKTION MIT *Nostoc carneum*

Hier war ein deutlicher Hemmhof im oberen Rf-Bereich knapp unterhalb der Fließmittelfront zu sehen, der allerdings nicht eindeutig einem Fleck zugeordnet werden konnte.

5. DETEKTION MIT *Chroococcus minutus*

Auch hier waren keine Hemmhöfe sichtbar.

6. DETEKTION MIT *Synechocystis aquatilis*

Es war ein Hemmhof im oberen Rf-Bereich sichtbar, der eventuell dem oberen der beiden verwischten Flecken mit dem Rf-Wert 0,85 zugeordnet werden konnte.

*Interpretation:*

Der Extrakt von *Spirulina laxissima* zeigte keine besonders auffällige wachstumsinhibitorische Wirkung. Lediglich die beiden empfindlichen Testorganismen *Nostoc carneum* und *Synechocystis aquatilis* wurden in ihrem Wachstum von einer oder mehreren Substanzen im oberen Rf-Bereich gehemmt.

• **Extrakt der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*:**

Das Chromatogramm der Mischkultur entsprach auch hier ab dem Fleck mit dem Rf-Wert 0,32 dem des Extrakts von *Nodularia harveyana*.

Ein Substanzfleck mit dem Rf-Wert 0,42 war allerdings zusätzlich knapp unterhalb des hellblau erscheinenden Hauptflecks zu sehen. Im unteren Rf-Bereich befand sich lediglich ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,2 samt Tailing, der auch in dem Extrakt von *Spirulina laxissima* zu erkennen war.

1. DETEKTION MIT *Spirulina laxissima*

Eine deutliche Hemmwirkung ging von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus.

2. DETEKTION MIT *Nostoc insulare*

Auch hier ging eine deutliche Hemmwirkung von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus. Zusätzlich war ein schwacher Hemmhof im oberen Rf-Bereich erkennbar, der

sich auf der Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,8 kurz vor der Fließmittelfront befand.

3. DETEKTION MIT *Phormidium* sp. I

Der Haupthemmhof auf Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,5 war auch hier deutlich ausgeprägt. Außerdem war ein schwacher Hemmhof im unteren Rf-Bereich erkennbar, der sich knapp oberhalb des Starts befand.

4. DETEKTION MIT *Nostoc carneum*

Bei dieser DC-Platte war ein deutlicher Hemmhof zu erkennen, der von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 ausging, während zwei weitere schwächere Hemmhöfe direkt unterhalb der Fließmittelfront sowie am Start zu sehen waren.

5. DETEKTION MIT *Chroococcus minutus*

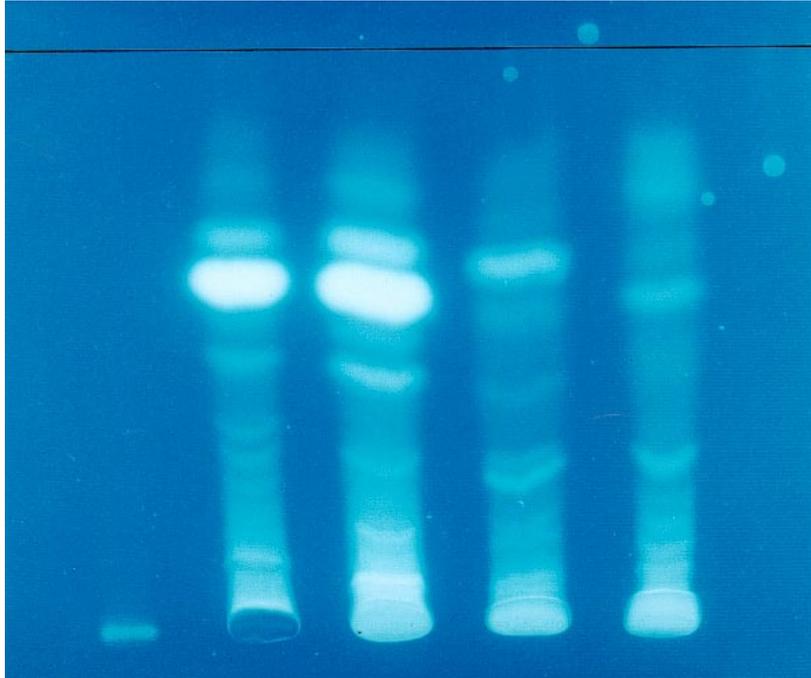
Eine deutliche Hemmwirkung ging nur von dem Hauptfleck mit dem Rf-Wert 0,5 aus.

6. DETEKTION MIT *Synechocystis aquatilis*

Neben dem Haupthemmhof auf Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,5 war noch ein schwacher Hemmhof direkt oberhalb des Hauptflecks zu erkennen.

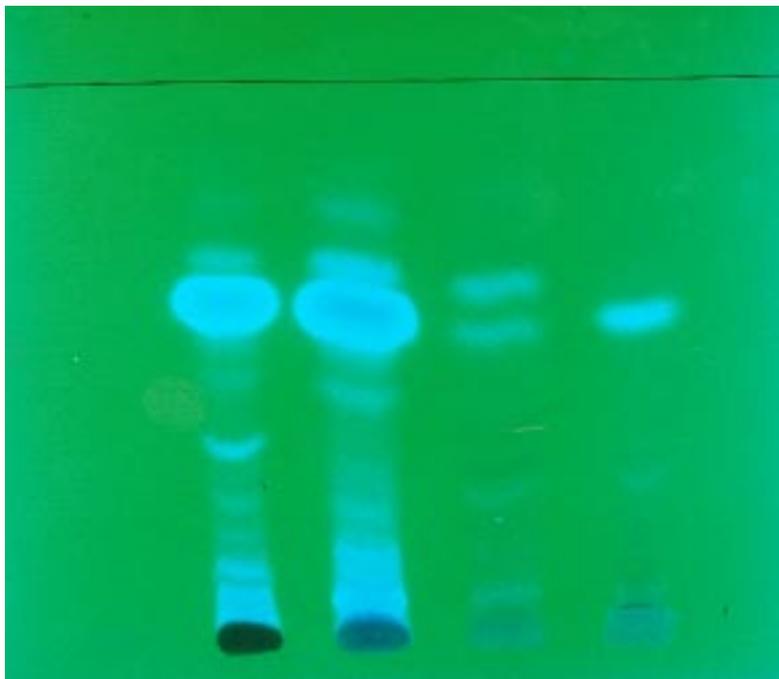
*Interpretation:*

Auch hier war ganz deutlich die wachstumshemmende Wirkung des Hauptflecks (Norharman) zu sehen. Weiterhin traten einige zusätzliche, allerdings nur schwach wachstumshemmende Substanzen auf, die weder bei *Nodularia harveyana* noch bei *Spirulina laxissima* vorkamen. Möglicherweise wurden diese erst durch das Zusammenleben der beiden Mikroalgen hervorgerufen. Diese Beobachtungen müßten jedoch durch weitere Untersuchungen noch untermauert werden, da diese Verbindungen wiederum nur bei Verwendung der empfindlichen Testorganismen *Synechocystis aquatilis* und *Nostoc carneum* beobachtet wurden.



**Abb. 3.1.1**

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Mikroalgen-Nährlösungsextrakten; von links nach rechts: Blindwert (hergestellt nach XAD-Methode), Extrakte von *Nodularia harveyana*, einer Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*, *Spirulina laxissima* und *Chroococcus minutus*. Aufnahme der DC unter UV bei 365 nm.



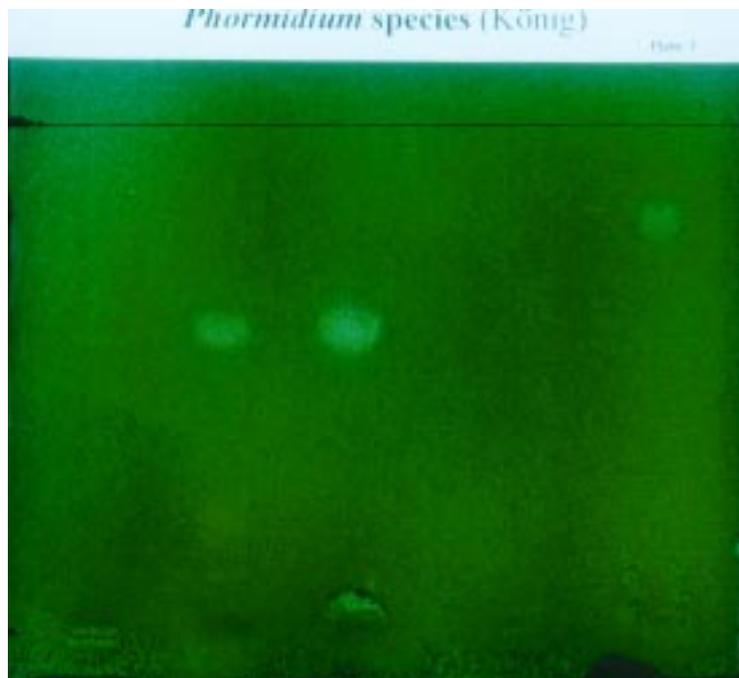
**Abb. 3.1.2**

Dieselbe DC-Platte wie in Abb. 3.1.1, aufgenommen unter UV bei 254 nm.



**Abb. 3.1.3**

DC-Platte aus Abb. 3.1.1, zwei Tage nach dem Besprühen mit *Spirulina laxissima*



**Abb. 3.1.4**

DC-Platte aus Abb. 3.1.1 , acht Tage nach dem Besprühen mit *Phormidium* sp. I

- **Extrakt von *Nodularia spumigena***

Im unteren Teil des Chromatogramms sieht man in dem Tailing, das sich bis zu dem ersten deutlichen Fleck mit dem Rf-Wert 0,3 zieht, noch einen schwachen Fleck mit dem Rf-Wert 0,15. Es folgen drei deutliche Flecken mit den Rf-Werten 0,36 und 0,49 sowie etwas stärker ausgeprägt darüber mit dem Rf-Wert 0,55. Nur sehr schwach erschienen ein bis zwei weitere Flecken im oberen Rf-Bereich bis zur Fließmittelfront.

1. DETEKTION MIT *Spirulina laxissima*

Es waren zwei schwache Hemmhöfe zu sehen. Der eine ging von dem Fleck mit dem Rf-Wert von 0,49 aus, der zweite von dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront. Letzterer konnte keinem Substanzfleck zugeordnet werden.

2. DETEKTION MIT *Nostoc insulare*

Hier waren keine Hemmhöfe erkennbar.

3. DETEKTION MIT *Phormidium* sp. I

Auch hier waren keine Hemmwirkungen zu sehen.

4. DETEKTION MIT *Nostoc carneum*

Eine leichte Hemmwirkung ging von dem gesamten Extrakt aus, da ein Hemmhof mit Schwerpunkt auf dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront und dem mittleren Rf-Bereich sich über das gesamte Chromatogramm erstreckte.

5. DETEKTION MIT *Chroococcus minutus*

Es waren keine Hemmhöfe sichtbar.

6. DETEKTION MIT *Synechocystis aquatilis*

Auch hier waren keine Hemmwirkungen zu erkennen.

*Interpretation:*

Der Extrakt erwies sich bezüglich wachstumshemmender Substanzen als wenig interessant. Es waren nur bei *Spirulina laxissima* und *Nostoc carneum*, beides recht empfindliche Testorganismen, leichte Hemmwirkungen zu sehen. Diese konnten einer Verbindung mit mittlerem Rf-Wert zugeordnet werden sowie dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront.

- **Extrakt von *Scenedesmus producto-capitatus***

Das Chromatogramm wies zwei schwache Banden im unteren Rf-Bereich mit den Werten 0,07 und 0,17 auf. Deutlicher erschienen zwei aufeinander folgende Substanzflecken bei 0,35 und 0,4 sowie ein weiterer Fleck bei 0,58. Kurz unterhalb der Fließmittelfront war noch ein weiterer Fleck zu sehen.

1. DETEKTION MIT *Spirulina laxissima*

Es waren zwei schwache Hemmhöfe zu sehen. Der eine ging von dem Fleck mit dem Rf-Wert 0,4 aus, der zweite von dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront. Letzterer konnte keinem Substanzfleck zugeordnet werden.

2. DETEKTION MIT *Nostoc insulare*

Hier war ein Hemmhof in Höhe des Flecks mit dem Rf-Wert 0,58 zu sehen.

3. DETEKTION MIT *Phormidium* sp. I

Es waren keine Hemmwirkungen zu sehen.

4. DETEKTION MIT *Nostoc carneum*

Eine leichte Hemmwirkung ging von dem gesamten Extrakt aus, da ein Hemmhof mit Schwerpunkt auf dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront und dem mittleren Rf-Bereich sich über das gesamte Chromatogramm erstreckte. Außerdem befand sich ein Hemmhof knapp oberhalb des Starts.

5. DETEKTION MIT *Chroococcus minutus*

Es waren keine Hemmhöfe sichtbar.

6. DETEKTION MIT *Synechocystis aquatilis*

Auch hier waren keine Hemmwirkungen zu sehen.

*Interpretation:*

Auch dieser Extrakt wies nur schwache wachstumsinhibitorische Eigenschaften auf, da nur bei den beiden empfindlichen Testorganismen *Spirulina laxissima* und *Nostoc carneum* leichte Hemmwirkungen zu sehen waren. Diese konnten einer Verbindung im mittleren Rf-Bereich zugeordnet werden sowie dem Bereich unterhalb der Fließmittelfront.

### Zusammenfassung

Es zeigte sich, daß alle getesteten Nährlösungsextrakte zumindestens schwache Wachstumsinhibitoren gegenüber den verwendeten Testorganismen besaßen. Es war teilweise schwierig, die wachstumshemmenden Wirkungen bestimmten Substanzflecken zuzuordnen, außerdem hemmten die Substanzen unterschiedliche Testorganismen. Besonders bei den nur schwach ausgeprägten Wirkungen konnten diese keinem bestimmten Substanzfleck zugeordnet werden. Die Testorganismen *Spirulina laxissima*, *Nostoc carneum* und *Synechocystis aquatilis* erwiesen sich als besonders empfindlich gegenüber den Hemmstoffen, während *Nostoc insulare*, *Phormidium* sp. I und *Chroococcus minutus* nur auf stärkere Wachstumsinhibitoren reagierten. Als eindeutiges Ergebnis konnte die wachstumshemmende Wirkung von Norharman in dem Extrakt von *Nodularia harveyana* gegenüber sämtlichen getesteten Mikroalgen festgestellt werden.

### 3.2 Brine shrimps-Test

Die Nährlösungsextrakte sollten nicht nur auf Wirkung gegenüber pflanzlichen Zellen, sondern auch gegenüber tierischen Zellen getestet werden. Als leicht durchführbares Testsystem wurde der brine shrimps-Test verwendet, bei dem eine Wirkung gegenüber den Nauplien (Larven im Postembryonalstadium) von *Artemia salina*, den Salinenkrebsen, überprüft wurde. Dieser Test wurde in den 50er Jahren entwickelt (TARPLEY,1958) und gilt rechtlich nicht als Tierversuch. Die auch als „brine shrimps“ bezeichnete Kleinkrebsform aus der Familie der *Artemiidae* besitzt eine hohe Anpassungsfähigkeit an ihre Umwelt, insbesondere an den Salzgehalt des sie umgebenden Mediums, so daß *Artemia salina* in großen Mengen im marinen und limnischen Plankton enthalten ist. Der brine shrimps-Test wurde entwickelt, um pflanzliche Inhaltsstoffe (MEYER et al.,1982), aber auch Narkotika (ROBINSON et al.,1965) und Pestizide (TARPLEY,1958; SANCHEZ-FORTUN et al.,1995) auf ihre toxikologischen Eigenschaften zu untersuchen.

Daß dieses Testsystem sich für eine Überprüfung auf toxische Metaboliten von Cyanobakterien eignet, zeigte eine Untersuchung, die die Wirkung von hepatotoxischen Peptiden, die vor allem von *Microcystis*-Arten ausgeschieden werden, auf *Artemia salina* dokumentierte (KIVIRANTA et al.,1991). Die brine shrimps-Toxizität korrelierte in diesem Fall

nicht nur mit der Hepatotoxizität, sondern auch mit der Wirkung auf einige Tumorzell-Linien, an denen Cytotoxizität überprüft wird. So führte die Beobachtung, daß Extrakte aus *Tolypothrix* sp. letal auf Artemienlarven wirkten, zu der Entdeckung des cytotoxischen Tolytoxins (FALCH et al.,1995).

Es wurden bisher bereits mehrere cytotoxische Verbindungen, die auch auf *Artemia salina* toxisch wirkten, in der Biomasse von Cyanobakterien gefunden, so das Curacin A aus *Lyngbya* sp. (GERWICK et al.,1994), der Mitosehemmstoff Crypophycin aus *Nostoc* sp. und das ebenfalls aus *Lyngbya* sp. stammende Majusculamid C (MOORE,1996).

Bei allen Vorteilen, die der brine shrimps-Test bietet, muß erwähnt werden, daß seine Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf den Warmblüterorganismus übertragbar sind. So zeigte das hochtoxische Picrotoxin im brine shrimps-Test kaum einen Effekt (KINGHORN et al.,1977). Immerhin aber liefert dieses Testsystem auf einfache Weise verwertbare Hinweise auf die Toxizität von Substanzen auf tierische Zellen.

Die Salinenkrebse werden üblicherweise als Lebendfischfutter eingesetzt. Daher können die Eier in Zoohandlungen käuflich erworben werden. Sie werden zwei Tage vor Testbeginn zum Schlüpfen der Nauplien angesetzt. Anschließend werden 10 bis 20 ausgeschlüpfte Larven zu einer Mischung aus zu testender Lösung, Seewasser und Hefesuspension (zur Ernährung der Artemienlarven) gegeben. Nach 24 Stunden wird die Anzahl der noch lebenden und der toten Nauplien bestimmt.

Normalerweise enthalten die zu testenden Lösungen strukturmäßig bekannte Monosubstanzen, bei denen diejenige Konzentration ermittelt wird, ab der sie auf *Artemia salina* toxisch wirken, beziehungsweise die Konzentration, bei der die Hälfte der Artemienlarven stirbt (LD<sub>50</sub>). Die hier eingesetzten Nährlösungsextrakte bestanden jedoch aus einem Gemisch unbekannter Substanzen, so daß zunächst nur festgestellt werden sollte, ob überhaupt eine toxische Wirkung auf die Artemienlarven eintrat. Zu diesem Zweck wurden drei Konzentrationen festgelegt, die einen weiten Konzentrationsbereich abdeckten.

Getestet wurden folgende Mikroalgen:

CYANOBAKTERIEN:

- *Chroococcus minutus*
- *Nodularia harveyana*
- *Nodularia spumigena*
- *Spirulina laxissima*
- Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*

Neben den Lösungen, bestehend aus den XAD-Extrakten der jeweiligen Cyanobakterien in den Konzentrationen 0,2 mg, 10 mg und 200 mg in 100 ml Wasser, wurden als Blindwert die drei entsprechend konzentrierten Lösungen aus XAD-Extrakt aus reiner Nährlösung (ohne Cyanobakterien) getestet. Jeder Ansatz wurde dreimal durchgeführt.

Es ergaben sich die in Tabelle 3.2.1 dargestellten Werte (Anzahl der nach 24 Stunden abgestorbenen Artemienlarven in %):

Die Extrakte von *Nodularia harveyana*, von *Spirulina laxissima* und von der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* zeigten eine deutliche toxische Wirkung auf die Artemienlarven. Während bei dem Extrakt von *Nodularia harveyana* die Wirkung schon bei einer Konzentration von 0,2 mg 100 ml<sup>-1</sup> einsetzte und sich bis zu der Konzentration von 200 mg 100 ml<sup>-1</sup> steigerte, zeigte sich bei dem Extrakt von *Spirulina laxissima* und von der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* die einsetzende Wirkung erst bei der höchsten Konzentration; diese übertraf dann aber die Wirkung des Extrakts von *Nodularia harveyana*. Es ergab sich rein rechnerisch eine LD<sub>50</sub> von 8,3 mg ml<sup>-1</sup> für den Extrakt von *Nodularia harveyana*, sowie die LD<sub>50</sub>-Werte von 3,6 mg ml<sup>-1</sup> und 5,3 mg ml<sup>-1</sup> für den Extrakt von *Spirulina laxissima* beziehungsweise für den Extrakt der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*.

**Tabelle 3.2.1**

Wirkung verschiedener Nährlösungsextrakte von Mikroalgen auf *Artemia salina*-Larven

| Extrakt  | 200mg 100ml <sup>-1</sup> | 10mg 100ml <sup>-1</sup> | 0,2mg 100ml <sup>-1</sup> | LD <sub>50</sub>        |
|--|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Blindwert  | /                         | /                        | /                         | /                       |
| <i>Chrooc.minut.</i>                                     | /                         | /                        | /                         | /                       |
| <i>Nodul.harv.</i>                                       | 14                        | 5                        | 4                         | 8,3 mg ml <sup>-1</sup> |
| <i>Spirul.lax.</i>                                       | 28                        | /                        | /                         | 3,6 mg ml <sup>-1</sup> |
| <i>Nodul.spum.</i>                                       | /                         | /                        | /                         | /                       |
| Mischkultur aus<br><i>Nod.harv./</i><br><i>Spir.lax.</i> | 19                        | /                        | /                         | 5,3 mg ml <sup>-1</sup> |

### *Zusammenfassung und Diskussion*

Da es sich bei den durch Toxizität aufgefallenen Nährlösungsextrakten von *Nodularia harveyana*, *Spirulina laxissima* und der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* um Substanzgemische handelte, war es unklar, ob die Wirkung von nur einer Komponente ausging oder ob mehrere Inhaltsstoffe beteiligt waren. Die toxischen Wirkungen, die von den Einzelextrakten von *Nodularia harveyana* und von *Spirulina laxissima* ausgingen, addierten sich in dem Extrakt von der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* nicht, wie es vielleicht zu erwarten gewesen wäre. Statt dessen ergab sich ein Wert, der zwischen den Werten der Einzelextrakte lag. Eventuell war hier eine zusätzliche Komponente beteiligt, die nur in der Mischkultur zu finden war. Einen Hinweis auf das Vorkommen einer solchen zusätzlichen Substanz gaben die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Extrakts sowie die Auftrennung mittels HPLC (siehe Kapitel 2.2 des Ergebnisteils).

Von mehreren Stämmen von Cyanobakterien-Arten ist bekannt, daß sie Toxine, darunter hochwirksame Nerven- und Lebergifte, produzieren. Dazu gehören zum Beispiel Microcystin aus *Microcystis aeruginosa* („Fast Death Factor“); ein Peptid, das sich in den Hepatocyten anreichert, und Anatoxin a aus *Anabaena flos-aquae* („Very Fast Death Factor“), ein Alkaloid, das in die Erregungsweiterleitung der Atemmuskulatur eingreift (METTING & PYNE,1986). Weitere bekannte Toxine sind Saxitoxin, das in *Aphanizomeneon flos-aquae*, aber auch in Dinoflagellaten vorkommt und Nodularin aus *Nodularia spumigena*. Diese Toxine wurden in der Biomasse nachgewiesen (MOORE,1996). Normalerweise geben Cyanobakterien ihre Toxine nicht ab, außer wenn sie leck werden oder absterben (CARMICHAEL,1994). So gelangen mit der Zeit durch das Absterben der Zellen die Toxine in das Kulturmedium, wo sie dann auch mittels HPLC nachgewiesen werden können (RAPALA et al.,1997).

Die Toxizität der oben genannten Cyanobakterien wurde mit Hilfe eines Mausbioassays getestet. Dabei wird ein Extrakt aus der cyanobakteriellen Biomasse einer männlichen Maus intraperitoneal injiziert (METTING & PYNE,1986; CARMICHAEL,1992).

