

German Society of Horticultural Sciences (DGG)
Lentzeallee 55/57
Humboldt-Universität zu Berlin
D-14195 Berlin



DGG-Proceedings, Vol. 4, 2014

Short Communications – Annual Conference DGG and BHGL
05.03. - 08.03. 2014, Dresden, Germany

Peer Reviewed

Editorial Board and Review

Dirksmeyer, Walter *Braunschweig*
Fricke, Andreas *Hannover*
Hardeweg, Bernd *Hannover*
Laber, Hermann *Dresden*
Mibus-Schoppe, Heiko *Geisenheim*
Michaelis, Gerlinde *Bad-Zwischenahn*
Rath, Thomas *Osnabrück*
Richter, Ellen *Braunschweig*
Schmidt, Uwe *Berlin*
Schuster, Mirko *Dresden*
Sparke, Kai *Geisenheim*
Thomas, Jens *Osnabrück*
Wackwitz, Wolf-Dietmar *Dresden*
Winkelmann, Traud *Hannover*
Zinkernagel, Jana *Geisenheim*
Zude, Manuela *Berlin*

Sandra Mareike Haase*, Thomas Rath, Bernhard Huchzermeyer

Einfluss pharmazeutischer Substanzen auf *Coccomyxa* sp. am Beispiel von Carbamazepin

*Corresponding Author:

Sandra Mareike Haase
Institute for Horticultural Production Systems
Leibniz Universität Hannover
Germany
Email: haase@bgt.uni-hannover.de

Einfluss pharmazeutischer Substanzen auf *Coccomyxa* sp. am Beispiel von Carbamazepin

Sandra Mareike Haase^{1,2}, Thomas Rath³, Bernhard Huchzermeyer¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Botanik

²Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme

³Hochschule Osnabrück, Labor für Biosystemtechnik - BLab

1. Einleitung, Stand des Wissens, Zielsetzung

Jährlich wird eine hohe Anzahl pharmazeutisch wirksamer Substanzen in biologisch aktiven Konzentrationen im Wasserkreislauf detektiert [Herberer *et al.* (2002)], von denen viele aufgrund einer sehr geringen Abbaurrate unverändert aus Kläranlagen in die Oberflächenwasser gelangen. In einigen Fällen reichen bereits niedrige Konzentrationen dieser Substanzen aus, um einen negativen Einfluss auf das Ökosystem auszuüben [u.a. Jones *et al.* (2005)]. Als Beispiel für eine Umweltkontamination ist das Antiepileptikum Carbamazepin (CBZ) zu sehen. CBZ wird zur Behandlung von Epilepsie, Demenz etc. eingesetzt und weist die kritischen Eigenschaften persistenter, pharmazeutischer Verunreinigungen im Wasserkreislauf auf [Clara *et al.* (2004)]. Bisher wurde noch keine zufriedenstellende Lösung des CBZ-Abwasserproblems gefunden. Denkbar ist ein Einsatz von Mikroalgen, da für sie ein hohes Potential zum Einsatz als biologische Filter für CBZ aufgezeigt wird [u.a. Vernouillet *et al.* (2010)]. Entscheidend dabei ist der intrazelluläre CBZ-Abbau in der Algenzelle.

Veränderungen der intra- und extrazellulären CBZ-Konzentration können über chromatographische (HPLC) und antikörperbasierte Analysen (ELISA) bestimmt werden. Zusätzlich sollte die Bildung toxischer Metabolite analysiert werden.

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen pharmazeutischer Substanzen auf eine Mikroalgenart *Coccomyxa* sp., am Beispiel von CBZ, systematisch zu untersuchen und notwendige Messmethoden zu etablieren.

2. Material und Methoden

Algenkultur: Der Fokus der Untersuchungen lag auf der heimischen, im Fluss Leine häufig vorkommenden, Mikroalgenart *Coccomyxa* sp.. Sie wurde aus dem Flusswasser isoliert und phänotypisch bestimmt. Im Folgenden sind daher die Ergebnisse exemplarisch für *Coccomyxa* sp. aufgezeigt. Die Algenkulturen wurden in 200 ml Erlenmeyerkolben als Schüttelkultur (Kompaktschüttler (LTF, Wasserburg), 100 U min⁻¹) in 2 % Düngermedium (Universal-Dünger mit Seevogel-Guano, Max Bahr (Kirkel, Deutschland); pH 7) bei 20 °C und einer Lichtintensität von 120 µmol m⁻² s⁻¹ kultiviert. Für die Stressuntersuchungen wurde CBZ in der durchschnittlich in deutschen Flüssen auftretenden Konzentration (1 µg L⁻¹) zugesetzt. In allen Experimenten wurden 3

biologische Wiederholungen durchgeführt. Alle gezeigten Tests wurden mit jeweils 14 bis 17 Millionen Zellen pro Kultur angeimpft. Die Wachstumsrate wurde auf Basis einer Eichkurve durch Messung ihrer apparenten Absorption bei 850 nm bestimmt.

Chlorophyll Fluoreszenz: Die Chlorophyll Fluoreszenz wurde mit einem Imaging PAM Fluorimeter (WALZ, Effeltrich, Deutschland) in 24-Well Platten gemessen. Dazu wurden dunkel adaptierte Algensuspensionen eingesetzt. Fluoreszenzparameter wurden mit der internen Software ausgewertet.

Pigmentgehalt: Pigmente wurden extrahiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt [Röbbelen (1957)].

Zellextrakt: Zur Gewinnung der Zellextrakte wurden Algensedimente in einer Zelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) mit Keramik Beads aufgeschlossen (4 min; 30 s⁻¹). Die weiteren Schritte zur Gewinnung des Zellüberstandes wurden nach der Methode von Vernouillet *et al.* (2010) durchgeführt. Der Überstand wurde in folgenden Tests eingesetzt:

Superoxid Dismutase (SOD): Die SOD-Aktivität wurde indirekt über die Hemmung der Autooxidation von Pyrogallol nach Marklund and Marklund (1974) gemessen. Eine Identifizierung der gebildeten Oxidationsprodukte ist aufgrund überlagernder Absorptionsspektren nicht möglich [Abrash *et al.* (1989)]. Daher wurde die Änderung der Absorption in Units angegeben. Ein Unit entspricht einer 50 %igen Hemmung der Pyrogallol Autooxidation.

Katalase (CAT): Die Enzym-Aktivität wurde durch Messung der Extinktionsänderung bei 250 nm in Mikrotiterplatten bestimmt. Dazu wurde die Methode von Zhang *et al.* (2004) entsprechend modifiziert. 1 µl Zellextrakt wurden in 0,3 ml Inkubationsmedium (67 mM Phosphat Puffer, pH 7,0 und 0,5 mM H₂O₂) inkubiert. Zur Berechnung der Aktivität wurde der Extinktionskoeffizient von H₂O₂ mit 26,3 L mol⁻¹cm⁻¹ verwendet.

Glutathion-Reduktase (GR): Die GR-Aktivität wurde nach der Methode von Vernouillet *et al.* (2010) mit einem Extinktionskoeffizient von 14.150 L mol⁻¹cm⁻¹ [Sigma 2014] bestimmt.

Lipidperoxidation: Als Maß für die Lipidperoxidation wurde der Gehalt an Malondialdehyd mit einem Extinktionskoeffizienten von 155 L mmol⁻¹cm⁻¹ gemessen [Heath and Packer (1968)].

Glutathiongehalt: Der Gehalt an reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion wurde nach der Methode von Rahman *et al.* (2007) gemessen.

Datenanalyse: Die Wachstumsraten wurden über eine 4-parametrische sigmoidale Kurvenanpassung mit Sigma Plot (Systat Software Inc., London, England) bestimmt. Statistische Auswertungen der experimentellen Daten erfolgten mit dem Programm Statistica (StatSoft, Hamburg, Deutschland). Varianzanalysen wurden in Verbindung mit einem HSD-Test nach Dunnett (p=0,05) gerechnet. Signifikanzen wurden immer in Bezug auf die jeweilige Kontrolle angegeben und mit * gekennzeichnet. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Enzymaktivitäten auf die entsprechende Zellzahl (10⁶ Zellen) bezogen.

3. Ergebnisse

Für die weiteren Stressuntersuchungen wurden die Wendepunkte der exponentiellen Wachstumsphasen als Zeitpunkt der höchsten enzymatischen Aktivität ausgewählt. Es ergab sich der 4. bzw. der 6. Tag (siehe Abbildung1).