Der Mausbioassay gilt als typischer erster Test auf Toxizität beim Screening von Wasserblütenmaterial, Laborkulturen oder Biomassenextrakten. Sein Nachteil besteht unter anderem darin, daß es sich um einen Tierversuch handelt und damit nicht überall durchgeführt werden kann und daß kleine Toxinmengen, zum Beispiel im Trinkwasser, nicht nachgewiesen

werden können (CARMICHAEL,1992). Deshalb wurde nach anderen Testverfahren gesucht. So wurden verschiedene Säugetierzelllinien (CODD et al.,1989), Immunoassays mit polyklonalen Antikörpern gegen Microcystine und Nodularine (BROOKS & CODD,1988) oder auch Enzymhemmsysteme (RINEHARDT et al.,1994) verwendet. Als eine weitere Alternative zum Mausbioassay schlugen KIVIRANTA et al.(1991) den brine shrimps-Test vor. Die dort angegebenen LD<sub>50</sub> -Werte reichten von 0,47 mg Biomasse ml<sup>-1</sup> Testlösung für einen Stamm von *Anabaena circinalis* bis 42,5 mg ml<sup>-1</sup> für einen Stamm von *Nodularia spumigena*. Die Autoren erklärten die von ihnen untersuchten Cyanobakterien mit einer LD<sub>50</sub> von mehr als 10,5 mg ml<sup>-1</sup> für toxisch, weil diese Werte am besten mit der Toxizität auf Mäuse korrelierten. Es stellte sich heraus, daß insbesondere zwischen dem Microcystingehalt und der brine shrimps-Mortalität eine gute Korrelation bestand, was CAMPBELL et al. (1994) bestätigten. Allerdings zeigten auch nicht-neurotoxische und nicht-hepatotoxische Stämme eine mittlere bis hohe Letalität im brine shrimps-Test. Diese Stämme enthielten anscheinend Komponenten, die für *Artemia salina*-Larven toxisch sind, aber weder Neurotoxine noch Hepatotoxine darstellen. Der brine shrimps-Test stellte demzufolge auch eine gute Methode dar, um allgemein bioaktive Substanzen in Cyanobakterien nachzuweisen und um erste Aussagen über Cytotoxizität zu machen, weswegen dieser Test hier auch verwendet wurde. Aufgrund von Literaturangaben besteht eine gute Korrelation zwischen dem brine shrimps-Test und einigen Tumorzelllinien, wie sie für Cytotoxizitätstestungen verwendet werden (SOLIS et al.,1993). Beim Screening von Extrakten aus cyanobakterieller Biomasse fanden FALCH et al. (1995) mehrere Stämme, die sowohl eine Aktivität auf Tumorzelllinien als auch im brine shrimps-Test zeigten. So wurden im brine shrimps-Test LD<sub>50</sub> -Werte von 47,5µg ml<sup>-1</sup> für einen laut Test an KB-Zelllinien (humanen Nasopharynx-Karzinomzellen) cytotoxisch wirksamen Extrakt aus *Scytonema lyngbyoides* und Werte bis zu 138,8 µg ml<sup>-1</sup> für einen ebenfalls laut KB-Zellinientest cytotoxisch wirksamen Extrakt von *Phormidium* sp. gefunden. Die Biomassenextrakte der fischtoxischen Haptophyta (eukaryotische Algen) *Prymnesium* sp. und *Chrysochromulina* sp. zeigten dagegen bezüglich *Artemia salina* ausgesprochen niedrige LD<sub>50</sub> -Werte von 4 bis 9 µg ml<sup>-1</sup> (MELDAHL et al., 1994). Niedrige LD<sub>50</sub> -Werte im brine shrimps-Test, die also einer hohen Toxizität entsprechen würden, bedeuten nicht unbedingt, daß die betreffende Verbindung auch auf den menschlichen Organismus toxisch wirkt. Dies zeigen zum Beispiel die LD<sub>50</sub> -Werte von gebräuchlichen Arzneistoffen: Für Paracetamol wurde ein Wert von 0,5 µg ml<sup>-1</sup>, für Coffein 3,4 µg ml<sup>-1</sup> und für Theophyllin 8 µg ml<sup>-1</sup> festgestellt (CALLEJA et al.,1994).

Zur Beurteilung können die hier erhaltenen LD<sub>50</sub>-Werte eventuell auch mit LD<sub>50</sub>-Werten von anderen pflanzlichen Substanzgemischen verglichen werden. So wurden beim brine shrimps-Test von Extrakten aus afrikanischen Heilpflanzen recht niedrige LD<sub>50</sub>-Werte von 0,04 mg ml<sup>-1</sup> bis 0,1 mg ml<sup>-1</sup> gefunden (AWACHIE & UGWU,1997); dennoch werden diese Pflanzen beim Menschen angewendet.

Alle obigen Angaben über die Toxizität von Extrakten und Substanzen beziehen sich jedoch, wie bereits erwähnt, auf Stoffe, die aus den Biomassen von Mikroalgen gewonnen wurden. Literatur-Angaben über die brine shrimps-Toxizität von Cyanobakterien-Nährlösungen liegen aber unseres Wissens bisher nicht vor.

Schlußfolgerungen auf eine mögliche Cytotoxizität der hier untersuchten Nährlösungsextrakte lassen sich also nur bedingt ziehen. Allerdings gibt das Testverfahren doch deutliche Hinweise auf bioaktive Substanzen in den getesteten Cyanobakterien-Nährlösungen, die aber dann natürlich durch weitere Testverfahren wie zum Beispiel an Warmblüterzellen bestätigt werden müßten.

### 3.3 Test auf biologische Aktivität

Diese Testung wurde vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung in Jena durchgeführt.

Es wurden Extrakte von folgenden Mikroalgen untersucht:

- *Chroococcus minutus*
- *Nodularia harveyana*
- *Nodularia spumigena*
- *Spirulina laxissima*
- Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*
- *Nostoc carneum*
- *Nostoc insulare*
- *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Extrakte durchliefen zunächst die Biologische Primärtestung. Bei diesen Testreihen, die routinemäßig in einer Konzentration von 1 mg ml<sup>-1</sup> durchgeführt wurden, wurden keine auffälligen Aktivitäten festgestellt.

Anschließend wurden die Proben noch einmal in einer 10fach höheren Konzentration auf cytotoxische Aktivitäten untersucht. Bestimmt wurden die halbmaximal inhibitorischen Substanzkonzentrationen ( $IC_{50}$ ). Die  $IC_{50}$  ist ein Maßstab für die cytotoxische und proloferationshemmende Wirksamkeit einer Substanz. Die Werte geben die  $IC_{50}$  auf folgende Zelllinien an: Die L-929-Zelllinie besteht aus Mäusefibroblasten, die K-562-Zelllinie aus humanen Leukämiezellen, und die HeLa-Zelllinie ist eine eukaryotische Standardzelllinie aus dem Cervix-Tumorgewebe der 1949 verstorbenen Patientin Henrietta Lachs.

Es sind bereits einige cytotoxische Substanzen aus Cyanobakterien bekannt, so zum Beispiel das Scytophycin, das in *Scytonema pseudohofmannii* gefunden wurde sowie das Tolytoxin aus *Tolypothrix conglutinata*, welches ebenfalls zu den Scytophycinen gerechnet wird, und die Acutiphycine aus *Oscillatoria acutissima* (BOROWITZKA,1995). Auch das Westiellamid aus *Westiellopsis prolifica* und verschiedene andere Substanzen aus Cyanobakterien wie die Mirabazole und die Tantazole, die ebenfalls aus *Scytonema* sp. stammen, zeigten cytotoxische Wirkungen (PATTERSON et al.,1994).

Es stellten sich folgende Ergebnisse heraus:

Der Extrakt von *Nodularia spumigena* zeigte die größte Aktivität auf die L-929- und auf die K-562-Zellen, während der Extrakt der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* die größte Wirkung auf die HeLa-Zellen besaß.

Laut Hans-Knöll-Institut sind die Extrakte als schwach bis nicht toxisch einzustufen.

**Tabelle 3.3.1**

Cytotoxische Aktivitäten von Mikroalgen-Nährlösungsextrakte auf verschiedene Zelllinien, angegeben als IC<sub>50</sub>

| Extrakt                                   | L-929<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | K-562<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | HeLa<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) |
|---|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Chrooc.minutus.</i>                    | 282,3                              | 175,0                              | 787,4                             |
| <i>Nodul.harveyana.</i>                   | 877,4                              | 76,1                               | 654,9                             |
| <i>Nodul.harv. 2. Test.</i>               | 783,1                              | 329,2                              | 729,4                             |
| <i>Nodul.spumigena</i>                    | 72,3                               | 58,3                               | 312,7                             |
| <i>Spirulina laxissima</i>                | > 1000                             | 789,7                              | > 1000                            |
| Mischkultur<br><i>Nod.harv./Spir.lax.</i> | 279,6                              | 218,6                              | 50,0                              |
| <i>Nostoc carneum</i>                     | > 1000                             | > 1000                             | > 1000                            |
| <i>Nostoc insulare</i>                    | 577,2                              | > 1000                             | 669,5                             |
| <i>Chlamyd. reinhardtii</i>               | > 1000                             | > 1000                             | > 1000                            |

### Zusammenfassung und Diskussion

Es fällt auf, daß die Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* zwar eine Wirkung auf die HeLa-Zelllinie ausübte, die Reinkulturen der beiden Cyanobakterien jedoch deutlich höhere IC<sub>50</sub>-Werte aufwiesen. Eine mögliche Ursache könnten eine oder mehrere cytotoxische Verbindungen sein, die erst durch das gemeinsame Wachstum in einer Kultur gebildet wurden. Denkbar wäre es auch, daß eine solche Verbindung in sehr geringen Mengen zwar schon in der Reinkultur von *Nodularia harveyana* oder von *Spirulina laxissima* enthalten war, aber erst durch das Konkurrieren der beiden Mikroalgen in einer Kultur deren Konzentration so anstieg, daß eine cytotoxische Wirkung zustande kam.

Der Begriff Cytotoxizität sagt allerdings nur etwas über die Wirkungen der Substanzen *in vitro* aus. Die Bedeutung der obigen cytotoxischen Substanzen könnte möglicherweise in einem Einsatz als Wirkstoffe gegen Krebs liegen. Sie könnten aber auch als Leitsubstanzen für die Synthese neuer Wirkstoffe dienen oder in der Landwirtschaft eingesetzt werden.

## 4 Strukturaufklärung von Norharman aus *Nodularia harveyana*

### 4.1 Isolierung

Der Nährlösungsextrakt von *Nodularia harveyana* enthielt laut dünn-schichtchromatographischer Untersuchung mindestens acht bis neun Substanzen, von denen eine durch eine intensive hellblaue Fluoreszenz unter UV<sub>254</sub> und UV<sub>365</sub> auffiel, die in dieser Intensität bei keinem der anderen untersuchten Nährlösungsextrakte zu sehen war.

Die Detektion der DC-Platte mit Dragendorffs Reagenz erbrachte eine deutlich positive Reaktion dieser Substanz. Damit war ein Hinweis darauf gegeben, daß es sich um eine protonierbare stickstoffhaltige Verbindung handelt, also ein Amin oder ein Alkaloid.

Der erste Versuch, diese Substanz zu isolieren, erfolgte über präparative Dünnschichtchromatographie. Bei dieser Methode wird ein Substanzgemisch zunächst dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt, anschließend die gesuchte Verbindung in Form ihres Substanzflecks mit dem Kieselgel von der Platte abgekratzt und dann mit einem geeigneten Lösungsmittel aus dem Kieselgelmateriale herausgelöst. Das Kieselgel wird durch Zentrifugation abgetrennt und die überstehende Lösung verwendet.

Zur praktischen Durchführung wurden 20 x 20 cm große, mit Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> selbst-bestrichene Glasplatten verwendet, da sich diese Schicht gut abkratzen ließ. Es wurde 1g Nährlösungsextrakt in 5 ml Methanol gelöst. Für das bandförmige Auftragen der gesamten Flüssigkeitsmenge waren vier DC-Platten nötig, von denen nach der Entwicklung die unter UV-Licht hellblau fluoreszierende Bande abgekratzt wurde. Das beladene Kieselgelmateriale wurde mit Aceton extrahiert, die nach der Zentrifugation überstehende Lösung eingeengt und für die HPLC in 50 µl mobiler Phase gelöst. Die HPLC wurde mit einer mobilen Phase aus Wasser, Ethylacetat und Essigsäure (95,6:4,1:0,3) durchgeführt, die mit einer Flußrate von 1,5 ml min<sup>-1</sup> durch eine RP-18 Säule gepumpt wurde. Es handelte sich dabei um eine Methode, die speziell für Flavonoide beziehungsweise für phenolische Substanzen entwickelt wurde (SHAHRZAD & BITSCH,1996), da aufgrund des dünn-schichtchromatographischen Erscheinungsbildes der Nährlösungsextrakte zunächst vermutet wurde, daß phenolische Verbindungen enthalten wären.

Das Chromatogramm zeigte neben dem Totvolumenpeak einen größeren Hauptpeak, dessen spezifisches Absorptionsspektrum mit Hilfe des Photo Dioden Array Detektors im ultra-

violetten und im sichtbaren Spektralbereich aufgenommen wurde. Um zu sehen, ob dieses Spektrum von der gesuchten Substanz stammte, wurde es mit einem direkt von einer HPTC-Platte aufgenommenen spezifischen Absorptionsspektrum verglichen. Dazu wurde Nährlösungsextrakt von *Nodularia harveyana* dünnenschichtchromatographisch mittels HPTLC aufgetrennt und das Absorptionsspektrum des hellblau fluoreszierenden Flecks mit Hilfe eines CAMAG TLC-Scanners aufgenommen. Der Vergleich der beiden Absorptionsspektren ergab eine deutliche Übereinstimmung: beide wiesen zwei Maxima bei 254 nm und bei 302 nm sowie ein kleineres Maximum bei 368 nm auf.

Für weitergehende Untersuchungen war diese Methode jedoch nicht gut geeignet, da die Ausbeute sehr gering war. Da die gesuchte Verbindung vermutlich Alkaloidcharakter besaß, wurde nun eine Methode entwickelt, diese Substanz direkt aus dem Nährlösungsextrakt zu isolieren. Aufgrund der Tatsache, daß Alkaloide bei alkalischem pH-Wert meist lipophil sind und mit Säuren wasserlösliche Salze bilden, ist es möglich, sie aus biologischem Material durch Umverteilung zwischen Wasser und organischen Lösungsmitteln zu gewinnen.

Der aus einer Kultur von *Nodularia harveyana* gewonnene Extrakt wurde in Wasser suspendiert und auf pH 3 gebracht, um das Alkaloid zu protonieren und damit in der Wasserphase zu halten. Die lipophilen Bestandteile wurden mit Dichlormethan abgetrennt und die Wasserphase anschließend auf pH 12 gebracht. Damit konnte das Alkaloid als lipophile Base mit Ether ausgeschüttelt werden. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat siccatum getrocknet und zur abschließenden Reinigung mit Wasser, das mit Salzsäure auf pH 1 gebracht worden war, ausgeschüttelt. Die vereinigten Wasserphasen enthielten die gesuchte Verbindung als Hydrochlorid, die nach dem Gefriertrocknen als trockenes Pulver vorlag.

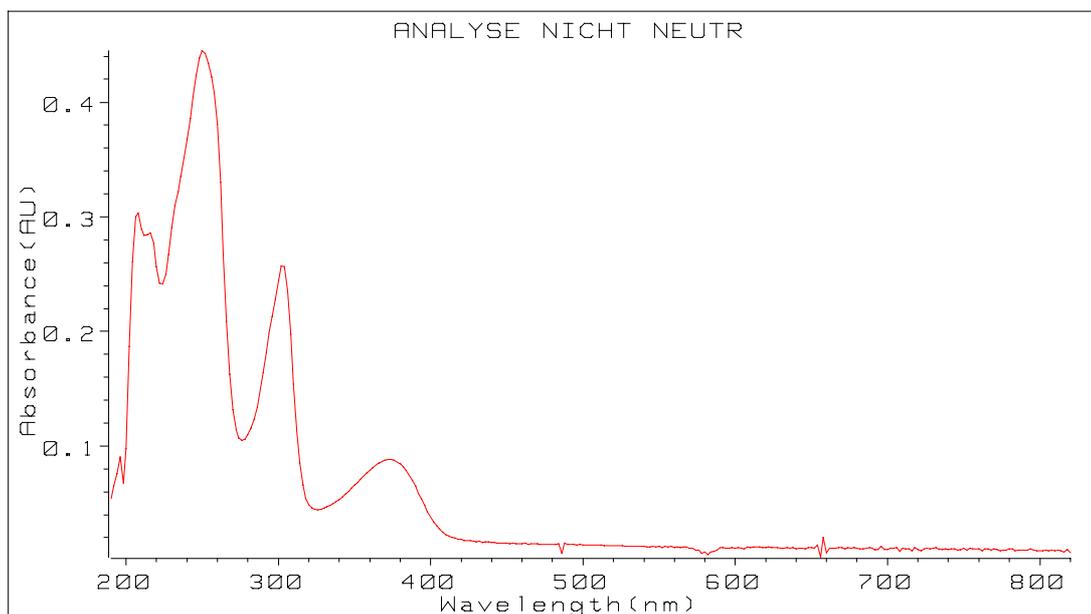
Um auch die Base untersuchen zu können, wurde das Wasser nach erneutem Alkalisieren wieder mit Ether ausschüttelt. Der Ether wurde unter Stickstoffbegasung vorsichtig entfernt, bis die Substanz als öliger Rest zurückblieb.

## 4.2 Meßergebnisse

Von der isolierten Verbindung wurde das UV/Vis-Spektrum in methanolischer Salzsäure aufgenommen und mit den oben beschriebenen zuvor erhaltenen UV/Vis-Spektren verglichen. Auch hier waren die beiden Maxima bei 254 nm und bei 302 nm zu sehen sowie das kleinere Maximum bei 368 nm. Ein zusätzliches Maximum bei 210 nm wurde von dem Lösungsmittel Methanol verursacht und trat in dem direkt von der HPTLC-Platte aufgenommenen Spektrum nicht auf, während es in geringerem Ausmaß auch in dem Spektrum zu sehen war, das von dem Photo Dioden Array Detektor während der HPLC aufgenommen wurde und ebenfalls durch das Lösungsmittel verursacht wurde.

### Abb. 4.2.1

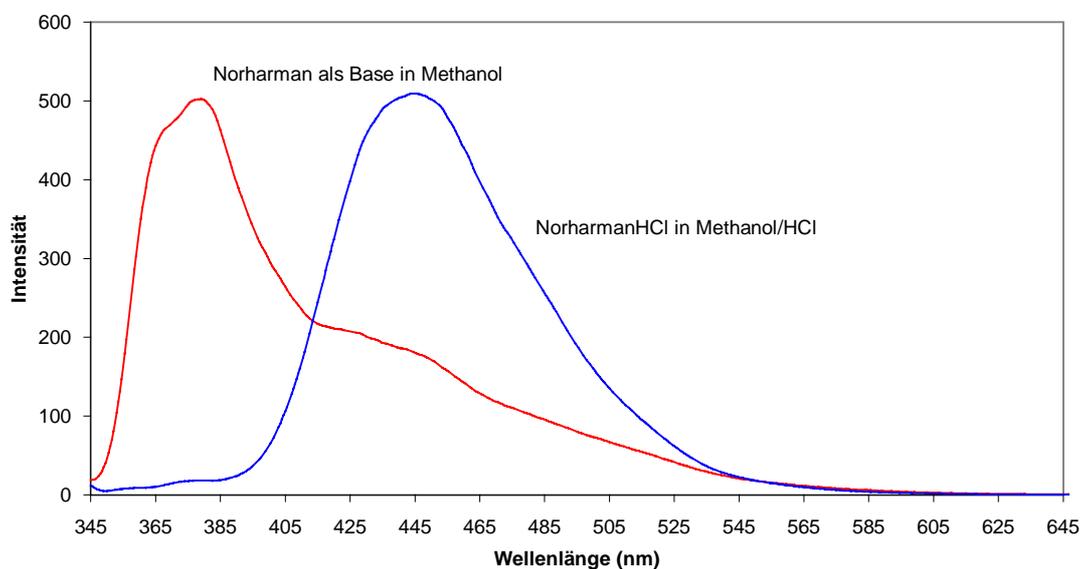
UV/Vis-Spektrum von Norharman als Hydrochlorid, isoliert aus *Nodularia harveyana*, gelöst in Methanol/HCl



Anschließend wurde von dieser Lösung bei der Anregungswellenlänge von 336 nm ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen sowie ein weiteres Fluoreszenzspektrum von der Substanzbase, gelöst in Methanol. Dabei war eine Verschiebung des Maximums gegenüber des Hydrochlorids zu kürzeren Wellenlängen hin zu beobachten. Das Hydrochlorid besaß ein Maximum bei 443 nm, während die Base ein Maximum bei 379 nm und zusätzlich eine Schulter bei 415 nm bis 440 nm aufwies.

**Abb. 4.2.2**

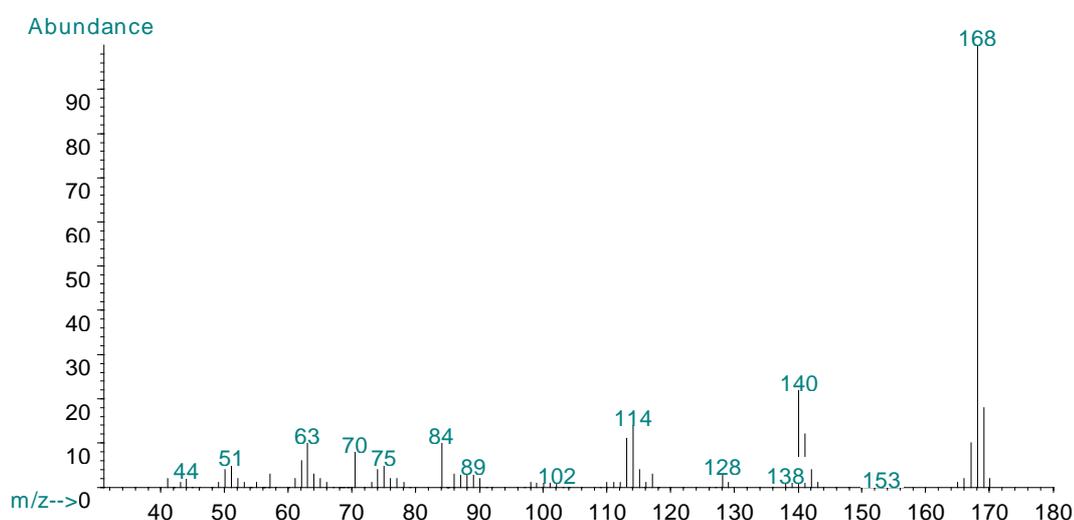
Fluoreszenzspektren von Norharman als Hydrochlorid und als Base, isoliert aus *Nodularia harveyana*



Einen Hinweis auf das Molekulargewicht der gesuchten Verbindung gab das Massenspektrum, erhalten durch Direktantrag und Elektronenstoßionisierung bei 70eV. Es zeigte sich ein Molekülpeak bei  $m/z=168$ , der auch gleichzeitig der Basispeak war. Die Fragmentierung war gering, was auf ein stabiles Ringsystem hindeutete.

**Abb. 4.2.3**

Massenspektrum von Norharman, isoliert aus *Nodularia harveyana*



Den endgültigen Aufschluß über die Struktur der gesuchten Substanz gaben das  $^1\text{H}$ -NMR und das  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum, die von dem Hydrochlorid gelöst in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen wurden.

Bei dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum wurde das Wassersignal unterdrückt, so daß das Signal von HDO, das durch den Austausch des Protons am Stickstoff mit  $\text{D}_2\text{O}$  zustande kam, bei 4,7 ppm deutlich kleiner ausfiel als bei einem konventionellen Spektrum. Bei den mit V gekennzeichneten Signalen in dem Bereich von 3 bis 4 ppm handelte es sich vermutlich um aliphatische Verunreinigungen. Für die Auswertung wurden vor allem die Signale in dem Bereich von 6,5 ppm bis 9 ppm herangezogen. Hier finden die Kopplungen von Protonen in aromatischen Systemen statt.

Das Signal des Protons im Indolring sowie das Proton am protonierten Stickstoff des Hydrochlorids war bei dieser Messung nicht sichtbar, weil der Austausch mit  $\text{D}_2\text{O}$  zu schnell vonstatten ging. Deswegen wurde eine zusätzliche Messung in DMSO durchgeführt, bei der das Proton am protonierten Stickstoff aufgrund der Ladung ein sehr breites Signal bei 16 ppm lieferte und das Signal des Indol-Protons bei 12,5 ppm lag.

Die folgenden chemischen Verschiebungen wurden zur Identifizierung herangezogen:

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):

$\delta = 7,38$  (t, 1H,  $^3\text{J} = 7,6\text{Hz}$ , 7-H)

$\delta = 7,62$  (d, 1H,  $^3\text{J} = 8,2\text{Hz}$ , 8-H)

$\delta = 7,73$  (t, 1H,  $^3\text{J} = 7,5\text{Hz}$ , 6-H)

$\delta = 8,19$  (d, 1H,  $^3\text{J} = 8,0\text{Hz}$ , 5-H)

$\delta = 8,25$  (d, 1H,  $^3\text{J} = 6,0\text{Hz}$ , 4-H)

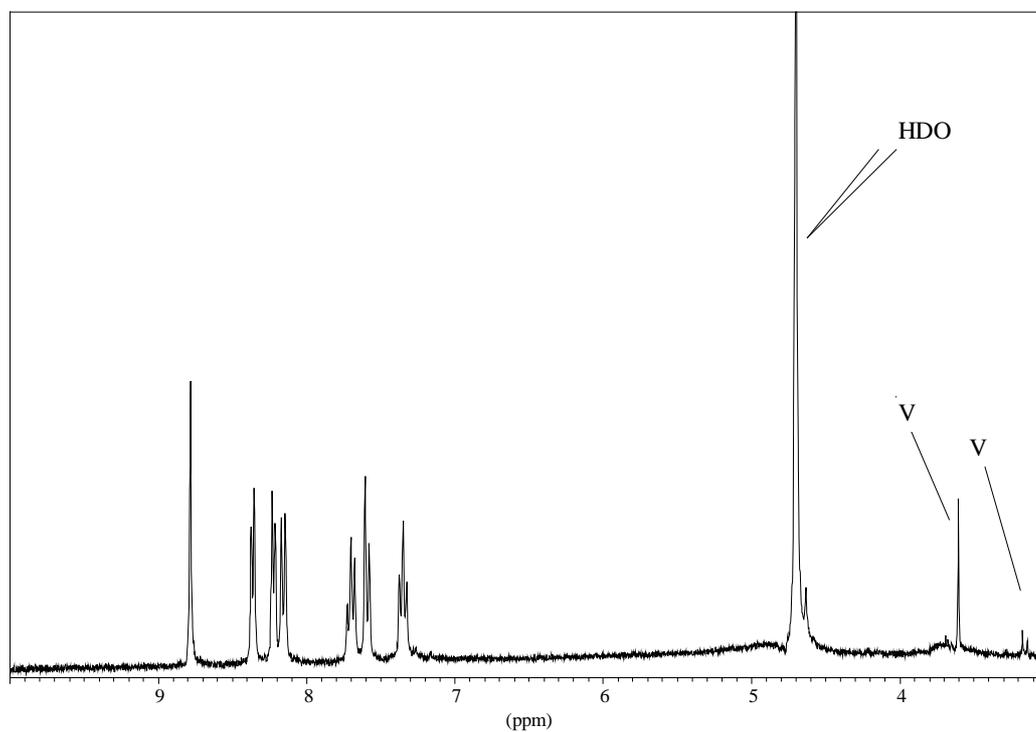
$\delta = 8,39$  (d, 1H,  $^3\text{J} = 6,1\text{Hz}$ , 3-H)

$\delta = 8,81$  (s, 1H, 1-H)

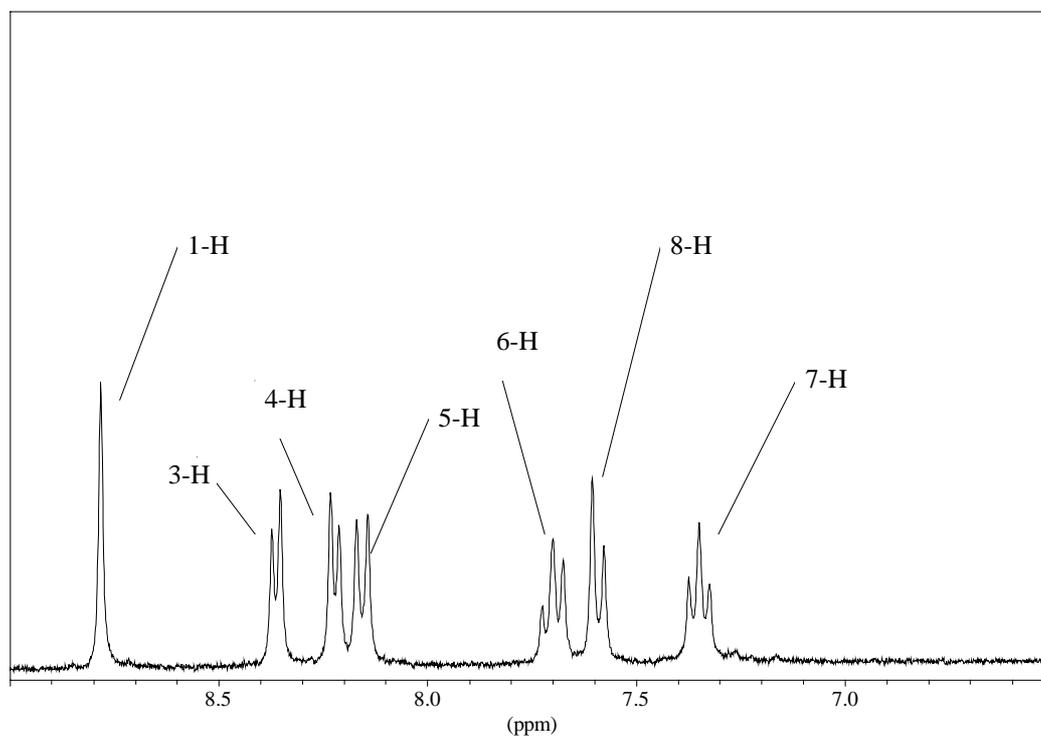
Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte elf Signale, von denen vier kleiner ausfielen als die restlichen sieben. Es handelte sich dementsprechend um eine Verbindung mit elf Kohlenstoffatomen. Vier davon waren quartär, da diese Kohlenstoffatome eine langsamere Relaxation und deswegen ein kleineres Signal aufwiesen.

Der abgebildete Bereich von 100 ppm bis 150 ppm umfaßt den Bereich der chemischen Verschiebung von Kohlenstoffatomen in aromatischen Strukturen.

**Abb. 4.2.4**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz) von NorharmanHCl in  $\text{D}_2\text{O}$



**Abb. 4.2.5** Ausschnittsvergrößerung des aromatischen Bereichs von 6,5 ppm bis 9 ppm

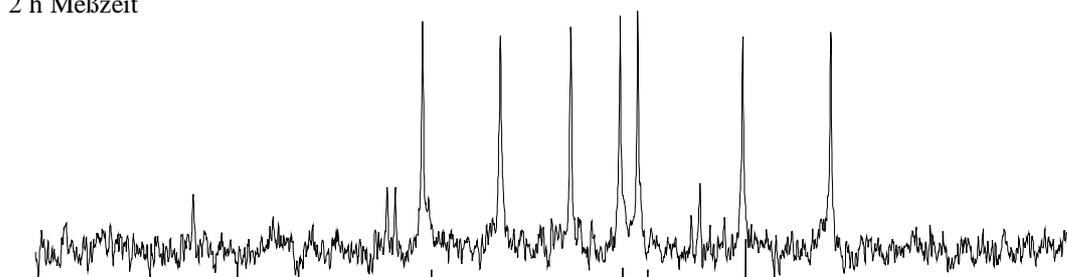


V = aliphatische Verunreinigung

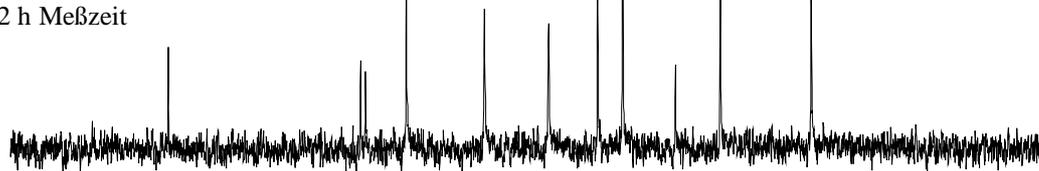
**Abb. 4.2.6**

$^1\text{H}$ -Breitbandenkoppeltes  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (75,47 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Norharmanhydrochlorid, aus *Nodularia harveyana* isoliert und als Referenzsubstanz

Norharman Referenzsubstanz  
2 h Meßzeit



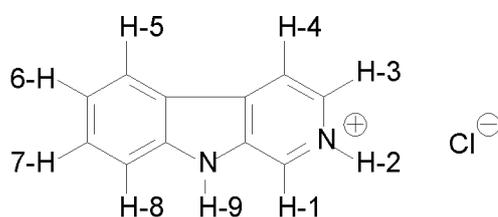
isoliertes Norharman  
32 h Meßzeit



Anhand der gewonnenen Daten wurde festgestellt, daß es sich bei der gesuchten Verbindung um die Struktur eines  $\beta$ -Carbolins handelte. Zur Bestätigung wurden zum einen die Spektren mit Literaturdaten verglichen, zum anderen Norharmanhydrochlorid als Referenzsubstanz den gleichen Messungen unterworfen, womit die Identität zweifelsfrei geklärt war.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren wurden mit den Messungen von DIAS et al.(1992) und von BALÒN et al.(1993) verglichen, die Daten für das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum stammen aus der Veröffentlichung von HAGEN et al.(1987) und das Massenspektrum ist bei GALCERAN et al.(1996) abgebildet.

**Abb. 4.2.6** Strukturformel von Norharman



### 4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Aus *Nodularia harveyana* wurde ein Indolalkaloid isoliert und als Norharman, ein  $\beta$ -Carbolin, identifiziert. Es handelt sich um ein heterocyclisches Amin, welches auch als 9H-Pyrido [4,3-b] indol bezeichnet werden kann.

Indolalkaloide mit einer  $\beta$ -Carbolingrundstruktur sind in der Natur weit verbreitet. Die am häufigsten für diese Verbindungen verwendete Trivialnomenklatur enthält den Wortstamm -harm-, der sich von *Peganum harmala* L. ableitet, der Steppenraute, aus der erstmals solche Verbindungen isoliert wurden (ALLEN & HOLMSTEDT,1979).

Norharman ist das am einfachsten aufgebaute dieser Alkaloide und kommt bei Angiospermen lediglich in einigen Poaceae und Sapotaceae vor. Unter den Bakterien ist es in *Streptomyces*- und *Nocardia* sp. enthalten. Was marine Organismen betrifft, so wurde es bislang nur aus dem Dinoflagellaten *Noctiluca miliaris* isoliert, der durch seine Biolumineszenz in Küstengewässern bekannt ist (INOUE et al.,1980), und aus *Didemnum* sp. (Seescheide) (SCHUMACHER & DAVIDSON,1995). Über die Funktion von Norharman gibt es verschiedene Aussagen. So wird eine Beteiligung an dem System der Biolumineszenz von *Noctiluca miliaris* vermutet (INOUE et al.,1980), während für höhere Pflanzen eine Beteiligung an der Wachstumsregulierung durch Auxine diskutiert wird (MARTENS & FRANKENBERG,1993). Auxine sind für das Streckenwachstum von Sprossen verantwortlich. Das wichtigste Auxin ist  $\beta$ -Indolyllessigsäure, welche im Erdreich aus dem enzymatischen Abbau von L-Tryptophan entsteht. Norharman kann diese Enzyme hemmen und somit indirekt dem Wachstum entgegenwirken. Da Auxine auch in Algen und Bakterien vorkommen, wäre ein möglicher Wirkmechanismus der Wachstumshemmung von Norharman auf andere Cyanobakterien (siehe Kapitel 3 des Ergebnisteils) eventuell auch auf eine Enzymhemmung zurückzuführen.

Aufgrund seiner Entstehung aus der Aminosäure L-Tryptophan bei hohen Temperaturen kommt Norharman auch in gegarter proteinreicher Nahrung wie Fleisch und Fisch vor (ABULDAKARIM & SMITH,1998; SOLYAKOV et al.,1999). Der genaue Entstehungsmechanismus ist bei YAYLAYAN & FORAGE (1991) beschrieben. Außerdem ist Norharman in Zigaretten- und Marihuanarauch nachgewiesen (ALLEN & HOLMSTEDT,1979), wo es eine comutagene Wirkung entfaltet, die dadurch zustande kommt, daß in Gegenwart von aromatischen Aminen wie Anilin unter anderem Aminophenylnorharman entsteht, welches mit der DNA Addukte bildet (TOTSUKA et al.,1998).

Die akute Wirkung von  $\beta$ -Carbolinen auf den menschlichen Organismus ist zunächst eine allgemeine Wirkung auf das ZNS, die eine Hemmung der Monoaminoxidase (ALLEN & HOLMSTEDT,1979) sowie Interaktionen mit Benzodiazepinrezeptoren einschließt (HAGEN et al.,1987). Die Wirkung von Norharman auf Tiere beschrieben BOURKE et al. (1992) anhand von Schafen, die Norharman enthaltendes Gras gefressen hatten, als vorübergehende milde Sedierung und Hypomotilität, verbunden mit leichten Lähmungserscheinungen der Gliedmaßen.

## 5 Norharmengehalt in Mischkulturen von *Nodularia harveyana* mit *Spirulina laxissima*

### 5.1 Versuchsaufbau

Nachdem sowohl in der Nährlösung als auch in der Biomasse von *Nodularia harveyana* das Alkaloid Norharman gefunden worden war und dieses sich als Wachstumsinhibitor gegen andere Cyanobakterien erwiesen hatte, sollte überprüft werden, ob sich die intrazelluläre Produktion dieser Substanz in der Biomasse sowie ihre Exkretion in die Nährlösung in Gegenwart eines Konkurrenzorganismus beeinflussen läßt.

Als solcher wurde das Cyanobakterium *Spirulina laxissima* ausgewählt, weil sich dieses als besonders empfindlich gegenüber dem wachstumshemmenden Einfluß von Norharman gezeigt hatte.

Da die Bildung von Sekundärmetaboliten, zu denen man das Norharman zählen muß, hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase von Mikroalgen geschieht (BOROWITZKA, 1995), wurden zunächst vier Reinkulturen von *Nodularia harveyana* und zwei Reinkulturen von *Spirulina laxissima* (je 8 Liter) separat gezüchtet, bis sie sich gegen Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase befanden. Das Wachstum wurde durch photometrische Messungen bei 440 nm kontrolliert.

Zu Beginn des Versuchs wurden daraus in sechs Parallelansätzen jeweils gleiche Volumina von *Nodularia harveyana*- und *Spirulina laxissima*-Kulturen (je 2 Liter) abgenommen und zu sechs 4 Liter-Mischkulturen vereinigt. Diese wurden bei gleichbleibenden Bedingungen weiter-kultiviert. Daneben wurden zwei der 8 Liter-Reinkulturen von *Nodularia harveyana* ebenfalls bei gleichbleibenden Bedingungen für die Vergleichswerte weiterkultiviert.

Von den Kulturen wurden nach folgendem Schema Proben gezogen: Es wurden jeweils die vier Liter einer Mischkultur, die entsprechend zwei Liter von *Nodularia harveyana* enthielten sowie zwei Liter einer Reinkultur von *Nodularia harveyana* nach 2, 8, 15, 22, 29 und 43 Tagen abgenommen und analysiert. Als Ausgangswert wurden zwei Liter aus einer bis zu Beginn des Versuchs gewachsenen Reinkultur von *Nodularia harveyana* entnommen und analysiert.

Die Proben wurden quantitativ mittels HPLC auf den Gehalt von Norharman sowohl in der Nährlösung als auch in der Biomasse untersucht. Aus den Nährlösungen wurden XAD-Extrakte hergestellt und wie vorher beschrieben auf Norharman analysiert. Die Biomasse wurde nach dem Gefriertrocknen mit der gleichen HPLC-Methode auf Norharman untersucht. Dazu wurde aus 150 mg Biomasse, genau gewogen, ein methanolischer Extrakt hergestellt, eingengt und der Rückstand in 500,0 µl Methanol gelöst.

## 5.2 Ergebnisse

In der Tabelle 5.2.1 und in dem Diagramm 5.2.1 ist der Norharmengehalt einer 8 Liter-Kultur von *Nodularia harveyana* in Abhängigkeit von dem Alter der Kultur dargestellt. Die beiden vorderen Flächen zeigen den Norharmengehalt in der Biomasse beziehungsweise in dem Nährlösungsextrakt, während für die hintere Fläche diese Werte zum Gesamtgehalt der Kultur aufaddiert sind.

**Tabelle 5.2.1**

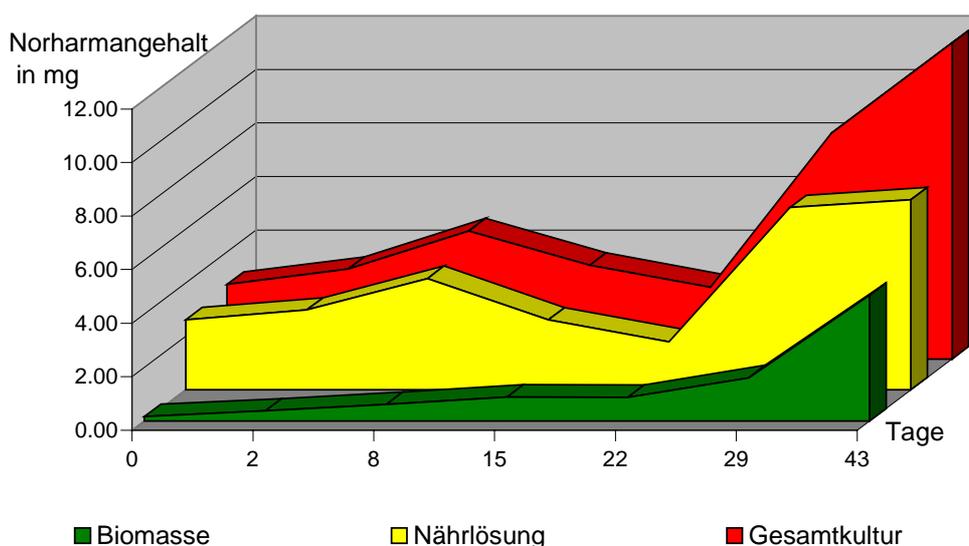
Norharmengehalt in der Biomasse und in der Nährlösung einer Reinkultur von *Nodularia harveyana* (8 Liter)

|                 | Norharmengehalt<br>in der Biomasse |         | Norharmengehalt<br>im XAD Extrakt |        | Norharmengehalt<br>der Gesamtkultur<br>(mg) |
|-----------------|------------------------------------|---------|-----------------------------------|--------|---|
|                 | (mg)                               | (%)     | (mg)                              | (%)    |   |
| Beginn (0 Tage) | 0,16                               | 0,004 % | 2,62                              | 0,23 % | 2,78  |
| 2 Tage          | 0,37                               | 0,008 % | 2,98                              | 0,81 % | 3,35  |
| 8 Tage          | 0,62                               | 0,012 % | 4,16                              | 0,79 % | 4,78  |
| 15 Tage         | 0,89                               | 0,012 % | 2,61                              | 0,35 % | 3,5   |
| 22 Tage         | 0,88                               | 0,012 % | 1,79                              | 0,23 % | 2,67  |
| 29 Tage         | 1,61                               | 0,019 % | 6,81                              | 0,99 % | 8,42  |
| 43 Tage         | 4,7                                | 0,031 % | 7,1                               | 0,61 % | 11,8  |

Vor allem in dem Kurvenverlauf, den der Norharmengehalt in der Biomasse beschrieb, ist deutlich zu sehen, daß der Gehalt an diesem Alkaloid mit dem Alter der Kultur zunahm. Auch der Gehalt in der Nährlösung stieg im Laufe der Zeit an, wenn auch zwischendurch eine leichte Abnahme zu beobachten war. Es fällt auf, daß der Gesamtnorharmengehalt zum größeren Teil auf den Gehalt in der Nährlösung zurückging. Der Norharmananteil, der aus der Biomasse stammte, war deutlich geringer.

### Diagramm 5.2.1

Norharmengehalt in der Biomasse und in der Nährlösung einer Reinkultur von *Nodularia harveyana* (8 Liter)



Auch in der graphischen Darstellung 5.2.2 ist zu sehen, wie der Norharmengehalt mit dem Alter der Kultur anstieg. Der Anstieg verlief gleichmäßiger als bei der Reinkultur von *Nodularia harveyana*, aber ansonsten bot sich ein ähnliches Bild. Auch hier war der Anteil des Gesamtnorharmengehalts, der von der Nährlösung stammte, höher als der Norharmananteil aus der Biomasse.

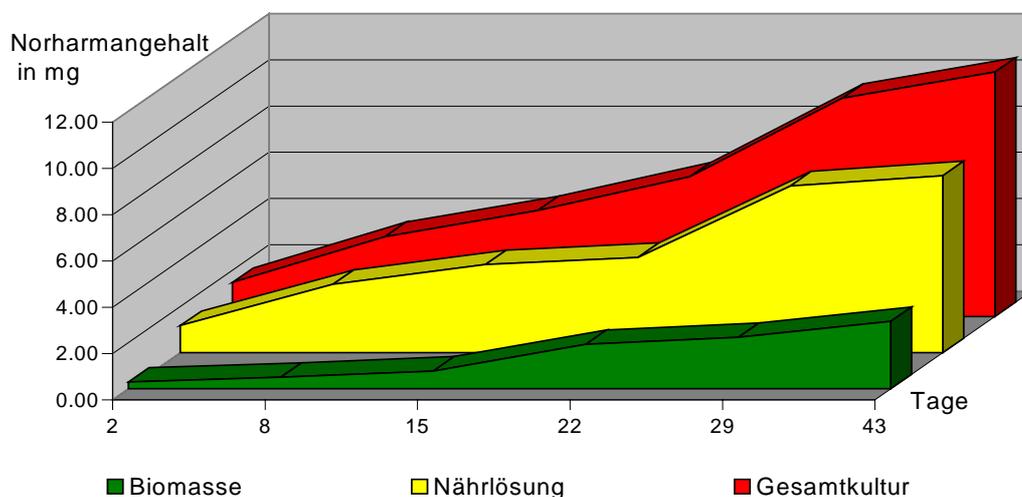
**Tabelle 5.2.2**

Norharmangehalt in der Biomasse und in der Nährlösung einer Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* (8 Liter)

|         | Norharmangehalt<br>in der Biomasse |         | Norharmangehalt<br>im XAD Extrakt |        | Norharmangehalt<br>der Gesamtkultur<br>(mg) |
|---------|------------------------------------|---------|-----------------------------------|--------|---|
|         | (mg)                               | (%)     | (mg)                              | (%)    |   |
| 2 Tage  | 0,29                               | 0,006 % | 1,17                              | 0,23 % | 1,46  |
| 8 Tage  | 0,50                               | 0,010 % | 2,95                              | 0,60 % | 3,45  |
| 15 Tage | 0,77                               | 0,009 % | 3,80                              | 0,73 % | 4,57  |
| 22 Tage | 1,92                               | 0,013 % | 4,12                              | 0,32 % | 6,04  |
| 29 Tage | 2,23                               | 0,014 % | 7,21                              | 0,8 %  | 9,44  |
| 43 Tage | 2,92                               | 0,017 % | 7,65                              | 0,31 % | 10,57                                       |