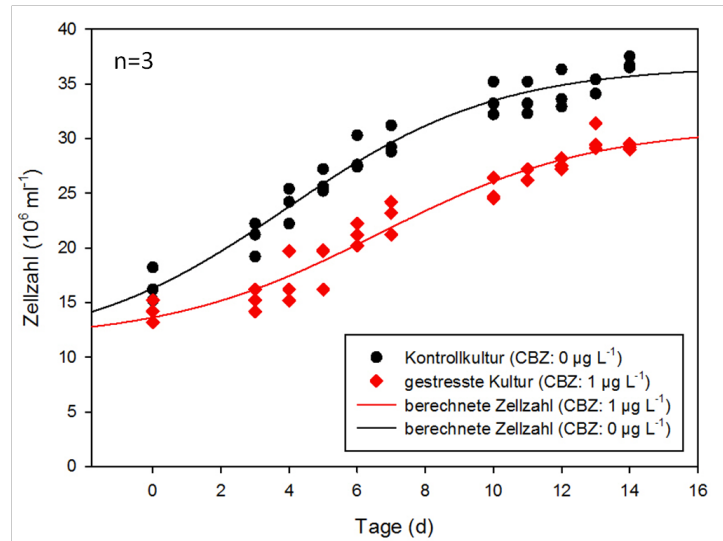


Abb.1: Wachstumskurve von *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit der CBZ-Konzentration; n=3, berechneter Verlauf nach Sigma Plot (4 Parameter, sigmoidaler Fit).

Für die entsprechenden Messtage sind die Photosyntheseparameter in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 1: Durchschnittliche und auf 10⁶ Zellen bezogene Photosyntheseparameter am Wendepunkt der Wachstumskurven für *Coccomyxa* sp. (n=15); * kennzeichnet die signifikanten Veränderungen (p=0,05).

Parameter der Photosynthese	Mittelwert ± STABW	
	Kontrollkultur (CBZ: 0 µg L ⁻¹)	gestresste Kultur (CBZ: 1 µg L ⁻¹)
Chlorophyll Fluoreszenz (-)		
- nicht-photochemisches Fluoreszenzquenching (NPQ)	0,44±0,04	0,57*±0,01
- Elektronentransportrate (ETR)	6,13±1,93	6,12±0,76
Pigmentgehalt (µg)		
- Chlorophyll a	0,54±0,09	1,17*±0,35
- Chlorophyll b	0,31±0,13	0,73±0,37
- Carotinoide	0,14±0,02	0,50*±0,09
Enzymaktivitäten		
- Superoxid Dismutase (U)	155,1±47,0	546,6*±133,6
- Katalase (mmol L ⁻¹)	0,07±0,30	-0,46±0,35
- Glutathion-Reduktase (nmol L ⁻¹)	0,19±0,01	0,47*±0,03
Lipidperoxidation (nmol L⁻¹)	67,6±9,29	141,6*±3,56
Glutathion (nmol L⁻¹)		
- Glutathion _{reduziert} (GSH)	0,24±0,4·10 ⁻²	0,29±3,9·10 ⁻²
- Glutathion _{oxidiert} (GSSG)	0,31±0,08	1,21*±0,07

Die Messung der Photosyntheseparameter lieferte signifikante Messunterschiede zur Kontrollkultur im NPQ-Gehalt, im Chlorophyll-a- und Carotinoid-Gehalt, in der SOD- und GR-Aktivität, in der Lipidperoxidation sowie im GSSG-Gehalt.

4. Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass umweltrelevante CBZ-Konzentrationen Effekte, hervorgerufen durch oxidativen Stress, bei der Mikroalge *Coccomyxa* sp. verstärken können.

Der hemmende Effekt von CBZ in umweltrelevanter Konzentration auf das Wachstum von *Coccomyxa* sp. konnte in dieser Studie gezeigt werden. Der Einsatz von $1 \mu\text{g CBZ L}^{-1}$ erzielte dabei eine Hemmung von 54 % gegenüber der Kontrolle. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können zu einer Wachstumshemmung beitragen [Melis (1999)].