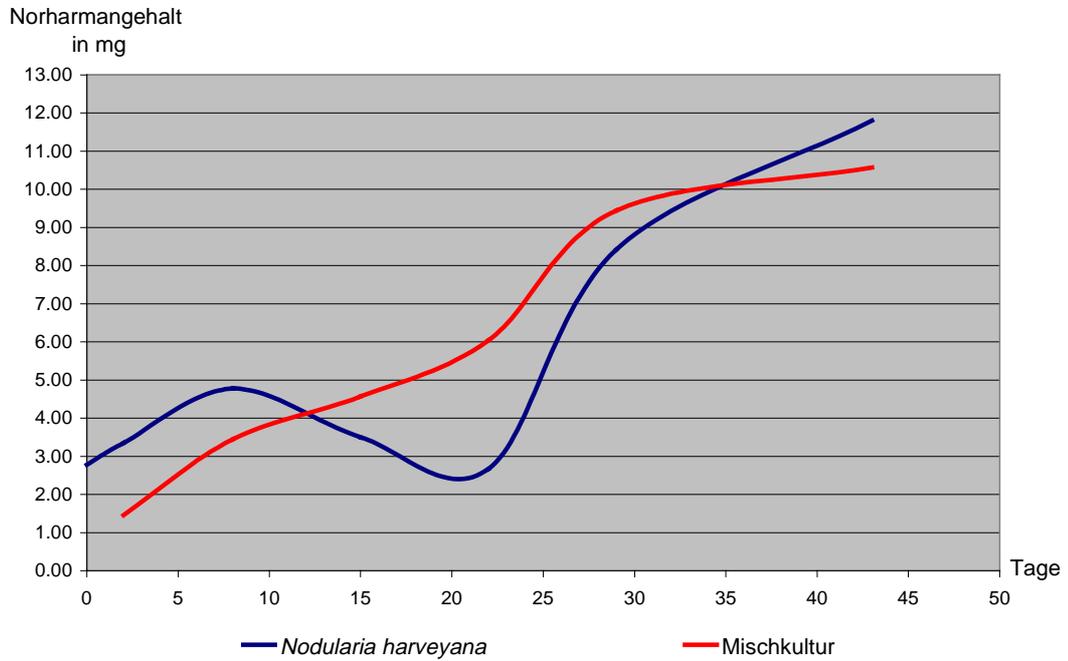
**Diagramm 5.2.2**

Norharmangehalt in der Biomasse und in der Nährlösung einer Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* (8 Liter)



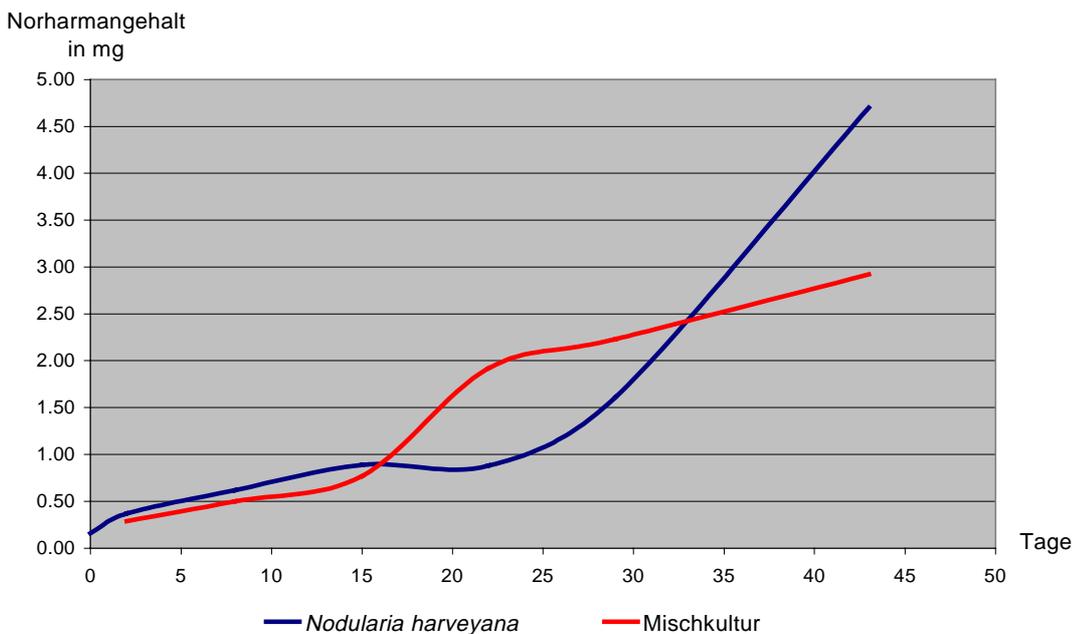
**Diagramm 5.2.3**

Vergleich der Gesamtnorharmengehalte in der Kultur von *Nodularia harveyana* und in der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* (8 Liter)



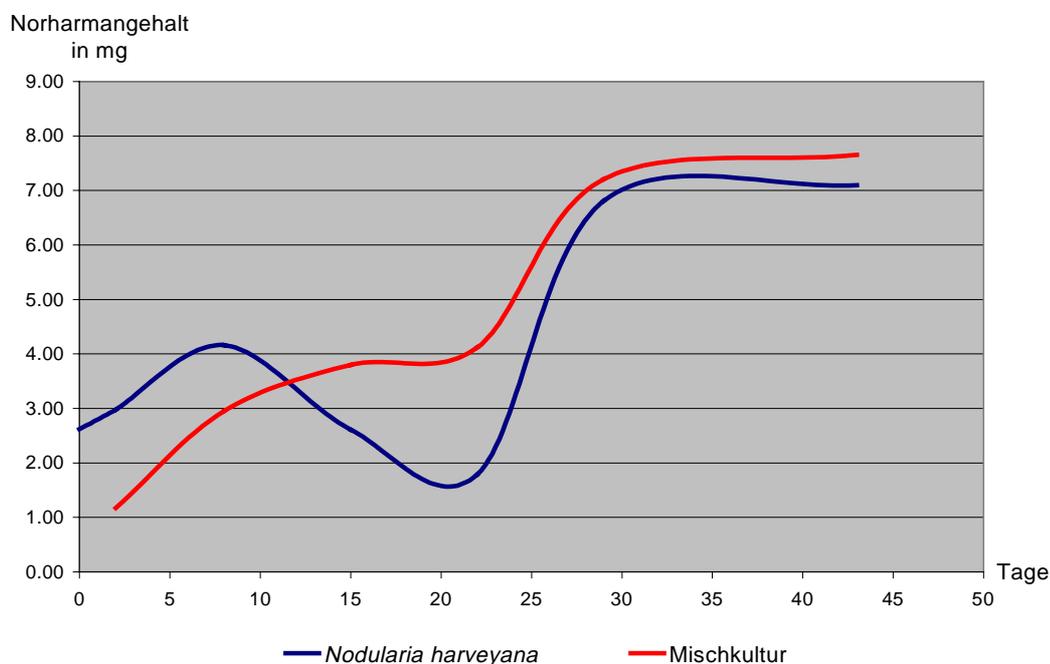
**Diagramm 5.2.4**

Vergleich der Norharmengehalte in der Biomasse der Kulturen von *Nodularia harveyana* und der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* (8 Liter)



### Diagramm 5.2.5

Vergleich der Norharmangehalte in den Nährlösungen der Kulturen von *Nodularia harveyana* und der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* (8 Liter)



In dem Diagramm 5.2.3 sind die unterschiedlichen Entwicklungen des Norharmangehalts in der Reinkultur von *Nodularia harveyana* und in der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* nebeneinander dargestellt. Beide Kulturen zeigten einen deutlichen Anstieg des Gehalts, der sich aber bezüglich der Kulturen untereinander kaum unterschied.

Aus den Diagrammen 5.2.4 und 5.2.5 geht hervor, daß der Norharmangehalt in den Biomassen der beiden Kulturen sehr ähnlich anstieg, allerdings stieg der Norharmangehalt in der Biomasse von *Nodularia harveyana* am Ende stärker an und übertraf damit den Norharmangehalt in der Biomasse der Mischkultur. Die Entwicklung des Norharmangehalts in den Nährlösungs-extrakten sah anders aus: Hier stieg der Gehalt in der Nährlösung der Mischkultur stärker an und lag schließlich oberhalb dem der Reinkultur von *Nodularia harveyana*.

### 5.3 Zusammenfassung und Diskussion

Wie man in den fünf Diagrammen sehen kann, stieg der Norharmengehalt sowohl in der Reinkultur von *Nodularia harveyana* als auch in der Mischkultur mit *Spirulina laxissima* mit zunehmenden Alter der Kultur an. Dieses entspricht auch den Beobachtungen, daß Sekundärmetaboliten, wie das Alkaloid Norharman, vorwiegend in der stationären Wachstums-phase oder in langsam wachsenden Kulturen gefunden werden (BOROWITZKA,1995). Interessant ist die Tatsache, daß sich der Norharmengehalt unterschiedlich auf die Bestandteile Biomasse und Nährlösung in der Gesamtkultur verteilte, wobei, wie in den Diagrammen 5.2.1 und 5.2.2 zu sehen ist, auf die Biomasse nur etwa ein Viertel bis ein Drittel des Gesamtnorharmangehalts entfiel. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Substanz aktiv vom Organismus ausgeschieden wurde, da offenbar kein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Biomasse und Kulturmedium bestand.

Beim Vergleich der Reinkultur von *Nodularia harveyana* mit der Mischkultur von *Nodularia harveyana* mit *Spirulina laxissima* ließ sich bezüglich des Gesamtnorharmangehalts (Diagramm 5.2.3) kein signifikanter Unterschied feststellen. Wenn man aber den Gehalt in der Biomasse beziehungsweise in den Nährlösungen der beiden Kulturen miteinander vergleicht (Diagramm 5.2.4 und 5.2.5), so fällt auf, daß in der Biomasse der Mischkultur der Norharmengehalt gegenüber dem in der Reinkultur nach 43 Tagen abfiel. Dagegen verhielt es sich bezogen auf die Nährlösungsextrakte umgekehrt: Hier enthielt nach 43 Tagen der Nährlösungsextrakt der Mischkultur mehr Norharman als der Extrakt der Reinkultur. Es befanden sich also lediglich rund 24% des durchschnittlichen Gesamtnorharmangehalts in der Biomasse und 76 % in der Nährlösung der Mischkultur, während es in der Reinkultur von *Nodularia harveyana* rund 33% Norharman in der Biomasse und nur 67% in der Nährlösung waren. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Schwankungen im Rahmen der Statistik lagen oder ob sie tatsächlich relevant sind. Wenn letzteres zuträfe, könnte für den Konkurrenzorganismus *Spirulina laxissima* zwar keinen Einfluß auf die Menge des ausgeschiedenen Norharman, aber auf dessen Verteilung in der Kultur nachgewiesen werden. Der höhere Anteil an extrazellulärem Norharman könnte eventuell darauf hinweisen, daß das Cyanobakterium *Nodularia harveyana* versucht, den Konkurrenzorganismus durch das Ausscheiden einer erhöhten Norharmankonzentration zu hemmen. Eine solche Stimulierung der Inhibitorausscheidung in Gegenwart möglicher Konkurrenten könnte eine Art

Kontrollmechanismus sein, der das Überleben des Cyanobakteriums im Sinne eines kompetitiven Vorteils sichert (PAERL & MILLIE,1996).

Ob diese Vermutung hier zutrifft, müßte durch weitere Untersuchungen anhand einer größeren Anzahl von Mischkulturen belegt und statistisch abgesichert werden. Die hier durchgeführte Untersuchung von lediglich einer Mischkultur lieferte zwar interessante Hinweise, aber keine Beweise auf eine solche induzierbare Norharmanexkretion.

## **6 Charakterisierung der Biomassenzusammensetzung im Hinblick auf eine eventuelle Massenkultivierung und mehrfache Verwendung der Mikroalgen**

Die hier geschilderten Untersuchungen der Nährlösungsextrakte der Mikroalgen hatten gezeigt, daß die Metaboliten nur in geringen Konzentrationen in den Nährlösungen enthalten waren. Falls sich nun aufgrund von Bio-Assays herausstellen sollte, daß einige dieser Metaboliten eine interessante und nutzbare biologische Aktivität aufweisen, dann würde sich sofort die Frage nach der Groß-Produktion dieser Substanzen stellen. Hierzu wären aber – abgesehen von einer eventuellen chemischen Synthese – große Mengen an Nährlösung und damit große Kulturen notwendig. Darüber hinaus wäre es im Hinblick auf Wirtschaftlichkeit am sinnvollsten, solche Massenkulturen zu nutzen, deren Biomasse auch für andere Zwecke verwendet werden kann. Dieser letztere Aspekt sollte hier einbezogen werden.

Massenkulturen von Mikroalgen werden bereits seit den sechziger Jahren für die Gewinnung interessanter Inhaltsstoffe genutzt. Zur Gewinnung von Carotinoiden, insbesondere des  $\beta$ -Carotins, wird vor allem *Dunaliella salina* kultiviert, während die Massenzucht von *Haematococcus*-Arten zur Gewinnung von Astaxanthin dient (BOROWITZKA,1988 a). Dieses Ketocarotinoid wird vor allem in der Aquakultur (zum Beispiel in der Lachszucht) eingesetzt. Um Proteine und damit auch essentielle Aminosäuren zu erhalten, werden *Chlorella*-Arten für die Produktion von L-Prolin (LEAVITT,1983) gezüchtet, aber auch *Spirulina*- und *Scenedesmus*-Arten, die gleichzeitig auch wertvolle essentielle Fettsäuren wie  $\alpha$ -Linolensäure und wichtige Vitamine liefern und damit als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden können (BOROWITZKA,1988 b).

Andere Massenkulturen wie die von *Porphyridum cruentum* liefern Polysaccharide, die unter anderem als Gelier- und Dispergiermittel in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden (SANDFORD & BAIRD,1983).

Einige der hier auf Nährlösungsmetaboliten untersuchten Mikroalgen wurden deshalb zusätzlich auf die Zusammensetzung ihrer Biomasse geprüft, und zwar bezüglich Proteingehalt, Carotinoid- und Phycobiliproteinzusammensetzung sowie Fettsäuregehalt und -zusammensetzung.

Untersucht wurden die Biomassen folgender Cyanobakterien:

- *Chroococcus minutus*
- *Nodularia harveyana*
- *Nodularia spumigena*
- *Spirulina laxissima*
- Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*

## 6.1 Untersuchungen der Biomasse auf Fettsäuren

Mikroalgen enthalten sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren, die zum größten Teil als Triglyceride, Phospholipide und Glycolipide gebunden vorliegen. Sie dienen den Organismen einerseits als Energiequelle und als Lieferant verschiedener Metaboliten, andererseits sind sie Bestandteile der Biomembranen. Freie Fettsäuren kommen nur selten vor. Die häufigsten gesättigten Fettsäuren in Cyanobakterien sind die geradzahligen C 12:0- bis C 18:0-Fettsäuren. Ungesättigte Fettsäuren werden meistens in größerer Vielfalt produziert, so reicht die Kettenlänge von C 14 bis C 20 und die Anzahl der Doppelbindungen von 1 bis 4 (POHL,1982). Diese sind besonders interessant für den medizinisch-pharmazeutischen Bereich, vor allem die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure. Sie sind für den Menschen essentiell, das heißt, sie können nicht selber vom Körper synthetisiert werden, sondern müssen mit pflanzlicher Nahrung aufgenommen werden. Ihre Bedeutung liegt in der Bildung von körpereigenen Botenstoffen, zum Beispiel von Prostaglandinen, die für die Regulierung vieler physiologischer Funktionen zuständig sind. Ein Mangel kann zu Krankheiten wie Schizophrenie und Thrombosen führen. Außerdem werden diese essentiellen Fettsäuren unter anderem zur Behandlung von Hyperlipidämien und Arteriosklerose eingesetzt (BOROWITZKA,1988 b).

Um gegen diese Krankheiten unterstützend zu wirken und um Mangelzustände zu vermeiden, können Mikroalgen, die reich an solchen Fettsäuren sind, als Nahrungsergänzungsmittel dienen. Dabei ist bemerkenswert, daß einige Cyanobakterien auch große Mengen an  $\gamma$ -Linolensäure produzieren (KENYON et al.,1972), darunter *Calothrix* sp. und *Arthrospira* sp.. Diese nicht-essentielle Fettsäure, die aus Linolsäure gebildet werden kann, wird zur Behandlung der Neurodermitis eingesetzt.

Die Lipide wurden direkt aus der Biomasse in einem Schritt lipophil extrahiert und die Fettsäuren durch Umesterung methyliert (GARCÉS & MANCHA,1993). Die erhaltenen Fettsäuremethylester konnten dann gaschromatographisch aufgetrennt werden. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte zum einen über den Vergleich der Retentionszeiten mit denen eines Fettsäurestandards, zum anderen durch Kombination des Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer. Die erhaltenen Massenspektren wurden mit Hilfe einer Spektrenbibliothek den entsprechenden Fettsäuren zugeordnet. Die Quantifizierung erfolgte über die Verwendung von Heptadecansäure als Internen Standard, der in einer definierten Konzentration den Analysen zugefügt wurde.

Die erhaltenen Werte stellen Durchschnittswerte aus verschiedenen Kulturen der jeweiligen Mikroalge dar. Die erste Spalte zeigt die Werte in Prozent bezogen auf die getrocknete Biomasse, und aus der zweiten Spalte kann man die prozentuale Verteilung der verschiedenen Fettsäuren bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt ersehen.

**Tabelle 6.1.1**

|                          | <i>Chroococcus minutus</i> |        |
|--------------------------|----------------------------|--------|
| C 14:0                   | 0,42 %                     | 33,1 % |
| C 14: 1 <sup>9</sup> cis | 0,29 %                     | 22,8 % |
| C 16:0 iso               | 0,16 %                     | 12,6 % |
| C 16:0                   | 0,16 %                     | 12,6 % |
| C 16:1 <sup>9</sup> cis  | 0,07 %                     | 5,5 %  |
| C 18:0                   | /                          | /      |
| C 18:1 <sup>9</sup> cis  | 0,06 %                     | 4,7 %  |
| C 18:2 <sup>9,12</sup>   | /                          | /      |
| C 18:3 $\alpha$          | 0,11 %                     | 8,7 %  |
| Gesamtgehalt             | 1,27 %                     | 100 %  |

**Tabelle 6.1.2**

|                          | <i>Nodularia spumigena</i> |        |
|--------------------------|----------------------------|--------|
| C 14:0                   | /                          | /      |
| C 14: 1 <sup>9</sup> cis | /                          | /      |
| C 16:0 iso               | /                          | /      |
| C 16:0                   | 0,95 %                     | 40,8 % |
| C 16:1 <sup>9</sup> cis  | 0,36 %                     | 15,5 % |
| C 18:0                   | 0,08 %                     | 3,4 %  |
| C 18:1 <sup>9</sup> cis  | 0,26 %                     | 11,2 % |
| C 18:2 <sup>9,12</sup>   | 0,44 %                     | 18,8 % |
| C 18:3 $\alpha$          | 0,08 %                     | 3,4 %  |
| C 18:3 $\gamma$          | 0,16 %                     | 6,9 %  |
| Gesamtgehalt             | 2,33 %                     | 100 %  |

**Tabelle 6.1.3**

|                          | <i>Nodularia harveyana</i> |        |
|--------------------------|----------------------------|--------|
| C 14:0                   | /                          | /      |
| C 14: 1 <sup>9</sup> cis | /                          | /      |
| C 16:0 iso               | 0,21 %                     | 5,3 %  |
| C 16:0                   | 1,44 %                     | 36,1 % |
| C 16:1 <sup>9</sup> cis  | 0,14 %                     | 3,5 %  |
| C 18:0                   | 0,08 %                     | 2 %    |
| C 18:1 <sup>9</sup> cis  | 0,54 %                     | 13,5 % |
| C 18:2 <sup>9,12</sup>   | 1,34 %                     | 33,6 % |
| C 18:3 $\alpha$          | 0,24 %                     | 6 %    |
| Gesamtgehalt             | 3,99 %                     | 100 %  |

**Tabelle 6.1.4**

|                          | <i>Spirulina laxissima</i> |        |
|--------------------------|----------------------------|--------|
| C 14:0                   | 0,07 %                     | 1,7 %  |
| C 14: 1 <sup>9</sup> cis | 0,37 %                     | 8,9 %  |
| C 16:0 iso               | /                          | /      |
| C 16:0                   | 1,73 %                     | 41,8 % |
| C 16:1 <sup>9</sup> cis  | 0,28 %                     | 6,8 %  |
| C 18:0                   | 0,12 %                     | 2,9 %  |
| C 18:1 <sup>9</sup> cis  | 0,53 %                     | 12,8 % |
| C 18:2 <sup>9,12</sup>   | 0,33 %                     | 8 %    |
| C 18:3 $\alpha$          | 0,71 %                     | 17,1 % |
| Gesamtgehalt             | 4,14 %                     | 100 %  |

**Tabelle 6.1.5**

|                          | Mischkultur<br><i>Nodularia harveyana/Spirulina laxissima</i> |        |
|--------------------------|---|--------|
| C 14:0                   | /   | /      |
| C 14: 1 <sup>9</sup> cis | /   | /      |
| C 16:0 iso               | 0,14 %  | 4,1 %  |
| C 16:0                   | 1,22 %  | 35,6 % |
| C 16:1 <sup>9</sup> cis  | 0,12 %  | 3,5 %  |
| C 18:0                   | 0,12 %  | 3,5 %  |
| C 18:1 <sup>9</sup> cis  | 0,45 %  | 13,3 % |
| C 18:2 <sup>9,12</sup>   | 1,16 %  | 34,1 % |
| C 18:3 $\alpha$          | 0,19 %  | 5,6 %  |
| Gesamtgehalt             | 3,4 %   | 100 %  |

Den geringsten Gehalt an Fettsäuren unter den untersuchten Cyanobakterien besaß *Chroococcus minutus* mit 1,27%. Das Fettsäuremuster unterschied sich von allen anderen durch das gleichzeitige Vorkommen von Myristoleinsäure und der verzweigten iso-Palmitinsäure. Stearinsäure und die ungesättigte Fettsäure Linolsäure konnten nicht nachgewiesen werden.

*Spirulina laxissima* hatte den höchsten Gehalt an Fettsäuren (4,14%), wobei ebenso wie bei *Nodularia spumigena* die verzweigte iso-Palmitinsäure nicht nachweisbar war. Den größten Anteil am Gesamtfettsäuregehalt trugen Palmitinsäure (41,8%), Ölsäure (12,8%) und  $\alpha$ -Linolensäure (17,1%).

Ein noch höherer Anteil an Palmitinsäure war bei *Nodularia spumigena* (45,5%) zu beobachten, wobei der Fettsäuregesamtgehalt mit 2,09% insgesamt aber deutlich niedriger war. In *Nodularia spumigena* waren beide Linolensäureformen,  $\alpha$  und  $\gamma$ , wenn auch die  $\gamma$ -Linolensäure nur in Spuren, nachweisbar.

Bei *Nodularia harveyana* betrug der Fettsäuregesamtgehalt 3,99% und lag damit ebenfalls unterhalb dem von *Spirulina laxissima*. Dafür fiel der im Vergleich zu *Spirulina laxissima* höhere Gehalt bezüglich der ungesättigten Fettsäure Linolsäure (1,34% gegenüber 0,33%) auf. Die Mischkultur ähnelte sowohl quantitativ als auch qualitativ in ihrer Fettsäurezusammensetzung stark der Kultur von *Nodularia harveyana*. Dieses wurde auch durch das Fehlen von Myristin- und Myristoleinsäure deutlich, die in der Kultur von *Spirulina laxissima* vorkamen, während sie in *Nodularia harveyana* nicht nachzuweisen waren.

Die höherkettigen Fettsäuren Arachinsäure und Arachidonsäure wurden in den untersuchten Cyanobakterien nicht gefunden.

### Zusammenfassung

Die hier untersuchten Kulturen enthielten in ihrer Biomasse durchschnittlich 3% Gesamtfettsäuren. Die Einzelwerte reichten von 1,27% (*Chroococcus minutus*) bis zu 4,14% (*Spirulina laxissima*). Bei der Kultur von *Spirulina laxissima* fiel ihr hoher Gehalt an  $\alpha$ -Linolensäure, die für den Menschen essentiell ist, auf. Sie erzielte damit den höchsten  $\alpha$ -Linolensäuregehalt unter den hier untersuchten Cyanobakterien (0,71%, bezogen auf die Gesamtbiomasse, und 17,1%, bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt). Zum Vergleich: In *Spirulina* sp. wurde bei BECKER & VENKATARAMAN (1982) für  $\alpha$ -Linolensäure ein Wert von

10,36%, bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt gefunden. RICHMOND (1988) gab für *Spirulina platensis* für Linolsäure einen Gehalt von 1,24%, bezogen auf die Gesamtbiomasse an. Dieser Wert wurde von der hier untersuchten *Spirulina laxissima*-Kultur (0,33%) allerdings nicht erreicht.

Als einzige unter den hier untersuchten Cyanobakterien war  $\gamma$ -Linolensäure in der Kultur von *Nodularia spumigena* nachweisbar, allerdings nur in Spuren, so daß eine diesbezügliche Nutzung eigentlich nicht in Frage kommt.

Bemerkenswertes Detail war der hohe Gehalt an Linolsäure (1,34%) in der Kultur von *Nodularia harveyana*, der über dem von RICHMOND (1988) angegebenen Wert für *Spirulina platensis* lag.

Insgesamt kämen für eine Nutzung aufgrund von essentiellen Fettsäuren am ehesten die Kulturen von *Nodularia harveyana* wegen ihres hohen Anteils an Linolsäure und von *Spirulina laxissima* wegen ihres hohen Anteils an  $\alpha$ -Linolensäure in Frage.

## 6.2 Untersuchungen der Biomasse auf Carotinoide und Chlorophylle

Carotinoide bilden zusammen mit den Chlorophyllen und Phycobiliproteinen die für den Ablauf der Photosynthese notwendigen Pigmente der Mikroalgen. Sie kommen in allen photosynthese-betreibenden Organismen vor und werden wegen ihrer unterstützenden Funktion bei der Photosynthese auch als akzessorische Pigmente bezeichnet. Man unterscheidet Carotine, welche reine Kohlenwasserstoffe darstellen, und Xanthophylle, bei denen es sich um sauerstoffhaltige Derivate der Carotine handelt (HERDER-LEXIKON DER BIOLOGIE, 1994 a).

Cyanobakterien enthalten neben  $\beta$ -Carotin vor allem die Ketocarotinoide Zeaxanthin und Echinenon, daneben auch Canthaxanthin und Oscillaxanthin. Da ihnen die  $\epsilon$ -Cyclase fehlt, die den  $\epsilon$ -Ionenring bildet, bilden sie kein  $\alpha$ -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin, die dagegen in Chlorophyceen vorkommen. Andererseits enthalten sie Myxoxanthophyll, das auch in Bakterien vorkommt, aber in eukaryotischen Algen fehlt (VAN DEN HOEK, 1993).

Das  $\beta$ -Carotin ist aus pharmazeutischer Sicht ein interessanter Inhaltsstoff von Mikroalgen. Es wird im menschlichen Körper zu Vitamin A umgebaut, weswegen es auch als Provitamin A bezeichnet wird. Darüber hinaus besitzt es antioxidative Eigenschaften, da es Singulett-Sauerstoffradikale abfangen kann, so daß es in der Prävention von Arteriosklerose, koronarer

Herzkrankheit und Lichtdermatosen eingesetzt wird (HÖTZEL,1996; KINDL,1995). Außerdem ist  $\beta$ -Carotin als Lebensmittelfarbstoff zum Färben von Butter sowie als Farbstoff in Kosmetikprodukten zugelassen (HÖTZEL,1996).

$\beta$ -Carotin und andere Carotinoide, vor allem die Xanthophylle werden in der Tierzucht dem Futter beigemischt, um unter anderem die Farbe von Eigelb zu intensivieren (BAUERNFEIND et al.,1971) oder das Fleisch von Lachsen mit Hilfe von Astaxanthin rosa zu färben (BENEMANN,1992).

Es gibt bereits Massenkulturen zur Gewinnung von  $\beta$ -Carotin, vor allem von *Dunaliella salina* (BOROWITZKA & BOROWITZKA,1988), wobei durch geeignete Kultivierungsbedingungen der Gehalt stark gesteigert werden kann (NELIS & DE LEENHEER,1991).

Chlorophylle werden in die Chlorophylle a - e eingeteilt und sind wie die Carotinoide ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet. Nur Chlorophyll a ist essentiell an allen Photosynthesereaktionen beteiligt, während die Chlorophylle b - e zu den akzessorischen Pigmenten gerechnet werden (LEISTNER,1992). In Cyanobakterien und Rhodophyceen kommt lediglich Chlorophyll a vor, während Chlorophyceen zusätzlich Chlorophyll b aufweisen (VAN DEN HOEK,1993).

Chlorophylle werden weniger aus Algen als aus Landpflanzen wie zum Beispiel der Brennnessel gewonnen (KOCH & HÜHNLER, 1995). Sie werden als Farbstoffe verwendet, besitzen aber auch desodorierende Eigenschaften, die zum Beispiel in Lutschtabletten gegen Mundgeruch zum Tragen kommen.

Die Carotinoide und Chlorophylle wurden lipophil aus der Biomasse extrahiert und der erhaltene Extrakt zur quantitativen Bestimmung des Carotinoid- und des Chlorophyllgehalts bei jeweils verschiedenen Wellenlängen photometrisch vermessen (DAVIES,1976; HARBOURNE,1984). Anschließend wurde die qualitative und quantitative Zusammensetzung mit Hilfe der HPLC unter Verwendung von Referenzsubstanzen als Vergleich bestimmt (NELIS & DE LEENHEER,1983 und 1987).

Die erhaltenen Werte für die einzelnen Carotinoide stellen Durchschnittswerte aus verschiedenen Kulturen einer Mikroalge dar. Die erste Spalte zeigt die absolut erhaltenen Werte bezogen auf die vermessene Extraktlösung, die zweite Spalte gibt die Werte in Prozent bezogen auf die getrocknete Biomasse an, und in der dritten Spalte stehen die Werte bezogen

auf den Gesamtcarotinoidgehalt. Der Wert für den Gesamtchlorophyllgehalt entspricht dem Wert für Chlorophyll a , weil Cyanobakterien nur dieses Chlorophyll besitzen.

**Tabelle 6.2.1**

|                         | <i>Chroococcus minutus</i> |         |        |
|-------------------------|----------------------------|---------|--------|
| Carotinoid (n.i.)       | 3,5 mg l <sup>-1</sup>     | 0,05 %  | 19,4 % |
| Astaxanthin             | /                          | /       | /      |
| Canthaxanthin           | /                          | /       | /      |
| Zeaxanthin              | 3,4 mg l <sup>-1</sup>     | 0,049 % | 19,2 % |
| Echinenon               | 6,6 mg l <sup>-1</sup>     | 0,1 %   | 36,6 % |
| β-Carotin               | 4,4 mg l <sup>-1</sup>     | 0,064 % | 24,8 % |
| Gesamt-carotinoidgehalt | 17,9 mg l <sup>-1</sup>    | 0,26 %  | 100 %  |
| Chlorophyll a           | 0,3 mg l <sup>-1</sup>     | 0,003 % | 100 %  |

**Tabelle 6.2.2**

|                         | <i>Nodularia spumigena</i> |         |        |
|-------------------------|----------------------------|---------|--------|
| Carotinoid (n.i.)       | 4,4 mg l <sup>-1</sup>     | 0,06 %  | 19,9 % |
| Astaxanthin             | 0,6 mg l <sup>-1</sup>     | 0,009 % | 2,9 %  |
| Canthaxanthin           | 2,1 mg l <sup>-1</sup>     | 0,03 %  | 9,5 %  |
| Zeaxanthin              | /                          | /       | /      |
| Echinenon               | 8,3 mg l <sup>-1</sup>     | 0,12 %  | 37,8 % |
| β-Carotin               | 6,6 mg l <sup>-1</sup>     | 0,1 %   | 29,9 % |
| Gesamt-carotinoidgehalt | 22 mg l <sup>-1</sup>      | 0,32 %  | 100 %  |
| Chlorophyll a           | 3,9 mg l <sup>-1</sup>     | 0,04 %  | 100 %  |

**Tabelle 6.2.3**

|                         | <i>Nodularia harveyana</i> |         |        |
|-------------------------|----------------------------|---------|--------|
| Carotinoid (n.i.)       | 11,6 mg l <sup>-1</sup>    | 0,17 %  | 37,6 % |
| Astaxanthin             | /                          | /       | /      |
| Canthaxanthin           | 0,8 mg l <sup>-1</sup>     | 0,012 % | 2,7 %  |
| Zeaxanthin              | /                          | /       | /      |
| Echinenon               | 7,5 mg l <sup>-1</sup>     | 0,11 %  | 24,3 % |
| β-Carotin               | 11 mg l <sup>-1</sup>      | 0,16 %  | 35,4 % |
| Gesamt-carotinoidgehalt | 30,9 mg l <sup>-1</sup>    | 0,45 %  | 100 %  |
| Chlorophyll a           | 9,3 mg l <sup>-1</sup>     | 0,13 %  | 100 %  |

**Tabelle 6.2.4**

|                         | <i>Spirulina laxissima</i> |         |        |
|-------------------------|----------------------------|---------|--------|
| Carotinoid (n.i.)       | 5,5 mg l <sup>-1</sup>     | 0,081 % | 24 %   |
| Astaxanthin             | /                          | /       | /      |
| Canthaxanthin           | /                          | /       | /      |
| Zeaxanthin              | 5,6 mg l <sup>-1</sup>     | 0,082 % | 24,1 % |
| Echinenon               | 1,3 mg l <sup>-1</sup>     | 0,018 % | 5,3 %  |
| β-Carotin               | 10,9 mg l <sup>-1</sup>    | 0,158 % | 46,6 % |
| Gesamt-carotinoidgehalt | 23,3 mg l <sup>-1</sup>    | 0,34 %  | 100 %  |
| Chlorophyll a           | 1,8 mg l <sup>-1</sup>     | 0,01 %  | 100 %  |

Tabelle 6.2.5

|                             | Mischkultur aus<br><i>Nodularia harveyana/Spirulina laxissima</i> |        |        |
|-----------------------------|---|--------|--------|
| Carotinoid (n.i.)           | 10,5 mg l <sup>-1</sup>   | 0,16 % | 37,3 % |
| Astaxanthin                 | /   | /      | /      |
| Canthaxanthin               | 1,1 mg l <sup>-1</sup>  | 0,01 % | 3,9 %  |
| Zeaxanthin                  | /   | /      | /      |
| Echinenon                   | 6,5 mg l <sup>-1</sup>  | 0,09 % | 23,1 % |
| β-Carotin                   | 10 mg l <sup>-1</sup>   | 0,15 % | 35,6 % |
| Gesamt-<br>carotinoidgehalt | 28,1 mg l <sup>-1</sup>   | 0,41 % | 100 %  |
| Chlorophyll a               | 7,1 mg l <sup>-1</sup>  | 0,09 % | 100 %  |

Das in den Tabellen als Carotinoid (n.i.) angegebene nicht eindeutig identifizierte Carotinoid wurde als erstes eluiert und hatte bei allen untersuchten Kulturen eine Retentionszeit von 5,6 bis 5,7 Minuten. Es handelte sich dabei höchstwahrscheinlich um eines der polaren Carotinoide, wie Myxoxanthophyll oder Oscillaxanthin. Diese enthalten als einzige unter den Carotinoiden in ihrem Molekül einen beziehungsweise zwei O-glycosidisch gebundene Rhamnosreste. Die Absorptionsmaxima des unbekanntes Carotinoids wurden mit den in der Literatur angegebenen Werten für Myxoxanthophyll und Oscillaxanthin verglichen. Der Vergleich zeigte, daß diese Werte bei *Nodularia harveyana*, *Spirulina laxissima* und der Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* gut mit denen von Myxoxanthophyll übereinstimmten. Bei *Nodularia spumigena* und *Chroococcus minutus* hingegen stimmten die Absorptionsmaxima mehr mit denen von Oscillaxanthin überein, so daß vermutet werden konnte, daß hier Myxoxanthophyll in so geringen Mengen vorhanden war, daß es entweder nicht detektiert wurde oder von Oscillaxanthin überdeckt wurde.

Den höchsten prozentualen Carotinoidgehalt bezogen auf die getrocknete Biomasse wies die Kultur von *Nodularia harveyana* mit 0,45% auf, während die anderen untersuchten Kulturen Werte zwischen 0,26% (*Chroococcus minutus*) und 0,41% (Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*) besaßen. Letztere lag mit dem Wert von 0,41% nahe an dem Wert der Kultur von *Nodularia harveyana*.

Die Zusammensetzung der Gesamtcarotinoide war innerhalb der untersuchten Kulturen vergleichbar. Der Anteil an  $\beta$ -Carotin und an Echinenon war besonders hoch, nur bei *Spirulina laxissima* überwog Zeaxanthin gegenüber Echinenon. Bei *Nodularia harveyana*, *Spirulina laxissima* und der Mischkultur aus beiden fiel auch der hohe Anteil des unbekanntes Carotinoids auf. Die Mischkultur wies nicht nur in der Höhe ihres Carotinoidgehaltes, sondern auch in der Zusammensetzung der Carotinoide sehr viel Ähnlichkeit mit der Kultur von *Nodularia harveyana* auf.

Auch der Chlorophyllgehalt war in der Kultur von *Nodularia harveyana* mit 0,13% am höchsten. Einen auffallend niedrigen Wert (0,003%) besaß die Kultur von *Chroococcus minutus*.

### Zusammenfassung

Die Gesamtcarotinoidgehalte der hier untersuchten Cyanobakterien schwanken zwischen 0,26% (*Chroococcus minutus*) und 0,47% (*Nodularia harveyana*). Durchschnittlich sind 0,36% Gesamtcarotinoide enthalten, wobei keine großen Abweichungen von diesem Wert zu beobachten waren. Die Werte für den  $\beta$ -Carotin-Gehalt bewegen sich in einem Rahmen von 0,064% (*Chroococcus minutus*) bis 0,16% (*Nodularia harveyana*). Diese Werte sind im Vergleich zu denen in Chlorophyceen, die aufgrund ihres hohen  $\beta$ -Carotin-Gehalts im kommerziellen Maßstab gezüchtet werden, gering. So enthielt *Dunaliella salina* bereits 0,5 %  $\beta$ -Carotin, wobei dieser Gehalt durch besondere Kulturbedingungen (unter anderem erhöhte Temperatur, erhöhte Belichtung, erhöhter Salzgehalt der Nährlösung) auf bis zu 14% gesteigert werden konnte (BOROWITZKA & BOROWITZKA,1988). Dabei wurde nur der  $\beta$ -Carotin-Gehalt überproportional gesteigert: Dessen Anteil an den Gesamtcarotinoiden stieg von 50% auf fast 90%, während die Gehalte der anderen Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin gleich blieben oder sogar abnahmen. Im Vergleich dazu besaßen die hier untersuchten Cyanobakterien einen  $\beta$ -Carotin-Anteil von 24,8% (*Chroococcus minutus*) bis 46,5% (*Spirulina laxissima*). Für Cyanobakterien kämen solche Veränderungen der Züchtungsparameter zur Steigerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts allerdings nicht in Frage, da es unter diesen Streßbedingungen zu einer Zerstörung der Zellen kommen würde (VOLK,1996).

Für eine Gewinnung von  $\beta$ -Carotin kämen von den untersuchten Mikroalgen aufgrund des Gehalts, der sich bei allen drei Kulturen um  $10 \text{ mg l}^{-1}$  bewegte, die Kulturen von *Spirulina laxissima*, von *Nodularia harveyana* und der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* in Frage. Interessant erschien die Kultur von *Spirulina laxissima* auch aufgrund ihres Zeaxanthin-Gehalts, da die anderen untersuchten Cyanobakterien dieses Carotinoid entweder nicht oder in nur geringen Mengen führten. Zeaxanthin kommt in größeren Mengen vor allem in Rhodophyceen und Chlorophyceen vor, während es in Cyanobakterien eher selten ist und in anderen Algen gar nicht vorkommt (BOROWITZKA, 1988 a).

Ein anderes seltenes und daher um so wertvolleres Carotinoid ist das Echinenon. Es ist lediglich in geringen Mengen in Cyanobakterien und Haptophyceen zu finden. Dieses Biosynthesenzwischenprodukt aus dem Abbau von  $\beta$ -Carotin zu Canthaxanthin gehört ebenso wie dieses zu den photoprotektiven Pigmenten. Für eine diesbezügliche Gewinnung kämen vor allem die Kulturen von *Nodularia spumigena* und von *Nodularia harveyana* in Frage.

Die Chlorophyll-Gehalte der untersuchten Cyanobakterien variierten sehr: Durchschnittlich enthielten sie  $4,48 \text{ mg l}^{-1}$  beziehungsweise 0,05% Chlorophyll a, wobei die Werte von  $0,3 \text{ mg l}^{-1}$  (*Chroococcus minutus*) bis  $9,3 \text{ mg l}^{-1}$  (*Nodularia harveyana*) reichten. Diese Werte liegen in dem Bereich, den auch DOWNES et al.(1993) für den *Oscillatoria*-, *Phormidium*- und *Nostoc* sp. enthaltenen Benthos in der Antarktis angeben. So wurden dort Chlorophyll a-Werte von  $6,94 \text{ mg l}^{-1}$  Extraktlösung gefunden.

Die Gewinnung von Chlorophyll aus den untersuchten Kulturen lohnt sich wahrscheinlich aufgrund des geringen Gehalts nicht.

### 6.3 Untersuchungen der Biomasse auf Phycobiliproteine

Die Phycobiliproteine gehören ebenfalls zu den akzessorischen Pigmenten der Photosynthese und sind charakteristisch für Cyanobakterien, Rhodophyceen, Cryptophyceen und Glaucophyceen. Sie absorbieren das Licht im Wellenlängenbereich von 500 bis 650 nm, der von Chlorophyll nicht abgedeckt wird, so daß phycobiliproteinhaltige Algen auch das Licht im tieferen Wasser oder im Schatten anderer Algen nutzen können (HERDER-LEXIKON DER BIOLOGIE,1994 b). Die drei häufigsten Phycobiliproteine sind Phycocyanin und Allophycocyanin, die beide blau gefärbt sind, sowie Phycoerythrin, das eine rote Farbe besitzt.

Die Phycobiliproteine aus Mikroalgen werden als natürliche Pigmente vielfältig genutzt. So wird besonders das Phycocyanin aus *Spirulina platensis* genutzt. In Japan ist es unter dem Namen „Linablue“ als Lebensmittelfarbstoff zugelassen, außerdem wird es zur Färbung kosmetischer Produkte sowie in der pharmazeutischen Technologie zur Färbung von verschiedenen Arzneistoffformulierungen verwendet (COHEN,1986). Im Gegensatz zu den Carotinoiden und Chlorophyllen handelt es sich um hydrophile Pigmente.

Für die quantitative Gehaltsbestimmung wurden sie deshalb hydrophil mit Hilfe einer wäßrigen Pufferlösung aus der Biomasse extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden anschließend photometrisch vermessen und der Gehalt nach BENNETT & BOGORAD (1973) berechnet.

Die erhaltenen Werte für die einzelnen Phycobiliproteine stellen Durchschnittswerte aus verschiedenen Kulturen einer Mikroalge dar. Die erste Spalte zeigt die absolut erhaltenen Werte bezogen auf die vermessene Extraktlösung, die zweite Spalte gibt die Werte in Prozent bezogen auf die getrocknete Biomasse an, und in der dritten Spalte stehen die Werte bezogen auf den Gesamtphycobiliproteingehalt.

**Tabelle 6.3.1**

|                              | <i>Chroococcus minutus</i> |        |        |
|------------------------------|----------------------------|--------|--------|
| Phycocyanin                  | 0,0025 mg ml <sup>-1</sup> | 0,62 % | 43,1 % |
| Allophycocyanin              | 0,0017 mg ml <sup>-1</sup> | 0,43 % | 29,3 % |
| Phycoerythrin                | 0,0016 mg ml <sup>-1</sup> | 0,4 %  | 27,6 % |
| Gesamtphycobiliproteingehalt | 0,0058 mg ml <sup>-1</sup> | 1,45 % | 100 %  |

**Tabelle 6.3.2**

|                              | <i>Nodularia harveyana</i> |        |        |
|------------------------------|----------------------------|--------|--------|
| Phycocyanin                  | 0,023 mg ml <sup>-1</sup>  | 5,7 %  | 67,6 % |
| Allophycocyanin              | 0,01 mg ml <sup>-1</sup>   | 2,47 % | 29,4 % |
| Phycoerythrin                | 0,001 mg ml <sup>-1</sup>  | 0,25 % | 2,9 %  |
| Gesamtphycobiliproteingehalt | 0,034 mg ml <sup>-1</sup>  | 8,42 % | 100 %  |

**Tabelle 6.3.3**

|                              | <i>Nodularia spumigena</i> |         |         |
|------------------------------|----------------------------|---------|---------|
| Phycocyanin                  | 0,0042 mg ml <sup>-1</sup> | 1,05 %  | 50,6 %  |
| Allophycocyanin              | 0,0031 mg ml <sup>-1</sup> | 0,775 % | 37,35 % |
| Phycoerythrin                | 0,001 mg ml <sup>-1</sup>  | 0,25 %  | 12,05 % |
| Gesamtphycobiliproteingehalt | 0,0083 mg ml <sup>-1</sup> | 2,075 % | 100 %   |

**Tabelle 6.3.4**

|                              | <i>Spirulina laxissima</i> |         |         |
|------------------------------|----------------------------|---------|---------|
| Phycocyanin                  | 0,0047 mg ml <sup>-1</sup> | 1,175 % | 36,15 % |
| Allophycocyanin              | 0,0053 mg ml <sup>-1</sup> | 1,325 % | 40,77 % |
| Phycoerythrin                | 0,003 mg ml <sup>-1</sup>  | 0,75 %  | 23,08 % |
| Gesamtphycobiliproteingehalt | 0,013 mg ml <sup>-1</sup>  | 3,25 %  | 100 %   |

**Tabelle 6.3.5**

|                              | Mischkultur <i>Nodularia harveyana</i> / <i>Spirulina laxissima</i> |        |        |
|------------------------------|---|--------|--------|
| Phycocyanin                  | 0,0208 mg ml <sup>-1</sup>  | 5,17 % | 66 %   |
| Allophycocyanin              | 0,0097 mg ml <sup>-1</sup>  | 2,41 % | 30,8 % |
| Phycoerythrin                | 0,001 mg ml <sup>-1</sup>   | 0,25 % | 3,2 %  |
| Gesamtphycobiliproteingehalt | 0,0315 mg ml <sup>-1</sup>  | 7,84 % | 100 %  |

Den höchsten Gesamtphycobiliproteingehalt wies die Kultur von *Nodularia harveyana* mit 8,42% bezogen auf die getrocknete Biomasse auf, gefolgt von der Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* mit 7,84%. Es fällt auf, daß in diesen beiden Kulturen der Phycoerythrinanteil im Vergleich zu den anderen Kulturen mit 2,9% beziehungsweise 3,2%

recht niedrig war, dafür hatten letztere einen mit 67,6% und 66% einen höheren Phycocyaninanteil. Auch die Kultur von *Nodularia spumigena* besaß mit 50,6% einen relativ hohen Phycocyaninanteil. Den niedrigsten Phycobiliproteingehalt wies die Kultur von *Chroococcus minutus* mit 1,45% auf.

### *Zusammenfassung*

Der Gesamtphycobiliproteingehalt der hier untersuchten Cyanobakterien bewegte sich in einem Rahmen von 1,45% (*Chroococcus minutus*) bis 8,42% (*Nodularia harveyana*).

Für andere Cyanobakterien wurden bereits sowohl geringere als auch höhere Gesamtphycobiliproteingehalte gefunden: VOLK (1996) gab für *Phormidium*-, *Oscillatoria*- und *Synechocystis* sp. Werte von 2% bis 7%, und für *Anabaena*- und *Nostoc* sp. Werte von 5% bis 13%, je nach Alter der Kultur, an. Der Phycobiliproteingehalt von *Nostoc carneum* ließ sich durch geeignete Kultivierungsbedingungen (erhöhte Belichtung, Zugabe von Phytohormonen zur Nährlösung) auf bis zu 18,8% erhöhen.

Betrachtet man die Anteile der einzelnen Phycobiliproteine, so fällt auf, daß die beiden *Nodularia* sp. sowie die Mischkultur mit *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* einen sehr hohen Phycocyaninanteil (etwa 50% bis 70% der Gesamtphycobiliproteine) im Vergleich zu den anderen Phycobiliproteinen, besonders zu Phycoerythrin (etwa 2% bis 12%) aufwiesen. Bei *Spirulina laxissima* und *Chroococcus minutus* dagegen waren die Phycocyanin- und Allophycocyaninanteile relativ ausgeglichen (30% bis 43%) und die Phycoerythringehalte deutlich erhöht (23% und 27%).

Für die Gewinnung von Phycobiliproteinen insbesondere des Phycocyanins käme aufgrund der obigen Daten vor allem die Kultur von *Nodularia harveyana* in Frage, da die Kultur von *Nodularia spumigena* trotz ihres hohen Phycocyaninanteils einen insgesamt zu niedrigen Phycobiliproteingehalt aufwies.