Mit den folgenden Analysen sollte herausgefunden werden, welche biochemischen Parameter mit der CBZ-induzierten Wachstumshemmung korrelieren. Signifikante Veränderungen konnte im Chlorophyll-a- und Carotinoidgehalt sowie im nicht-photochemischen Fluoreszenzquenching (NPQ) gemessen werden. Der CBZ induzierte Anstieg im Chlorophyllgehalt deutet auf eine erhöhte Gefährdung der Zellen durch die Produktion von ROS hin. Der Anstieg im Chlorophyll-a-Gehalt geht allerdings einher mit einem Anstieg im Carotinoidgehalt sowie im NPQ. Carotinoide und das NPQ sind zelleigene Abwehrmechanismen zur Kompensation intrazellulärer ROS-Bildung durch erhöhten Energieabbau [Buchanan *et al.* (2000); Szabo *et al.* (2005)]. Dieser Energieabbau ist ein entscheidender Prozess für den Schutz des photosynthetischen Elektronentransports [Melis (1999)]. Auch eine erhöhte SOD-Aktivität deutet auf eine ROS-Entgiftung hin [Marklund and Marklund (1974)]. Veränderungen im Elektronentransport können zur Hemmung grundlegender Stoffwechselprozesse (z. B. Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie) führen. In dieser Studie konnte jedoch kein CBZ-Effekt auf den Elektronentransport gemessen werden. Eine CBZ-Konzentration von $1 \mu\text{g CBZ L}^{-1}$ führte zu einem signifikanten Anstieg der Lipidperoxidations-Produkte. Die Fähigkeit von CBZ Lipidperoxidations-Produkte zu bilden wurde erstmalig von Tsiaka *et al.* (2013) beschrieben. Als mögliche Ursachen sind eine CBZ-Aufnahme in die Zelle [Andreozzi *et al.* (2002)] und weitere intrazelluläre Metabolisierungsschritte [Vernouillet *et al.* (2010)] zu nennen.

Der Fokus weiterer Analysemethoden lag auf der Entgiftung der ROS. Es ist anzunehmen, dass die ROS-Entgiftung in der getesteten Mikroalge über Glutathion erfolgt. Sowohl der GSSG-Gehalt als auch die Aktivität des katalysierenden Enzyms (GR) wiesen eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle auf. Eine Steigerung der CAT-Aktivität konnte nicht gemessen werden. Zur Dokumentation des intrazellulären CBZ-Abbaus sind weitergehende Analysen wie HPLC und ELISA notwendig.

5. Schlussfolgerung

Die Durchführung der etablierten Messmethoden ermöglicht eine erste Aussage über den physiologischen Einfluss sowie eine intrazelluläre Aufnahme von CBZ bei Mikroalgen.

Für die Auswahl geeigneter Mikroalgenspezies zum Einsatz als Biofilter sind weitere Analysen notwendig, bei denen *Coccomyxa* sp. als Referenz genutzt werden könnte.

6. Literatur

- Abrash H.I., Shih D., Elias, W., Malekmehr, F. (1989) A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin, *International Journal of Chemical Kinetics*, 21, 465-476
- Andreozzi R., Marotta R., Pinto G., Pollio A. (2002) Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity, *Water Research*, 36, 2869-2877
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plants Biologists, Rockville, USA
- Clara M., Strenn B., Kreuzinger N. (2004) Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behavior of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration, *Water Research* 38,947-954
- Heath R., Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125 (1), 189-198
- Herberer T., Reddersen K., Mechlinski A. (2002) From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas, *Water Science and Technology* 46(3),81-88
- Jones O.A.H., Lester J.N., Voulvoulis N. (2005) Pharmaceuticals: a threat to drinking water? In: *Trends in Biotechnology* (23-4),163-167
- Marklund S., Marklund G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry* 47, 469-474
- Melis A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in plant science*, 4, 4, 130-135
- Rahman I., Kode A., Biswas S.K. (2007) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method *Nature Protocols* 1, 6,3159-3165
- Röbbelen G. (1957) Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 88,189-252
- Sigma (2014) Produktinformation für 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid); Abrufdatum: 04.2014
- Szabo I., Bergantino E., Giacometti G. M. (2005) Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation, *EMBO Reports* 6
- Tsiaka P., Tsarpali V., Ntaikou I., Kostopoulou M.N., Lyberatos G., Dailianis S. (2013) Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Ecotoxicology*, 22, 1208-1220
- Vernouillet G., Eullaffroy P., Lajeunesse A., Blaise C., Gagné F., Juneau P. (2010) Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels, *Chemosphere* 80,1062-1068
- Zhang J., Shen H., Wang X., Wu J., Xue Y. (2004) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus* *Chemosphere* 55,167-174