#### 6.4 Untersuchungen der Biomasse auf den Proteingehalt

Eine weitere verwendungsrelevante Inhaltsstoffklasse von Mikroalgen sind Proteine beziehungsweise Aminosäuren. Die Aminosäurezusammensetzung variiert zwischen den Arten und hängt außerdem von den Kulturbedingungen und dem Alter der Kultur ab (BECKER,1988). Die beiden Hauptaminosäuren in den Proteinen von Mikroalgen sind Glutaminsäure und Asparaginsäure; weitere häufig vorkommende Aminosäuren sind Lysin, Tryptophan, Alanin und Phenylalanin, dagegen sind die schwefelhaltigen Vertreter Cystein und Methionin meist in nur geringen Mengen vorhanden oder fehlen ganz (BOROWITZKA,1988 a).

Aufgrund der zunehmenden Weltbevölkerung und der damit verbundenen Nachfrage nach proteinreicher Nahrung werden Mikroalgen aufgrund ihrer hohen Biomassenproduktion und ihres hohen Proteingehalts als Proteinquelle diskutiert. Als proteinreiche Kost haben Cyanobakterien einige Tradition. So wurden *Spirulina*-Arten in Mexiko von den Azteken verzehrt, und bei einigen afrikanischen Stämmen ist diese getrocknete Mikroalge unter der Bezeichnung „dihé“ als Nahrungszusatz bekannt (BECKER,1986).

Die Gewinnung der Proteine ist sowohl aus der Biomasse als auch aus dem Kulturmedium möglich. So wird zum Beispiel aus der Biomasse von *Chlorella* sp. L-Prolin gewonnen (LEAVITT,1983), während die Kieselalge *Chaetoceros debile* unter anderem Alanin, Histamin und Serin in das Medium sezerniert (POULE & MARTIN-JEZEQUEL,1983).

Normalerweise wird der Proteingehalt über einen Mikro-Kjeldahl-Aufschluß bestimmt, indem zunächst der Gesamtstickstoffgehalt gemessen wird und der erhaltene Wert anschließend mit dem Faktor 6,25 multipliziert wird. Der Nachteil dieser Rechnung ist, daß auf diese Weise auch stickstoffhaltige Nicht-Proteine wie zum Beispiel Nucleinsäuren und Amine miteinbezogen werden. Dieser Betrag kann bei *Spirulina* sp. bis zu 20% und bei *Scenedesmus* sp. bis zu 12% betragen, so daß oft zu hohe Werte für den Proteinhalt entstehen (BECKER,1988). Aus diesem Grund sind in der folgenden Tabelle 6.4.1 sowohl der Stickstoffgehalt als auch der daraus errechnete Proteingehalt beschrieben. Beide Werte sind in Prozent bezogen auf das Trockengewicht der Biomasse angegeben. Zusätzlich wurde die Stickstoffbestimmung zum einen mit Glucose als Blindwert, zum anderen mit Albumin als Kontrollwert durchgeführt.

Die erhaltenen Werte stellen Durchschnittswerte aus verschiedenen Kulturen einer Mikroalge dar. Den höchsten Stickstoff- beziehungsweise Proteingehalt wiesen die Kulturen von

*Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* mit 9,3% Stickstoff und 58,125% Proteinen auf. Es fällt auf, daß die Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* mit 7,28% Stickstoff und 45,5% Proteinen deutlich weniger stickstoffhaltige Verbindungen als die beiden Reinkulturen von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* enthielt. Den geringsten Stickstoff- beziehungsweise Proteingehalt besaß die Kultur von *Chroococcus minutus*.

**Tabelle 6.4.1**

|  | Gesamtstickstoffgehalt % | Gesamtproteingehalt % |
|--|--------------------------|-----------------------|
| <i>Chroococcus minutus</i>                               | 4,7                      | 29,375                |
| <i>Nodularia harveyana</i>                               | 9,3                      | 58,125                |
| <i>Nodularia spumigena</i>                               | 7,28                     | 45,5                  |
| <i>Spirulina laxissima</i>                               | 9,3                      | 58,125                |
| Mischkultur aus<br><i>Nod.harv.</i> und <i>Spir.lax.</i> | 8,32                     | 52,0                  |

### Zusammenfassung

Der hohe Proteingehalt der Kultur von *Spirulina laxissima* entsprach bisherigen Literatur-Angaben. So ist bekannt, daß *Spirulina*- und *Scenedesmus*-Arten einen besonders hohen Gehalt an Proteinen aufweisen, der bis zu 65% ihres Trockengewichts ausmachen kann (BECKER,1988). Wie schon erwähnt, müssen bei *Spirulina* sp. von diesem Betrag eventuell bis zu 20% abgezogen werden, da diese einen größeren Anteil an dem proteingebundenen Farbstoff C-Phycocyanin enthalten (BOUSSIBA & RICHMOND,1980).

Bei *Nodularia harveyana* dagegen scheinen die Werte tatsächlich einen hohen Proteingehalt widerzuspiegeln. Eine Untersuchung über die Ausbeute und die Zusammensetzung der Biomasse einer *Nodularia* sp. bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen in offenen Becken und in geschlossenen Photobioreaktoren gab als Gesamtproteingehalt 61,5% bis 63,9% an, der anhand einer Analyse der Aminosäurezusammensetzung auf 49,3% bis 50,9% korrigiert wurde (PUSHPARAJ et al.,1995).

Der im Vergleich zu den beiden Reinkulturen (*Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*, je 58%) geringere Proteingehalt der Mischkultur mit 52% kann hier nicht eindeutig erklärt werden, da dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde und daher keine statistische Absicherung vorliegt. Möglicherweise ist der geringe Proteingehalt auf Wechselwirkungen zwischen beiden Organismen zurückzuführen (siehe auch Kapitel 5 des Ergebnisteils: Norharmangehalte in der Nährlösung von Mischkulturen).

Mikroalgen können als Ergänzung zur normalen Nahrung und als Quelle von essentiellen Aminosäuren dienen. Während pflanzliche Organismen in der Lage sind, alle proteinogenen Aminosäuren zu synthetisieren, ist der menschliche Organismus darauf angewiesen, die Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Methionin, Lysin, Phenylalanin und Tryptophan als essentielle Aminosäuren mit pflanzlicher Nahrung aufzunehmen.

Die Verwendung von Mikroalgen für Ernährungszwecke ist allerdings, was Chlorophyceen wie zum Beispiel die *Scenedesmus*-Arten betrifft, insofern problematisch, als diese Mikroalgen eine für den Menschen unverdauliche Zellwand aus Zellulose und Hemizellulose besitzen (BECKER & VENKATARAMAN,1982). Daher kommen für die menschliche Nahrungsergänzung am besten Cyanobakterien wie *Spirulina*-Arten in Frage, weil diese Organismen in ihrer Zellwand das Peptidoglycan Murein enthalten, welches aus Aminosäuren und Zuckern aufgebaut ist und im menschlichen Verdauungstrakt abgebaut werden kann.

Neben *Spirulina laxissima* könnte wegen ihres hohen Proteingehalts auch *Nodularia harveyana* als Nahrungsergänzung zum Einsatz kommen. Allerdings müßte vorher die Frage des Norharmangehaltes in der Biomasse geklärt werden (siehe Kapitel 6.5 des Ergebnisteils) und eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung gemacht werden, um zu sehen, in welchem Maße essentielle Aminosäuren enthalten sind.

## 6.5 Untersuchung der Biomasse von *Nodularia harveyana* auf Norharman

Nachdem in der Nährlösung von *Nodularia harveyana* das Alkaloid Norharman gefunden und identifiziert worden war, stellte sich die Frage, ob und in welcher Menge Norharman auch in der Biomasse enthalten war.

Durch die dünnschichtchromatographische Auftrennung eines methanolischen Extrakts der Biomasse ließ sich eine intensiv hellblau fluoreszierende Substanz nachweisen, die später mit Hilfe der HPLC und durch Vergleich des spezifischen Absorptionsspektrums dieser Substanz mit dem der Referenzsubstanz als Norharman identifiziert wurde.

Zur Probenvorbereitung für die quantitative Analyse von Norharman mittels HPLC wurde zunächst ein methanolischer Extrakt aus einer definierten Menge gefriergetrockneter Biomasse hergestellt. Dabei gelangten auch die Pigmente und andere Begleitstoffe aus der Biomasse mit in den Extrakt, der dadurch grün gefärbt war.

Da zunächst nicht klar war, ob die Pigmente bei der HPLC störten, wurde versucht, sie nach den unter Punkt 2.4.5 des Methodenteils beschriebenen Methoden A und B zu entfernen. Wie in Tabelle 6.5.1 zu sehen, kam es bei beiden Methoden zu erheblichen Substanzverlusten, weshalb für die weiteren Untersuchungen auf die Abtrennung der Pigmente verzichtet wurde.

Endgültig wurde deshalb folgendermaßen vorgegangen: Der methanolische Gesamtextrakt wurde zur Trockene eingeengt und in einem definierten Volumen mobiler Phase oder Methanol aufgenommen, wobei sich wegen der besseren Löslichkeit Methanol als vorteilhafter erwies. Um sicherzustellen, daß Norharman quantitativ extrahiert wurde, wurde die Biomasse fünfmal mit Methanol behandelt. Die dünnschichtchromatographische Überprüfung der sechsten Extraktion ergab, daß kein Norharman mehr in der Biomasse zurückblieb.

Bei der anschließenden HPLC wurde deutlich, daß die Pigmente und andere Begleitstoffe aus der Biomasse nicht störten. Die Identifizierung des Norharmanpeaks gelang über den Vergleich mit den Retentionszeiten und dem spezifischen Absorptionsspektrum der Referenzsubstanz. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade mit Norharman-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Untersucht wurden zwei Parallelkulturen von *Nodularia harveyana* und eine Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima*. Tabelle 6.5.1 zeigt den Effekt der Extraktionsmethode anhand einer Kultur von *Nodularia harveyana* und macht deutlich, daß

die alleinige Extraktion mit Methanol den anderen Methoden überlegen war. In der ersten Spalte sind die direkt erhaltenen Konzentrationen der untersuchten Lösungen zu sehen, in der zweiten Spalte sind diese Konzentrationen umgerechnet worden, da die Lösungen aus unterschiedlichen Mengen Biomasse extrahiert wurden und in unterschiedlichen Volumina mobiler Phase beziehungsweise Methanol aufgenommen worden sind. Der prozentuale Anteil an Norharman bezogen auf die gefriergetrocknete Biomasse ist in der dritten Spalte zu sehen. In der Tabelle 6.5.2 sind die Norharmangehalte in den Biomassen der drei hier untersuchten Kulturen nach der endgültigen Extraktionsmethode dargestellt.

Wenn man von einer durchschnittlichen Ausbeute von 6 g Biomasse aus einer 8 Liter-Kultur ausgeht, bedeutet das, daß in der Biomasse einer Kultur rund 1 mg Norharman gebildet wurde. Diese Werte wurden in Tabelle 6.5.3 mit dem Norharmangehalt der XAD-Extrakte aus den dazugehörigen Nährlösungen verglichen.

#### Tabelle 6.5.1

Mittels HPLC erhaltenen Norharmankonzentrationen in der Biomasse von *Nodularia harveyana* nach verschiedenen Extraktionsmethoden

|   | Konzentration<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), direkt | Konzentration<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), berechnet | Anteil Norharman in<br>der Biomasse (%) |
|---|--|---|---|
| Methode A   | 33,54  | 5,03  | 0,0008 %                                |
| Methode B   | 37,48  | 5,62  | 0,0009 %                                |
| methanol.Extraktion,<br>aufgenommen in<br>mobiler Phase | 69,86  | 69,86   | 0,011 %                                 |
| methanol.Extraktion,<br>aufgenommen in<br>Methanol      | 60,03  | 120,06  | 0,02 %                                  |

**Tabelle 6.5.2**

Norharmengehalte in den Biomassen der drei hier untersuchten Kulturen nach der endgültigen Extraktionsmethode

|  | Konzentration<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Anteil Norharman in<br>der Biomasse (%) |
|--|--|---|
| <i>Nodularia harveyana</i><br>Kultur 1         | 60,03                                      | 0,02 %                                  |
| <i>Nodularia harveyana</i><br>Kultur 2         | 54,17                                      | 0,018 %                                 |
| Mischkultur aus<br><i>Nod.harv./ Spir.lax.</i> | 50,73                                      | 0,017 %                                 |

**Tabelle 6.5.3**

Vergleich der Norharmengehalte in der Biomasse und in der Nährlösung der drei hier untersuchten Kulturen

|   | Biomasse<br>aus 8 l | Norharman            | Nährlösungs-<br>extrakt aus 8 l | Norharman           |
|---|---------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>Nodularia harveyana</i><br>Kultur 1                      | 6,4 g               | 1,28 mg<br>= 0,02 %  | 3190 mg                         | 88 mg<br>= 2,75 %   |
| <i>Nodularia harveyana</i><br>Kultur 2                      | 6,2 g               | 1,12 mg<br>= 0,018 % | 1530 mg                         | 26,7 mg<br>= 1,75 % |
| Mischkultur aus<br><i>Nod.harv.</i> und<br><i>Spir.lax.</i> | 5,7 g               | 0,97 mg<br>= 0,017 % | 1650 mg                         | 99,9 mg<br>= 6,06 % |

Aus der Tabelle 6.5.3 ist zum einen ersichtlich, daß der Norharmengehalt in den Nährlösungsextrakten höher ist als in der Biomasse. Zum anderen fällt der hohe Norharmengehalt (6%) in dem Nährlösungsextrakt der Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* auf.

### Zusammenfassung

Die Beobachtung, daß Norharman zwar in der Biomasse von *Nodularia harveyana* enthalten war, jedoch in einer geringeren Konzentration als in der Nährlösung, ließ annehmen, daß Norharman (vermutlich als Wachstumsinhibitor) extrazellulär in die Nährlösung ausgeschieden wird und nicht intrazellulär in größerer Menge gespeichert wird, wie es bei Alkaloiden in höheren Pflanzen häufig der Fall ist. Bei diesen werden die Alkaloide meist in der Vakuole oder in Milchröhren gelagert, wo sie vermutlich eine ökologische Funktion als Schutz vor Fraßfeinden haben (TEUSCHER,1997). Trotzdem scheint die Funktion des Alkaloids für das Cyanobakterium *Nodularia harveyana* eine ähnliche zu sein wie bei den höheren alkaloidproduzierenden Pflanzen. Auch hier fungiert die Verbindung dann möglicherweise ebenfalls als Abwehrstoff.

Diese Frage, ob die Erhöhung des Norharmangehalts in der Nährlösung der Mischkultur von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* als Wachstumshemmung gegen Konkurrenzorganismen gedeutet werden kann, wurde bereits in Kapitel 5 des Ergebnisteils diskutiert.

## 6.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse der Biomassen-Analysen sollen an dieser Stelle noch einmal kurz zusammengefaßt werden. Die Untersuchungen der Biomasse bezogen sich zum einen auf Fettsäuren und Proteine, welche Cyanobakterien als Nahrungsergänzungsmittel interessant machen könnten. Zum anderen wurden Pigmente wie Carotinoide und Chlorophylle untersucht, die für verschiedene andere Anwendungen von Interesse sind.

Die Analysen zeigten, daß die Kultur von *Nodularia harveyana* in Hinblick auf diese verwertbaren Inhaltsstoffe am interessantesten erschien. Dieser Organismus hatte jeweils den höchsten Gehalt an Carotinoiden, Chlorophyll a und Phycobiliproteinen unter den hier analysierten Cyanobakterien. Zusammen mit der Kultur von *Spirulina laxissima* zeigte *Nodularia harveyana* auch den höchsten Gehalt an Proteinen. So könnte *Nodularia harveyana* als Proteinquelle bei der Züchtung von Meeresorganismen dienen (PUSHPARAJ et al.,1995).

Was die Fettsäuren betraf, so hatten *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* relativ hohe Gesamtfettsäuregehalte (um 4%), wobei die Kultur von *Nodularia harveyana* besonders viel Linolsäure bildete.

*Nodularia harveyana* und *Nodularia spumigena* gehören zu den stickstofffixierenden Cyanobakterien. Diese sind besonders attraktiv für eine kostengünstige Massenkultivierung, da ihrem Nährmedium keine Nitrate zugefügt werden müssen. *Nodularia harveyana* könnte also sowohl für menschliche Ernährungszwecke als auch als Tierfutter in Aquakulturen für die Züchtung von Zooplankton aufgrund des Proteingehalts und des Gehalts an Linolsäure verwendet werden.

Andererseits könnte für diese beiden möglichen Verwendungen von *Nodularia harveyana* der Gehalt an Norharman in der Biomasse eine Einschränkung darstellen, weil diese Verbindung möglicherweise unerwünschte, vielleicht sogar toxische Nebenwirkungen haben könnte. Der Norharmangehalt von *Nodularia harveyana* betrug bis zu 0,02% in der Biomasse und 2,75% im Nährlösungsextrakt.

Wie sich in dem Toxizitätstest mit Artemienlarven (brine shrimps-Test) ergeben hatte, betrug die LD<sub>50</sub> für den Nährlösungsextrakt 8,3 mg Extrakt pro ml. Wollte man also Kulturen von *Nodularia harveyana* für die Züchtung von Zooplankton, zu dem auch *Artemia salina* gehört, nutzen, so sollte dieser Wert deutlich unterschritten werden. Wie aus Tabelle 6.5.3 zu entnehmen ist, kann eine 8 Liter-Kultur von *Nodularia harveyana* bis zu 3190 mg Nährlösungsextrakt produzieren. Daraus errechnet sich ein Wert von 0,39 mg Extrakt pro ml Nährlösung, der die festgestellte LD<sub>50</sub> für den Nährlösungsextrakt (8,3 mg ml<sup>-1</sup>) deutlich unterschreitet.

Hypothetisch wurde nun angenommen, daß die Toxizität auf Artemienlarven auf dem Gehalt von Norharman in dem Nährlösungsextrakt beruht. Daraus ergibt sich eine LD<sub>50</sub> für Norharman von 0,228 mg ml<sup>-1</sup>, wenn man von einem Norharmangehalt im Extrakt von 2,75% ausgeht. Laut Tabelle 6.5.3 kann eine 8 Liter-Kultur von *Nodularia harveyana* in ihrem Kulturmedium bis zu 88 mg Norharman enthalten, was einem Nährlösungsgehalt von 0,011 mg ml<sup>-1</sup> Norharman entspricht. Auch hier wird die LD<sub>50</sub> von 0,228 mg ml<sup>-1</sup> unterschritten.

Diese Überlegungen wurden auch für die Biomasse angestellt. Die Biomasse von *Nodularia harveyana* kann bis zu 0,02% Norharman enthalten, das heißt, da normalerweise eine 8 Liter-Kultur nur etwa 6 g Biomasse enthält, sind in der Biomasse in einer Kultur rund 1,2 mg

Norharman enthalten. Da dieser Wert nur 0,00015 mg Norharman ml<sup>-1</sup> entsprechen würde, wird deutlich, daß auch hier die LD<sub>50</sub> von 0,228 mg ml<sup>-1</sup> nicht annähernd erreicht wird.

Auch der Gesamtnorharmengehalt, der sich aus der Addition der Norharmengehalte aus der Biomasse und des Nährlösungsextrakt ergab und für die 8 Liter-Kultur von *Nodularia harveyana* 0,01115 mg ml<sup>-1</sup> betrug, liegt weit unterhalb der LD<sub>50</sub> von 0,228 mg ml<sup>-1</sup>.

Damit könnte man möglicherweise Kulturen von *Nodularia harveyana* als Futterquelle bei der Züchtung von Zooplankton trotz des enthaltenen Norharmans einsetzen. Trotzdem wäre aber auf jeden Fall vor einer solchen Verwendung eine Verträglichkeitsstudie notwendig.

Für die Gewinnung von Pigmenten, vor allem der Carotinoide, und von Fettsäuren spielt der Norharmengehalt der Kultur keine Rolle, da diese aus der Biomasse isoliert werden und das Norharman aufgrund der spezifischen Isolierungsgänge nicht erfaßt wird. Insofern käme *Nodularia harveyana* auch für die Gewinnung von Phycobiliproteinen, insbesondere des Farbstoffs Phycocyanins in Frage.

Der Einsatz der Biomasse als Nahrungsergänzungsmittel müßte allerdings aufgrund des Norharmangehalts eine genauere Überprüfung der Wirkung beziehungsweise Unbedenklichkeit auf den menschlichem Organismus voraussetzen.

Die Kultur von *Spirulina laxissima* wies auch einige für die Massenkultivierung interessante Merkmale auf. So besaß sie einen relativ hohen  $\beta$ -Carotin Gehalt und enthielt zusätzlich das Xanthophyll Zeaxanthin, welches in den anderen untersuchten Cyanobakterien nicht oder nur in Spuren vorkam. Der Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure war mit 17,1% im Vergleich zu dem  $\alpha$ -Linolensäureanteil der anderen untersuchten Cyanobakterien recht hoch. Aus dieser Beobachtung läßt sich eine taxonomische Einordnung vornehmen. In den frühen 30er Jahren dieses Jahrhunderts wurden die beiden Arten *Arthrospira* und *Spirulina* zu einer gemeinsamen taxonomischen Spezies namens *Spirulina* vereinigt. Diese Art gehört zu den fädigen Cyanobakterien und zeichnet sich morphologisch durch ihre spiralförmige Gestalt sowie durch das Fehlen von Heterocysten aus. Seit Anfang der 90er Jahre unterscheidet man nun wieder zwischen *Spirulina*- und *Arthrospira*-Arten. Diese Unterscheidung wird vor allem anhand ihrer unterschiedlichen Gehalte an Guanin und Cytosin in der DNA und der Analyse ihrer ribosomalen RNA vorgenommen (GUGLIELMI et al.,1993). Eine einfachere Unterscheidungsmöglichkeit aufgrund der unterschiedlichen Fettsäuremuster der beiden Arten wurde bereits 1991 von COHEN & VOSHAK vorgestellt, und später von mehreren Autoren bestätigt (PASCAUD,1993, DRAGOS et al.,1999; MÜHLING et al.,1999; ROMANO et al.,1999). *Arthrospira*-Arten wie *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima* und *Arthrospira fusiformis*

(die Bezeichnung *Spirulina* ist aber für diese Arten nach wie vor sehr gängig) enthalten in größerer Menge  $\gamma$ -Linolensäure, zum Teil neben Anteilen an  $\alpha$ -Linolensäure, und werden deshalb viel als Nahrungergänzungsmittel kultiviert und eingesetzt. Die *Spirulina*-Arten dagegen enthalten nur  $\alpha$ -Linolensäure. Außerdem weisen sie einen höheren Gehalt an Palmitoleinsäure (>5% des Gesamtfettsäuregehalts) als *Arthrospira*-Arten auf und besitzen Myristinsäure, die in *Arthrospira*-Arten oft fehlt. Aufgrund der hier erhaltenen Fettsäurewerte (siehe Tabelle 6.1.4) für *Spirulina laxissima* gehört diese also wahrscheinlich taxonomisch zu den *Spirulina*-Arten.

Auffallend waren die geringen Gehalte von Substraten in der Biomasse von *Chroococcus minutus*, was sowohl die Fettsäuren, die Carotinoide und Chlorophylle als auch die Proteine betraf. Dieses könnte durch das Wachstumsverhalten von *Chroococcus minutus* verursacht worden sein: Da *Chroococcus minutus* ein Einzeller ist, bildete er keine Aggregate, sedimentierte aber leicht und haftete dann am Gefäßboden, was sich nachteilig auf die Biomasseproduktion auswirkte. Sicher bedeutet eine geringe Biomasseproduktion nicht automatisch einen geringen Gehalt an den verschiedenen Inhaltsstoffen, aber durch die Sedimentation könnte die Belichtung der Zellen nicht optimal gewesen sein, was sich eventuell in den geringen Gehalten dieser Kultur widerspiegelte.

Da der Gehalt der verschiedenen Inhaltsstoffe in der Biomasse abhängig von den Züchtungsbedingungen ist (POHL & ZURHEIDE,1979; NELIS & DE LEENHEER,1991; BECKER,1988), erscheint es sinnvoll, die Kulturbedingungen jeweils auf den Inhaltsstoff abzustimmen, der vorrangig gewonnen werden soll. In der Regel sind allerdings wegen der unterschiedlichen Bedingungen aus einer vorgegebenen Kultur nicht alle Inhaltsstoffe gleichzeitig in optimaler Ausbeute zu gewinnen. Trotzdem könnte man daran denken, Mikroalgen-Massenkulturen zur simultanen Gewinnung unterschiedlicher Stoffklassen zu nutzen, auch wenn dann die Ausbeuten nur suboptimal ausfallen. Dieser Aspekt wird in der Schlußdiskussion dieser Dissertation noch ausführlicher besprochen.

## **D ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION**

Mikroalgen sind in der Lage, während ihres Wachstums Substanzen in ihre Nährlösung auszuscheiden. In der vorliegenden Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, diese Metaboliten aus den Nährlösungen zu extrahieren und aufzutrennen. Weiterhin sollte versucht werden, eventuelle biologische Aktivitäten der aus den Nährlösungen erhaltenen Extrakte festzustellen. Schließlich sollten erste Versuche unternommen werden, die Struktur von geeignet erscheinenden Verbindungen aufzuklären.

Die hier vorgestellte Extraktion der Nährlösungen mittels Soxhlet-Apparaturen unter Verwendung eines Adsorberharzes stellt eine praktikable Methode zur Herstellung eines konzentrierten Nährlösungsextrakts dar. Die Ausbeute aus einer 8 Liter-Kultur betrug fast vier Gramm Extrakt, in denen keine der vorher der Nährlösung zugefügten Salze mehr enthalten waren. Diese Methode war ein erster wichtiger Schritt zur Untersuchung der Nährlösungen, da diese in großen Mengen anfielen und für weitergehende Untersuchungen wegen der geringen Konzentration der Metaboliten zunächst in eine konzentrierte und gut zu handhabende Form gebracht werden mußten. Die Verwendung eines Adsorberharzes stellt eine vielfach verwendete und bewährte Methode dar, Sekundärmetaboliten aus wäßrigen Lösungen und Kulturüberständen zu adsorbieren. Die Verwendung von Soxhlet-Apparaturen ist allerdings eine Neuerung im Gegensatz zu den meist verwendeten offenen Säulen (JAKI et al., 1998; FISH & CODD, 1994) und stellte neben einer gewissen Vereinfachung, da sie sowohl für das Beladen des Harzes als auch für die anschließende Extraktion mit Lösungsmittel verwendet wurden, auch sicher, daß die Nährlösung erschöpfend extrahiert wurde. Allerdings ist es bei dieser Methode wichtig, das Adsorberharz vor Verwendung gut zu reinigen.

Weiterhin wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren entwickelt, das es erstmals erlaubte, die in den Nährlösungsextrakten enthaltenen Verbindungen aufzutrennen und unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Dünnschichtchromatographie ist eine bewährte und schnell durchzuführende Methode, um ohne großen Aufwand festzustellen, ob und in welchem Ausmaß Verbindungen in den betreffenden Extrakten enthalten waren. Damit steht ein weiteres Mittel neben dem biologischen Screening zur Verfügung, das es ermöglicht, abzuschätzen, ob sich weitergehende Untersuchungen des Extrakts lohnen.

Es stellte sich heraus, daß die Anzahl der in den Nährlösungen enthaltenen Verbindungen von Mikroalge zu Mikroalge stark variierte und von zwei bis zu neun nachweisbaren Substanzen reichte. Wie in Kapitel 2.3 des Ergebnisteils besprochen, ließen die Dünnschichtchromatogramme der Extrakte allerdings keine Rückschlüsse auf die taxonomischen Verwandtschaften der untersuchten Mikroalgen untereinander zu. Selbst eng miteinander verwandte Arten einer Gattung wiesen ganz verschiedene Komponenten in ihren Nährlösungsextrakten auf. Zwar kann man häufig aus Inhaltsstoffen der Biomasse, zum Beispiel aus dem Vorkommen bestimmter Fettsäuren, auf die systematische Einteilung von Cyanobakterien schließen, wie es bei der Einteilung in *Spirulina*- (enthalten  $\alpha$ -Linolensäure) und *Arthrospira*-Arten (enthalten  $\gamma$ -Linolensäure) der Fall ist (DRAGOS et al.,1999; ROMANO et al.,1999). Dieses ist aber bei den Produkten, die der Organismus in die Nährlösung ausscheidet, offensichtlich nicht der Fall.

Die Detektion der in die Nährlösung ausgeschiedenen Verbindungen mit chemischen Nachweisreagenzien erbrachte Hinweise auf das Vorkommen eines Alkaloids in der Nährlösung von *Nodularia harveyana* und von phenolischen Substanzen in fast allen Nährlösungsextrakten. Bereits VOLK (1996) hatte gezeigt, daß es möglich ist, einzelne Komponenten von Nährlösungsextrakten mit Hilfe von Sprühreagenzien auf der DC-Platte zu detektieren. Diese Methode wurde auch hier eingesetzt und stellte eine Ergänzung zu dem hier entwickelten dünnschichtchromatographischen Verfahren dar. Sie kann in den Fällen, in denen ausreichend große Mengen einer nachweisbaren Verbindung in einem Extrakt enthalten sind, wichtige Hinweise auf deren chemischen Charakter geben.

Weiterhin wurde zur Auftrennung der Extrakte eine HPLC-Methode entwickelt, die die dünnschichtchromatographischen Beobachtungen bezüglich der Anzahl der gefundenen Metaboliten bestätigte. Die Entwicklung einer HPLC-Methode war insofern wichtig, als sie zum einen empfindlicher als die Dünnschichtchromatographie ist und damit auch geringe Substanzmengen erfassen kann und zum anderen auch eine Quantifizierung der Inhaltsstoffe möglich machte.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methode waren somit auch quantitative Aussagen zum Gehalt an Norharman in der Nährlösung und in der Biomasse von *Nodularia harveyana* möglich. Es stellte sich heraus, daß das Alkaloid auch in der Biomasse dieses Organismus vorkam, wobei auf die Biomasse nur ein Viertel bis ein Drittel des

Gesamtnorharmangehalts der Kultur entfielen. Eine 8 Liter-Kultur von *Nodularia harveyana* enthielt je nach Alter der Kultur 2 bis 11 mg Norharman, wovon auf die Biomasse 0,1 bis 4 mg entfielen.

Um weiteren Aufschluß über die Art der Substanzen in den Nährlösungen zu gewinnen, ließe sich die hier vorgestellte HPLC-Methode zu einer Methode, bei der die HPLC mit einem Massenspektrometer kombiniert wird, weiterentwickeln. Auf diese Weise erhielte man nicht nur die molekularen Massen der Metaboliten, sondern könnte anhand der Bruchstücke auch Rückschlüsse über deren Struktur ziehen. Dafür müßte allerdings ein anderes als das hier vorgestellte Fließmittelgemisch verwendet werden. Denkbar wäre zum Beispiel eine Mischung aus Acetonitril und wäßriger Essigsäurelösung.

Eine andere Möglichkeit der Anwendung der HPLC wäre ihre Verwendung als eine präparative Methode. So wurden bereits aus der Biomasse von Cyanobakterien auf diese Weise Fischerellin A und B gewonnen (PAPKE et al.,1997; GROSS et al.,1991). Auch hier könnte eine solche Anwendung erfolgreich sein, da die Peaks in den Nährlösungsextrakten eine gute Basislinientrennung zeigten.

Bei der Untersuchung der Nährlösungsextrakte auf wachstumshemmende Verbindungen gegenüber verschiedenen Cyanobakterien wurde ein von VOLK (1996) entwickelter Sprühtest eingesetzt, der gegenüber anderen Methoden den Vorteil bietet, daß die wachstumshemmende Wirkung durch die vorangegangene dünnschichtchromatographische Auftrennung des Gesamtextrakts bestimmten Substanzflecken zugeordnet werden konnte. Meistens werden solche Tests auf Wachstumshemmstoffe gegen Cyanobakterien durch Zugabe der zu testenden Fraktion zu einer Testorganismus-Kultur durchgeführt, deren Wachstumskontrolle entweder über Messungen des Chlorophyll a-Gehalts (SAITO et al.,1989) oder über photometrische Messungen bei 440 nm (HARRIS,1971) erfolgt, wodurch Rückschlüsse auf eine Wachstumshemmung möglich sind. Eine andere Methode besteht in der Anzucht des zu testenden Cyanobakteriums auf Agarnährböden, dem anschließend der Testorganismus zugefügt wird, um das Auftreten von Hemmhöfen beobachten zu können (SCHLEGEL et al., 1999). Allen Methoden ist gemeinsam, daß sie die Wirkung einer Gesamtfraktion oder einer Gesamtkultur testen, ohne daß das wirksame Agens genau bestimmt werden kann.

Mit der hier eingesetzten Methode wurden in mehreren Extrakten zahlreiche Substanzen mit algizider Wirkung festgestellt. Unter den untersuchten Extrakten zeigte sich der von *Nodularia harveyana* als am stärksten wachstumshemmend gegenüber allen hier eingesetzten

Testorganismen. Diese algizide Wirkung konnte einer Verbindung zugeordnet werden, die sich nach ihrer Isolierung und Strukturaufklärung mit Hilfe der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie als das  $\beta$ -Carbolin Norharman erwies. Weitere deutliche algizide Wirkungen gingen von den Extrakten von *Chroococcus minutus* und *Scenedesmus productocapitatus* aus.

Bisher wurden nur wenige Cyanobakterien auf wachstumshemmende Verbindungen getestet. SCHLEGEL et al. (1999) fanden bei *Fischerella*-, *Calothrix*- und *Nostoc* sp. wachstumshemmende Eigenschaften, wobei allerdings nicht alle Stämme eine algizide Wirkung zeigten. Weitere Arten, die bereits durch Wachstumshemmer aufgefallen waren, wurden von BAGHI (1995) als *Nostoc*-, *Oscillatoria*- und *Scytonema*-Arten beschrieben. Zu den wirksamen Verbindungen gehören Cyanobacterin LU-1 sowie Fischerellin A und B. Jedoch sind viele der beschriebenen Wachstumsinhibitoren erst teilweise strukturell aufgeklärt.

Der hier beschriebene Sprühtest könnte weiterhin zu einer Quantifizierung der wachstumshemmenden Substanzen ausgebaut werden, indem verschiedene Konzentrationen eines sich als wachstumshemmend gezeigten Nährlösungsextraktes nebeneinander getestet werden, um so die LD<sub>50</sub> festlegen zu können.

Der brine shrimps-Test als ein Standardtest auf cytotoxische Eigenschaften ergab eine Wirkung der Extrakte von *Spirulina laxissima* und von *Nodularia harveyana* sowie der Mischkultur aus *Spirulina laxissima* und von *Nodularia harveyana* auf Artemienlarven. Dieser Test gilt auch als erster Hinweis auf bioaktive Substanzen, da nicht nur eine gute Korrelation zum Mausbioassay besteht (KIVIRANTA et al.,1991; CAMPBELL et al.,1994), sondern auch zu einigen Tumorzelllinien (SOLIS et al.,1993). Beim Screening verschiedener Biomasse-Extrakte aus Cyanobakterien wurden bereits mit Hilfe des brine shrimps-Test mehrere bioaktive Stämme entdeckt, wie zum Beispiel *Tolypothrix* sp., aus denen später die cytotoxische Verbindung Tolytoxin isoliert wurde (FALCH et al.,1995). Nährlösungen beziehungsweise Nährlösungsextrakte von Cyanobakterien wurden unseres Wissens noch nicht mit diesem Testsystem geprüft. Ob die artemientoxische Wirkung des komplexen Extrakts von *Nodularia harveyana* ebenfalls, wie sich in dem Sprühtest auf Wachstumsinhibitoren gegen andere Cyanobakterien herausgestellt hatte, auf Norharman oder auch auf weitere Substanzen zurückzuführen war, konnte noch nicht geklärt werden.

Die extern durchgeführte Testung auf Cytotoxizität zeigte eine mäßige Aktivität des Extrakts von *Nodularia spumigena* auf Mäusefibroblasten- und Humane Leukämie-Zelllinien, während der Extrakt einer Mischkultur aus *Spirulina laxissima* und *Nodularia harveyana* eine ebenfalls mäßige Wirkung auf HeLa-Zelllinien zeigte. Naturgemäß kann man bei Extrakten natürlich keine Rückschlüsse auf die tatsächlichen Wirkungen einer aktiven Einzelsubstanz herstellen. Aber auf der Basis der hier erhaltenen relativ niedrigen Werte erscheint eine weitere Isolierung einer solchen Substanz nicht sinnvoll zu sein, weil ihre Wirkung zu schwach sein würde. Die anderen untersuchten Nährlösungen waren als schwach bis nicht cytotoxisch einzustufen.

Der Nährlösungsextrakt der Mischkultur aus *Spirulina laxissima* und *Nodularia harveyana*, der immerhin eine gewisse Aktivität zeigte, fiel auch schon im brine shrimps-Test durch seine vergleichsweise starke Wirkung auf. Eine Korrelation der brine shrimps-Toxizität mit der Cytotoxizität an anderen Zelllinien, wie sie in diesem Fall zutrifft, wurde bereits des öfteren beschrieben. Getestet wurden unter anderem Extrakte aus *Lyngbya* sp., *Nostoc* sp. und *Scytonema* sp. an Zelllinien von Chinesischen Hamstern (GERWICK et al.,1994; FISH & CODD,1994) und an KB-Zelllinien (MOORE,1996). Auf welche Komponente des hier untersuchten Extrakts der Mischkultur die beschriebene Wirkung zurückzuführen war, wurde noch nicht geklärt. Es schien sich aber nicht um Norharman zu handeln, da der Extrakt von *Nodularia harveyana* keine Wirkung auf die hier verwendeten Zelllinien gezeigt hatte.

Mit dem Indolalkaloid Norharman wurde unseres Wissens erstmalig ein  $\beta$ -Carbolin in Cyanobakterien gefunden. Alkaloide sind in zahlreichen höheren Pflanzen anzutreffen. Sie sind dagegen in Mikroalgen nur gelegentlich gefunden worden. Bekannt sind neurotoxische Alkaloide wie zum Beispiel Anatoxine aus *Anabaena flos-aquae* und *Aphanizomenon* sp. (CARMICHAEL, 1992 und 1994), Tantazole aus *Sytonema mirabile* (CARMELI et al.,1994) und Lyngbyatoxin A aus *Lyngbya* sp. (MUNDT & TEUSCHER,1988). Alkaloide mit einem Indolgrundgerüst stellen die antiviral wirkenden Indolcarbazole aus *Nostoc spaericum* (KNÜBEL et al.,1990), die chlorhaltigen Hapalindole, die in *Hapalosiphon fontinalis* gefunden wurden (MOORE et al.,1984) und die bromhaltigen Biindole aus *Rivularia firma* (NORTON & WELLS,1982) dar.

$\beta$ -Carboline wurden in marinen Organismen bisher nur selten gefunden. So wurden von INOUE et al. (1980) Norharman und ein weiteres  $\beta$ -Carbolin aus dem Dinoflagellaten

*Noctiluca miliaris* isoliert, die beide vermutlich an der Biolumineszenz dieser Alge beteiligt sind.

Die wachstumsinhibitorische Wirkung von Norharman scheint auf einer Verminderung der Auxinbildung zu beruhen und wird auf eine Enzymhemmung im Stoffwechsel des Auxinvorläufers L-Tryptophan zurückgeführt. Auxine sind für das Streckenwachstum von Sprossen verantwortlich, so daß man auf eine indirekte wachstumsinhibitorische Wirkung von Norharman bei höheren Pflanzen schließen kann (MARTENS & FRANKENBERG,1993).

Aufgrund seiner co-carcinogenen Wirkung in Gegenwart von aromatischen Aminen ist eine pharmazeutische Anwendung von Norharman nicht empfehlenswert. Möglich wäre allerdings ein Einsatz als natürliches Algizid alternativ zur Verwendung von Kupfersulfat.

Die Vermutung, daß *Nodularia harveyana* in Gegenwart eines Konkurrenzorganismus vermehrt das Algizid Norharman produziert und in die Nährlösung ausscheidet, ließ sich durch die Analyse von Mischkulturen mit *Spirulina laxissima* nur bedingt bestätigen. Es war nur eine geringe Erhöhung des Norharmangehaltes in der Nährlösung der Mischkultur im Vergleich zu der Nährlösung der Reinkultur feststellbar. Allerdings wurde deutlich, daß der Norharman-gehalt mit dem Alter der Kultur anstieg. Auch lag er in der Nährlösung im Vergleich zur Biomasse um rund zwei Drittel höher. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Substanz zwar in der Biomasse synthetisiert wurde, dann aber aktiv in das Kulturmedium ausgeschieden wurde.

Es fällt auf, daß Alkaloide in Cyanobakterien bisher nur in den fädigen Formen (Unterklasse Hormogoneae) nachgewiesen werden konnten. Die oben erwähnten alkaloidführenden Cyanobakterien *Lyngbya* sp. gehören zu den Oscillatoriales, *Anabaena*- und *Aphanizomenon* sp. sowie *Rivularia* sp. und *Scytonema* sp. zu den Nostocales und *Hapalosiphon* sp. zu den Stigonematales (siehe auch Tabelle 2.3.1 in Kapitel 2 des Ergebnisteils). Auch *Nodularia harveyana* mit dem Alkaloid Norharman paßt in dieses Schema, weil diese Mikroalge ebenfalls zu den fädigen Hormogoneae gehört und hier unter die Ordnung der Nostocales fällt. Überhaupt scheinen auch andere bioaktive Substanzen aus Cyanobakterien vorwiegend in dieser Unterklasse vorhanden zu sein. Die Beobachtungen von wachstumshemmenden Substanzen in *Fischerella* sp. (Stigonematales) (GROSS et al.,1991), *Calothrix* sp. (Nostocales) (SCHLEGEL et al.,1999) und *Oscillatoria* sp. (Oscillatoriales) (BAGHI,1995) sind

hierfür ein Beleg. Eine Ausnahme bildet allerdings das hepatotoxische Microcystin aus *Microcystis* sp., welche zu den Chroococcales gehört.

Für eine Produktion der Nährlösungsmetaboliten im größeren Maßstab würden sich vor allem solche Mikroalgen anbieten, deren Biomasse ebenfalls wirtschaftlich genutzt werden kann. Aus diesem Grund wurden die Biomassen einiger der hier untersuchten Cyanobakterien, deren Nährlösungen Hinweise auf interessante und nutzbare biologische Aktivitäten zeigten, auf weitere pharmazeutisch verwendbare Inhaltsstoffe analysiert. Es zeigte sich, daß die Biomasse von *Nodularia harveyana* vor allem wegen ihres hohen Gehalts an der ungesättigten Fettsäure Linolsäure und aufgrund ihres hohen Proteingehalts für eine Nutzung im Großmaßstab in Frage kommen könnte. So wäre der Einsatz als Futterquelle bei der Züchtung von Zooplankton denkbar. Als vorteilhaft erwies sich bei dieser Anwendung auch die Fähigkeit von *Nodularia harveyana*, Luftstickstoff zu fixieren, weil damit die Zugabe von Nitrat zur Kultur überflüssig wäre. Aber auch zur Gewinnung von Pigmenten wäre *Nodularia harveyana* geeignet. Ihre Biomasse hatte im Vergleich zu den anderen untersuchten Cyanobakterien einen hohen Phycobili-proteingehalt, insbesondere an Phycocyanin, welches als blauer Farbstoff verwendet werden könnte. Um Carotinoide und hier insbesondere  $\beta$ -Carotin zu gewinnen, kämen neben *Nodularia harveyana* auch die Kulturen von *Spirulina laxissima* und die Mischkultur aus *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* in Frage, da alle drei einen etwa gleich hohen  $\beta$ -Carotin-Gehalt aufwiesen. Auch der Gehalt an Chlorophyll a war in der Biomasse von *Nodularia harveyana* am höchsten.

Zwar wäre es sinnvoll, die Züchtungsbedingungen auf den jeweils zu gewinnenden Hauptinhaltsstoff abzustimmen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde aber deutlich, daß es durchaus möglich ist, mehrere Stoffklassen nebeneinander aus einer Kultur zu gewinnen. So lieferten hier die Kulturen von *Nodularia harveyana* und *Spirulina laxissima* gute Ausbeuten an Pigmenten, Proteinen und Fettsäuren. So wäre unter Umständen folgendes Modell denkbar: Eine Massenkultur von *Nodularia harveyana*, die eventuell unter  $\text{CO}_2$ -Verbrauch (Paetow & Pohl, 1999) und ohne Stickstoffzugabe zur Nährlösung kultiviert würde, lieferte einerseits Biomasse zur Gewinnung der oben beschriebenen Substanzen oder zur Verwendung als Nahrung in Aquakulturen und andererseits Nährlösung zur Gewinnung von Metaboliten wie zum Beispiel Norharman. Anschließend könnte die extrahierte Biomasse als

Schwermetalladsorber zur Reinigung von belasteten Abwässern eingesetzt werden (Fehrmann & Pohl,1993).

Auf diese Weise könnten die hier durchgeführten Studien zu einer vielfältigeren Nutzung von Mikroalgen-Massenkulturen beitragen.

**E LITERATUR**

**ABDULKARIM, B.G.; SMITH, J.S. (1998)**

Heterocyclic amines in fresh and processed meat products.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (11): 4680-4687

**ALLEN, J.R.F.; HOLMSTEDT, B.R. (1980)**

The simple  $\beta$ -carboline alkaloids.

Phytochemistry, 19: 1573-1582

**AWACHIE, P.I.A.; UGWU, F.O. (1997)**

Preliminary investigation of the antimicrobial and brine shrimp lethality properties of some Nigerian medicinal plants.

International Journal of Pharmacognosy, 35 (5): 338-343

**BAGCHI, S.N. (1995)**

Structure and site of action of an algicide from a cyanobacterium, *Oscillatoria late-virens*.

Journal of Plant Physiology, 146 (3): 372-374

**BALÓN, M.; HIDALGO, J.; GUARDADO, P.; MUÑOZ, M.A.; CARMONA, C. (1993)**

Acid-base and spectral properties of  $\beta$ -carboline. Part 2: Dehydro and fully aromatic  $\beta$ -carboline.

Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: 99-104

**BAUERNFEIND, J.C.; BRUBACHER, G.B.; KLÄUI, H.M.; MARUSICH, W.L. (1971)**

Use of carotenoids.

In: Carotenoids (Isler, O.; ed.), Birkhäuser Verlag 1971

**BECKER, E.W. (1986)**

Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints.

In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture (Richmond, A.;ed.)

CRC Press Boca Raton, Florida: 339-419

**BECKER, E.W. (1988)**

Micro-algae for human and animal consumption.

In: Micro-algal biotechnology, (Borowitzka,M.A.; Borowitzka,L.J.; eds.)

Camebridge University Press,1988: 153-196

**BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. (1982)**

Biotechnology and Exploitation of Algae - The Indian Approach: 96-119

Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH, Eschborn 1982

**BENEMANN, J.R. (1992)**

Microalgae aquaculture feeds.

Journal of Applied Phycology, 4: 233-245

**BENNETT, A.; BOGORAD, L. (1973)**

Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga.

The Journal of Cell Biology, 58: 419-435

**BOROWITZKA, M.A. (1988 a)**

Vitamins and fine chemicals from micro-algae.

In: Micro-algal biotechnology, (Borowitzka,M.A.; Borowitzka,L.J.; eds.)

Camebridge University Press,1988: 153-196

**BOROWITZKA, M.A. (1988 b)**

Fats, oils and hydrocarbons.

In: Micro-algal biotechnology, (Borowitzka,M.A.; Borowitzka,L.J.; eds.)

Camebridge University Press,1988: 257-287

**BOROWITZKA, M.A. (1995)**

Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds.

Journal of Applied Phycology, 7: 3-15

**BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (1988)**

*Dunaliella*.

In: Micro-algal biotechnology, (Borowitzka,M.A.; Borowitzka,L.J.; eds.)

Camebridge University Press,1988: 257-287

**BOURKE, C.A.; STEVENS, G.R.; CARRIGAN, M.J. (1992)**

Locomotor effects in sheep of alkaloids identified in Australian *Tribulus terrestris*.

Australian Veterinary Journal, 69 (7): 163-165

**BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A.E. (1980)**

C-Phycocyanin as a storage protein in blue-green Alga *Spirulina platensis*.

Archives of Microbiology, 125: 143-147

**BROOKS, W.P.; CODD, G.A. (1988)**

Immunoassay of hepatotoxic cultures and water blooms of cyanobacteria using *Microcystis aeruginosa* peptide toxin polyclonal antibodies.

Environmental Technology Letters 91: 1343-1348

**BROWN, M.R.; MULAR, M.; MILLER, I.; FARMER, C.; TRENERRY, C. (1999)**

The vitamin content of microalgae used in aquaculture.

Journal of Applied Phycology, 11: 247-255

**CALLEJA, M.C.; PERSOONE, G.; GELADI, P. (1994)**

Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 26: 69-78

**CAMPBELL, D.L.; LAWTON, L.A.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A. (1994)**

Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria.

Environmental Toxicology and Water Quality, 9: 71-77

**CARMELI, S.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L.; CORBETT, T.H.; VALERIOTE, F.A. (1990)**

Tantazoles, unusual cytotoxic alkaloids from the blue-green alga *Scytonema mirabile*.

Journal of the American Chemical Society, 112: 8195-8197

**CARMICHAEL, W.W. (1994)**

Cyanobakterielle Toxine.

Spektrum der Wissenschaft, März: 70-77

**CARMICHAEL, W.W. (1992)**

Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. A review.

Journal of Applied Bacteriology, 72: 445-459

**CODD, G.A.; BROOKS, W.P.; PRIESTLY, I.M.; POON, G.K.; BELL, S.G. (1989)**

Production, detection and quantification of cyanobacterial toxins.

Toxicity Assessment 4: 499-511

**COHEN, Z. (1986)**

Products from microalgae.

In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture (Richmond, A.;ed.)

CRC Press Boca Raton, Florida: 421-454

**COHEN, Z.; VONSHAK, A. (1991)**

Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy.

Phytochemistry 30 (1): 205-206

**DAVIES, B.H. (1976)**

Carotenoids. In: Chemistry and biochemistry of plant pigments, Second Edition, Volume 2 (Goodwin, T.W.; ed.)

Academic Press London New York San Francisco, 1976: 38-165

**DIAS, A.; VARELA, A.P.; MIGUEL, M.DA G.; MACANITA, A.L.; BECKER, R.S. (1992)**

$\beta$ -carboline photosensitivers. 1. Photophysics, kinetics and excited-state equilibria on organic solvents and theoretical calculations.

Journal of Physical Chemistry, 96 (25): 10290-10296

**DOWNES, M.T.; HRSTICH, L.; VINCENT, W.F. (1993)**

Extraction of chlorophyll and carotenoid pigments from Antarctic benthic mats for analysis by HPLC.

Journal of Applied Phycology, 5: 623-628

**DRAGOS, N.; STANESCU, U.; PÉTERFI, L.S.; NICARA, A. (1999)**

Amino and fatty acid biomass composition of some *Arthrospira* strains.

8<sup>th</sup> International Conference on Applied Algology, Montecatini Terme 1999 - Abstracts

**EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3.AUSGABE (1997)**

Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart,

Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn:

Opium-Monographie: 1414-1415

**FALCH, B.S.; KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D.; STICHER, O.; ANGERHOF, C.K.; PEZZUTO, J.M.; BACHMANN, H. (1995)**

Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds.

Planta Medica, 61: 321-328

**FEHRMANN, C. (1993)**

Cadmium Adsorption an Mikroalgen.

Dissertation, Kiel

**FEHRMANN, C.; POHL, P. (1993)**

Cadmium adsorption by non-living biomass of microalgae grown in axenic mass culture.  
Journal of Applied Phycology, 5 (6): 555-562

**FISCHER, D. (1996)**

Untersuchungen über den Einfluß von Züchtungsfaktoren auf die Bildung, Zusammensetzung und das rheologische Verhalten der Exopolysaccharide ausgewählter Cyanobakterien.  
Dissertation, Kiel

**FISCHER, D.; SCHLÖSSER, U.G.; POHL, P. (1997)**

Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton towelling.  
Journal of Applied Phycology, 9 (3): 205-213

**FISH, S.A.; CODD, G.A. (1994)**

Antimicrobial and cytotoxic activity produced by an isolate of the thermotolerant cyanobacterium (blue-green alga) *Phormidium* sp.  
Biotechnology techniques, 8 (5): 351-356

**GALCERAN, M.T.; MOYANO, E.; PUIGNOU, L.; PAIS, P. (1996)**

Determination of heterocyclic amines by pneumatically assisted electrospray liquid chromatography-mass spectrometry.  
Journal of Chromatography A, 730: 185-194

**GARCÉS, R.; MANCHA, M. (1993)**

One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues.  
Analytical Biochemistry, 211: 139-143

**GERWICK, W.H.; PROTEAU, P.J.; NAGLE, D.G.; HAMEL, E.; BLOKHIN, A.; SLATE, D.L. (1994)**

Structure of curacin A, a novel antimitotic, antiproliferative and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*.  
The Journal of Organic Chemistry, 59 (6): 1243-1245

**GLEASON, F.K.; CASE, D.E.; SIPRELL, K.D.; MAGNUSON, T.S. (1986)**

Effect of the natural algicide, cyanobacterin, on a herbicide-resistant mutant of *Anabaena nidulans*.

Plant Science, 46: 5-10

**GROMOV, B.V.; VEPRITSKIY, A.A.; TITOVA, N.N.; MAMKAYEVA, K.A.; ALEXANDROVA, O.V. (1991)**

Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium).

Journal of Applied Phycology, 3: 55-59

**GROSS, E.M.; WOLK, C.P.; JÜTTNER, F. (1991)**

Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*.

Journal of Phycology, 27: 686-692

**GROSS, E.M.; MEYER, H.; SCHILLING, G. (1996)**

Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*.

Phytochemistry, 41 (1): 133-138

**GUGLIELMI, G.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. (1993)**

Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp. and *Arthrospira* spp. among cyanobacteria.

Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco) 0 (Spec.Issue 12): 13-23

**HAGEN, T.J.; SKOLNICK, P.; COOK, J.M. (1987)**

Synthesis of 6-substituted  $\beta$ -carbolines that behave as benzodiazepine receptor antagonists or inverse agonists.

Journal of Medicinal Chemistry, 30 (4): 750-753

**HAHN-DEINSTROP, E. (1995)**

Dünnschichtchromatographie im DAB, 1. Teil

Deutsche Apotheker Zeitung, 135 (28): 27-32

**HAMBSCH, B.; SCHMIEDEL, U.; WERNER, P.; FRIMMEL, F.H. (1993)**

Investigations on the biodegradability of chlorinated fulvic acids.

Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 21 (3): 167-172

**HARRIS, D.O. (1971)**

Growth inhibitors produced by the green algae (Volvocales).

Archiv für Mikrobiologie, 76: 47-50

**HERDER-LEXIKON DER BIOLOGIE (1994 a)**

Stichwort: Carotinoide.

Spektrum Akademischer Verlag

**HERDER-LEXIKON DER BIOLOGIE (1994 b)**

Stichwort: Phycobiliproteine.

Spektrum Akademischer Verlag

**HERRMANN, V.; JÜTTNER, F. (1977)**

Excretion products of algae: Identification of biogenic amines by gas-liquid chromatography and mass spectrometry of their trifluoroacetamides.

Analytical Biochemistry, 78: 365-373

**HOEK, C. VAN DEN; JAHNS, H.M.; MANN, D.G. (1993)**

Algen.

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1993

**HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H.; BITTNER, G. (1963)**

Dünnschichtchromatographie von Anthrachinondrogen und ihren Zubereitungen.

Pharmazeutische Zeitung, 141 (15): 48-50

**HÖTZEL, D. (1996)**

β-Carotin: Fakten, Vermutungen, Trugschlüsse.

Pharmazeutische Zeitung, 141 (15): 48-50

**INOUE,S.; OKADA, K.; TANINO, H.; KAKOI, H.; GOTO, T. (1980)**

Trace characterisation of the fluorescent substances of a dinoflagellate, *Noctiluca miliaris*.  
Chemistry Letters: 297-298

**JAKI, B.; ORJALA, J.; STICHER, O. (1998)**

New extracellular diterpenoids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*.

46<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Vienna 1998 - Abstracts

**KEATING, K.J. (1978)**

Blue-green algal inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic community structure.

Science, 199: 971-973

**KENYON, C.N. (1972)**

Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae.

Journal of Bacteriology, 109: 827-834

**KENYON, C.N.; RIPPKA, R.; STANIER, R.Y. (1972)**

Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae.

Archiv für Mikrobiologie, 83: 216-236

**KINDL,U. (1995)**

Neue Erkenntnisse zu Betacaroten.

Pharmazeutische Zeitung, 140 (27): 42

**KINGHORN, A.D.; HARJES, K.K.; DOORENBOS, N.J. (1977)**

Screening procedure for phorbol esters using brine shrimp (*Artemia salina*) larvae.

Journal of Pharmaceutical Sciences 66: 1362-1363

**KIVIRANTA, J.; SIVONEN, K.; NIEMELÄ, S.I. (1991)**

Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay.

Environmental Toxicology and Water Quality, 6: 423-436

**KOCH, H.P.; HÜHNLER, G. (1995)**

Chlorophyll: Blattgrün als Naturarzneimittel.

Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 1995

**KOHLHASE, M.; POHL, P. (1988)**

Saturated and unsaturated sterols of nitrogen-fixing blue-green algae (cyanobacteria).

Phytochemistry, 27: 1735-1740

**LEE, E.S.J.; GLEASON, F.K. (1994)**

A second algicidal natural product from the cyanobacterium *Scytonema hofmannii*.

Plant Science, 103: 155-160

**LEISTNER, E.; BRECKLE, S.-W. (1992)**

Pharmazeutische Biologie I, 4. Auflage

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1992

**MARTENS, D.A.; FRANKENBERG, W.T.JR. (1993)**

Metabolism of tryptophan in soil.

Soil Biology and Biochemistry, 25 (12): 1679-1687

**MELDAHL, A.S.; EDVARSEN, B.; FONNUM, F. (1994)**

Toxicity of four potentially ichthyotoxic marine phytoflagellates determined by four different test methods.

Journal of Toxicology and Environmental Health, 42: 289-301

**METTING, B.; PYNE, J.W. (1986)**

Biologically active compounds from microalgae.

Enzyme and Microbial Technology, 8 (7): 386-394

**MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.;  
MCLAUGHLIN, J.L. (1982)**

Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.

Planta Medica, 45: 31-34

**MOORE, R.E (1996)**

Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review.

Journal of Industrial Microbiology 16 (2): 134-143

**MOORE, R.E.; CHEUK, C.; PATTERSON, G.M.L. (1984)**

Hapalindols: New alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*.

Journal of the American Chemical Society, 106 (21): 6456

**MÜHLING, M.; WHITTON, B.A.; HARRIS, N.; WILMOTTE, A.; BELAY, A.; OTA, Y. (1999)**

Variation in the fatty acid composition of *Athrospira* ("Spirulina") strains.

8<sup>th</sup> International Conference on Applied Algology, Montecatini Terme 1999 - Abstracts

**MUNDT, S.; TEUSCHER, E. (1988)**

Blauialgen als Quelle pharmakologisch aktiver Verbindungen.

Die Pharmazie, 43: 809-813

**NELIS, H.J.C.F.; DE LEENHER, A.P. (1983)**

Isocratic nonaqueous reversed-phased liquid chromatography of carotenoids.

Analytical Chemistry, 55: 270-275

**NELIS, H.J.C.F.; DE LEENHER, A.P. (1988)**

Reversed-phased liquid chromatography of astacene.

Journal of chromatography, 452: 535-542

**NELIS, H.J.C.F.; DE LEENHER, A.P. (1991)**

Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds.

Journal of Applied Bacteriology, 70: 181-191

**NEUGEBAUER, M. (1992)**

Chromatographische Analysenmethoden.

In: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, (Rücker,G.; Neugebauer,M.; Willems,G.G.; eds.),

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992

**NORTON, R.S.; WELLS, R.J. (1982)**

A series of chiral polybrominated biindoles from the blue-green marine alga *Rivularia firma*. Application of <sup>13</sup>C NMR spin-lattice relaxation data and <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H coupling constants to structure elucidation.

Journal of the American Chemical Society, 104: 3628-3635

**PACHALY, P. (1991)**

DC-Atlas: Dünnschichtchromatographie in der Apotheke.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1991

**PAERL, H.W.; MILLIE, D.F. (1996)**

Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria.

Phycologia, 35 (6 Suppl.): 160-167

**PAETOW, F.; POHL, P. (1999)**

Utilisation of carbon dioxide and of sodium bicarbonate as conversion product from flue gas of a "Combined heat and power generation unit" for the mass culture of microalgae producing compounds of pharmaceutical and medicinal interest.

8<sup>th</sup> International Conference on Applied Algology, Montecatini Terme 1999 - Abstracts

**PAINTER (1983)**

Algal polysaccharides. In: The Polysaccharides (Aspinall, G.O.; ed.)

Academic Press, 2: 195-285

**PALE, E.; NACRO, M.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRE, R. (1997)**

Anthocyanins from bambara groundnut (*Vigna subterranea*).

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 (9): 3359-3361

**PAPKE, U.; GROSS, E.M.; FRANCKE, W. (1997)**

Isolation, Identification and Determination of the absolute configuration of fischerellin B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*.

Tetrahedron Letters, 38(3): 379-382

**PASCAUD, M. (1993)**

The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response.

Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco) 0 (Spec.Issue 12): 49-57

**PATTERSON, G.M.L.; BAKER, K.K.; BALDWIN, C.L.; BOLIS, C.M.; CAPLAN, F.R.; LARSEN, L.K.; LEVINE, I.A.; MOORE, R.E.; NELSON, C.S.; TSCHAPPAT, K.D.; TUANG, G.D.; BOYD, M.R.; CARDELLINA II, J.H.; COLLINS R.P.; GUSTAFSON, K.R.; SNADER, K.M.; WEISLOW, O.S.; LEWIN, R.A. (1993)**

Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta).

Journal of Phycology, 29: 125-130

**PATTERSON, G.M.L.; LARSEN, L.K.; MOORE, R.E. (1994)**

Bioactive natural products from blue-green algae.

Journal of Applied Phycology, 6: 151-157

**POHL, P. (1982)**

Lipids and fatty acids of microalgae.

In: CRC-Handbook of Biosolar Resources, Vol.I, Part 1 (Zaborsky,O.R.; Mitsui,A.; Black,C.C.; eds.)

CRC-Press, Boca Raton, 383-404

**POHL, P.; KOHLHASE, M.; KRAUTWURST, S.; BAASCH, K.H. (1987)**

An inexpensive inorganic medium for the mass cultivation of freshwater microalgae.

Phytochemistry, 26 (6): 1657-1659

**POHL, P.; ZURHEIDE, F. (1979)**

Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors.

In: Marine algae in Pharmaceutical Science, (Hoppe,H.A.; Levring,T.;Tanaka,Y.; eds.)

Walter de Gruyter, Berlin, 1979, 65

**POULET, S.A.; MARTIN-JÉZÉQUEL, V. (1983)**

Relationship between dissolved free amino acids, chemical composition and growth in the marine diatom *Chaetoceres debile*.

Marine Biology, 77: 99-100

**PUSHPARAJ, B.; PELOSI, E.; CARLOZZI, P.; TORZILLO, G. (1995)**

Yield and biochemical composition of a marine cyanobacterium (*Nodularia* sp.) in outdoor culture.

Aquatic Microbial Ecology, 9: 13-16

**RAPALA, J.; SIVONEN, K.; LYRA, C.; NIEMELÄ, S.I. (1997)**

Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* ssp. as a function of growth stimuli.

Applied and Environmental Microbiology, 63 (6): 2206-2212

**RICHMOND, A. (1986)**

Microalgae of Economic Potential.

In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture (Richmond, A.;ed.)

CRC Press Boca Raton, Florida: 421-454

**RICHMOND, A. (1988)**

*Spirulina*.

In: Micro-algal biotechnology, (Borowitzka, M.A.; Borowitzka, L.J.; eds.)

Cambridge University Press, 1988: 153-196

**RINEHARDT, K.L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B.W. (1994)**

Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria).

Journal of Applied Phycology 6: 159-176

**ROBINSON, A.B.; MANLY, K.F.; ANTHONY, M.P.; CATCHPOOL, J.F.; PAULING L. (1965)**

Anesthesia of *Artemia* larvae: Method for quantitative study.

Science, 149: 1255-1258

**ROMANO, I.; NICOLAUS, B.; BELLITTI, M.R.; MANCA, M.C.; PAGNOTTO, E.; LAMA, L.; GAMBACORTA, A. (1999)**

Lipid pattern, a rapid useful method for classification of new cyanobacteria.

8<sup>th</sup> International Conference on Applied Algology, Montecatini Terme 1999 - Abstracts

**SAITO, K.; MATSUMOTO, M.; SEKINE, T.; MURAKOSHI, I. (1989)**

Inhibitory substances from *Myriophyllum brasiliense* on growth of blue-green algae.

Journal of Natural Products, 52(6): 1221-1226

**SANCHEZ-FORTUN, S.; SANZ, F.; BARAHONA, M.V. (1996)**

Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 31 (3): 391-398

**SANDFORD, P.A.; BAIRD, J. (1983)**

Industrial utilisation of polysaccharides.

In: The Polysaccharides. (Aspinall, G.O.; ed.)

Academic Press Inc., Vol.2: 411-490

**SCHLEGEL, I.; THANH DOAN, N.; DE CHAZAL, N.; SMITH, G.D. (1999)**

Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria.

Journal of Applied Phycology, 10: 471-479

**SCHLÖSSER, U.G. (1994)**

SAG – Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen

Botanica Acta, 107 (3): 113-186

**SCHUHMACHER, R.W.; DAVIDSON, B.S. (1995)**

Didemnolines A-D, new N9-substituted  $\beta$ -carboline from the marine ascidian *Didemnum* sp.

Tetrahedron, 51 (37): 10125-10130

**SHAHRZAD, S.; BITSCH, I (1996)**

Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography.

Journal of Chromatography A, 741: 223-231

**SMETACEK, V. (1991)**

Die Primärproduktion der marinen Plankton-Algen.

Spektrum der Wissenschaft, 12: 52-63

**SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. (1993)**

A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp).

Planta Medica, 59: 250-252

**SOLYAKOV, A.; SKOG, K.; JAGERSTAD, M. (1999)**

Heterocyclic amines in process flavours, process flavour ingredients, bouillon concentrates and a pan residue.

Food and Chemical Toxicology, 37 (1): 1-11

**STRASBURGER - LEHRBUCH DER BOTANIK FÜR HOCHSCHULEN (1998)**

34. Auflage, neubearbeitet von P.Sitte, H.Ziegler, F.Ehrendorfer und A.Bresinsky

Gustav Fischer Verlag

**SYNAK, R.; ZAREBSKA, I.; KENTZER, T. (1986)**

The use of a resin adsorbent to isolate cytokinins from sea water.

Biologia Plantarum, 28 (6): 412-416

**TARPLEY, W.A. (1958)**

Studies on the use of the brine shrimp *Artemia salina* (Leach) as a test organism for bioassay.

Journal of Economic Entomology, 51 (6): 780-783

**TEUSCHER, E. (1997)**

Biogene Arzneimittel, 5.Auflage

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

**TEUSCHER, E.; LINDEQUIST, U.; MUNDT, S. (1992)**

Cyanobakterien, Quellen biogener Wirkstoffe.

Pharmazeutische Zeitung Wissenschaft, 137 (2): 57-69

**TODOROVA, A.; JÜTTNER, F. (1996)**

Ecotoxicological analysis of nostocyclamide, a modified cyclic hexapeptide from *Nostoc*.

Phycologia, 35 (6 Suppl.):183-188

**TOTSUKA, Y.; HADA, N.; MATSUMOTO, K.I.; KAWAHARA, N.; MURAKAMI, Y.; YOKOYAMA, Y.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. (1998)**

Structural determination of a mutagenic aminophenylnorharman produced by the co-mutagen norharman with anilin.

Carcinogenesis-Oxford, 19 (1): 1995-2000

**VEPRITSKIY, A.A.; GROMOV, B.V.; TITOVA, N.N.; MAMKAYEVA, K.A. (1991)**

Production of the antibiotic algicide cyanobacterin LU-2 by the filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp.

Microbiology New York, 60 (6): 675-679

**VOLK, R.B. (1996)**

Kontrollierte Massenzucht von Mikroalgen unter zwei Gesichtspunkten:

Zwei-Stufen-Kultivierung zur Steigerung der Carotinoid- und Phycobiliprotein-Produktion und Suche nach Wachstumsinhibitoren aus Mikroalgen-Nährlösungen.

Dissertation, Kiel

**YAMADA, N.; MURAKAMI, N.; MORIMOTO, T.; SAKAKIBARA, J. (1993)**

Auto-growth inhibitory substance from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*.

Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 41(10): 1863-1865

**YAYLAYAN, V.; FORAGE, N.G. (1991)**

Determination of the kinetics and mechanism of decomposition of tryptophan Amadori rearrangement product by RP-HPLC analysis.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 364-369

**YOON, S.Y.; CHOI, W.J.; PARK, J.M.; YANG, J.W. (1997)**

Selective adsorption of flavonoid compounds from the leaf extract of *Ginkgo biloba* L.

Biotechnology Techniques, 11 (8): 553-556

**ZAHRADNICKOVA, H.; MARSALEK, B.; POLISENSKA, M. (1990)**

Determination of abscisic acid by HPTLC.

Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 3: 243-246

**ZURHEIDE, F. (1979)**

Die Bildung von Lipiden und Fettsäuren in Ostseealgen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren.

Dissertation, Kiel

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Prof. Dr. P. Pohl danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmöglichkeiten am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Kiel. Er hatte jederzeit für Fragen ein offenes Ohr und hat mir häufig mit seinen Anregungen entscheidend weitergeholfen.

Ganz besonders danke ich Dr. Ulrich Girreser für die Aufnahme der NMR- und der Massenspektren und die Unterstützung bei deren Auswertung.

Bei Britta Nilsson möchte ich mich für die Einführung in die Geheimnisse der Algenzucht und für die nette Zusammenarbeit in unserem Labor bedanken.

Frauke Rodde danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Semesterarbeit, insbesondere im PB II Praktikum.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen Dr. Rainer-Bertram Volk für die Weitergabe seiner Erfahrungen bezüglich der Nährlösungsmetaboliten, Franziska Paetow für ihre Hilfe bei der Fettsäureanalytik sowie meinen weiteren Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Dr. Birgit Classen, Dr. Walter Binder und Dr. Dieter Fischer für die gute Zusammenarbeit bei den Semesterpraktika.

Außerdem bedanke ich mich bei unseren studentischen Hilfskräften für die Unterstützung bei den vielen Extraktionen der Nährlösungen.

Inga Butenschön danke ich für die vielen aufmunternden Diskussionen sowie für das Scannen der Abbildungen, und Ralph Solveen danke ich für die vor allem im seelischen Bereich geleistete Unterstützung bei dieser Arbeit.

## Lebenslauf

Vor- und Familienname: Christina Barbara Schulze

Geburtsdatum: 4.Juni 1968

Geburtsort: Bremervörde

Eltern: Hille Schulze, geb. Mahler  
Eckart Schulze

Staatsangehörigkeit: deutsch

Abitur: 27.Mai 1987 am Gymnasium Heide-Ost in Heide

Ausbildung zur  
Pharmazeutisch-technischen Assistentin: 1.August 1988 bis 31.Juli 1990 an der Dr.von  
Morgenstern Schule in Lüneburg

PTA-Praktikum: 1.August 1990 bis 31.Januar 1991 in der  
Apotheke-Brome in Brome/Kreis Giffhorn

Studium der Pharmazie: SS 1991 bis WS 1994/95 an der Christian  
Albrechts Universität in Kiel

Pharmaziepraktikum: 1.August bis 31.Oktober 1995 und Mai 1996 in  
der Philippus Apotheke in Klausdorf/Schwentine,  
1.November 1995 bis 31.April 1996 bei der  
Bayer AG in Leverkusen

Pharmazeutische Prüfungen: 1.Abschnitt: 23.März 1993  
2. Abschnitt: 19.Mai 1995  
3. Abschnitt: 29.Juli 1996

Approbation als Apothekerin: 5.August 1996

Tätigkeit als Apothekerin: August 1996 in der Philippus Apotheke in  
Klausdorf/Schwentine

Wissenschaftliche Tätigkeit: seit dem 1.September 1996 wissenschaftliche  
Angestellte am Pharmazeutischen Institut,  
Abteilung Pharmazeutische Biologie,  
Universität Kiel und Beginn der Promotion