

**Hochschule Weihenstephan - Triesdorf**

**Fakultät Umweltingenieurwesen**

**Studiengang Umweltsicherung**

**B a c h e l o r a r b e i t**

**Untersuchung der Epimerverhältnisse von PSP-Toxinen aus *Alexandrium catenella* und  
*Gymnodinium catenatum***

eingereicht von:	Karina Krapf
Erstkorrektor:	Prof. Dr. Heidrun Rosenthal
Zweitkorrektor:	Dr. Bernd Krock (AWI)
Tag der Abgabe:	14.08.2018



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	V
Danksagung.....	VI
1. Abkürzungsverzeichnis.....	- 1 -
2. Einführung in das Thema: Algenblüten im Meer .....	- 2 -
3. Toxinproduzierende Dinoflagellaten .....	- 3 -
3.1. <i>Alexandrium catenella</i> (Whedon & Kofoid; Balech 1985) .....	- 3 -
3.2. <i>Gymnodinium catenatum</i> (Graham, 1943).....	- 4 -
4. Paralytic Shellfish Poisoning Toxine.....	- 4 -
4.1. Toxizität und Wirkung .....	- 5 -
4.2. Chemische Struktur der PSP-Toxine .....	- 5 -
4.3. Epimerisierung .....	- 7 -
4.4. Keto-Enol-Tautomerie.....	- 8 -
4.5. Umwandlungsprozesse der Toxine .....	- 10 -
4.6. Toxinprofile der Algen .....	- 11 -
5. Ziel der Arbeit.....	- 12 -
5.1. Physikalisch-chemischer Versuch .....	- 12 -
5.2. Biologischer Versuch .....	- 14 -
6. Material und Methoden.....	- 15 -
6.1. Herstellung des Nährmediums.....	- 15 -
6.2. Kultivierung der Algen .....	- 15 -
6.3. Ernte der Algenkulturen .....	- 16 -
6.4. Extraktion der Toxine .....	- 17 -
6.5. Hydrophile Interaktionschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie .....	- 18 -
6.6. Identifikation und Quantifizierung der Toxinkonzentrationen .....	- 20 -
6.7. Messgerät für die Toxinanalyse und Methoden.....	- 22 -
7. Ergebnisse.....	- 23 -
7.1. Physikalisch-chemischer Versuch .....	- 24 -
7.2. Biologischer Versuch .....	- 30 -
8. Diskussion.....	- 33 -
9. Fazit .....	- 36 -
10. Zusammenfassung.....	- 37 -
11. Ausblick.....	- 38 -
Literaturverzeichnis .....	- 39 -
Anhang .....	- 40 -
Erklärung.....	- 44 -

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die PSP-Toxine.....	- 6 -
Tab. 2: Epimerenpaare der PSP-Toxine.....	- 7 -
Tab. 3: Extraktionsmittel und Lagerungstemperaturen im physikalisch-chemischen Versuch.....	- 13 -
Tab. 4: H <sup>+</sup> - und OH <sup>-</sup> -Ionenkonzentration.....	- 13 -
Tab. 5: Verschiedene Kultivierungsbedingungen der Algen im biologischen Versuch.....	- 14 -
Tab. 6: Zellquoten von <i>Alexandrium catenella</i> und <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	- 23 -
Tab. 7: Epimerverhältnisse im Versuch mit <i>Alexandrium catenella</i> .....	- 25 -
Tab. 8: Epimerverhältnisse im Versuch mit <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	- 25 -
Tab. 9: Ausgangskonzentrationen der Carbamoyl-Toxine aus <i>G. catenatum</i> direkt nach der Extraktion.....	- 29 -
Tab. 10: Ausgangskonzentrationen der N-Sulfocarbamoyl-Toxine aus <i>G. catenatum</i> direkt nach der Extraktion.....	- 29 -
Tab. 11: Ausgangskonzentrationen der Decarbamoyl-Toxine aus <i>G. catenatum</i> direkt nach der Extraktion.....	- 29 -
Tab. 12: Ausgangskonzentrationen der Benzoyl-Toxine aus <i>G. catenatum</i> direkt nach der Extraktion.....	- 29 -
Tab. 13: Stoffkomponenten in einem Liter Nährmedium.....	- 40 -
Tab. 14: Stoffkomponenten in einem Liter Metalllösung.....	- 40 -
Tab. 15: Stoffkomponenten in einem Liter Vitaminlösung.....	- 40 -
Tab. 16: Basisdaten der Wachstumskurve von <i>Alexandrium catenella</i> .....	- 41 -
Tab. 17: Basisdaten der Wachstumskurve von <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	- 41 -
Tab. 18: Basisdaten der Regressionskurve in Abb. 13.....	- 41 -
Tab. 19: Gradientenverlauf der Eluenten.....	- 41 -
Tab. 20: Massenübergänge der Toxine und entsprechende Kollisionsenergie.....	- 43 -
Tab. 21: Einstellungen der Parameter am LCMS/MS.....	- 43 -

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Alexandrium catenella</i> , 32-fache Vergrößerung .....	3 -
Abb. 2: <i>Gymnodinium catenatum</i> , 20-fache Vergrößerung .....	4 -
Abb. 3: Grundgerüst der PSP-Toxine .....	5 -
Abb. 4: Darstellung eines PSP-Epimerenpaares .....	7 -
Abb. 5: Darstellung der Epimerisierung am Beispiel von GTX1 und GTX4 .....	9 -
Abb. 6: Umwandlungsschemata einiger PSP-Toxine .....	11 -
Abb. 7: Wachstumskurve von <i>Alexandrium catenella</i> .....	16 -
Abb. 8: Wachstumskurve von <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	16 -
Abb. 9: Darstellung der Phasen bei der HILIC .....	18 -
Abb. 10: Quadrupol-Massenfilter .....	19 -
Abb. 11: Selected Reaction Monitoring (SRM) .....	20 -
Abb. 12: Beispielhafte Auswertung des Toxins C1 .....	21 -
Abb. 13: Beispielhafte Regressionskurve von GTX4 .....	21 -
Abb. 14: Verwendetes LC-MS/MS für die Toxinanalyse: XEVO TQ-XS, Waters Corporation .....	22 -
Abb. 15: Toxinprofil von <i>Alexandrium catenella</i> und <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	23 -
Abb. 16: Stabile Epimerverhältnisse in den Gefrierschrank-Proben von <i>Alexandrium catenella</i> .....	25 -
Abb. 17: Desulfonierung in den <i>Alexandrium catenella</i> - Proben im HCl-Ofen – Behandlungsverfahren .....	26 -
Abb. 18: Desulfonierung in den <i>Gymnodinium catenatum</i> - Proben im HCl-Ofen – Behandlungsverfahren .....	26 -
Abb. 19: Epimerisierung in den AcOH-/H <sub>2</sub> O-/NaOH – Ofen-Behandlungsverfahren der Proben von <i>A. catenella</i> .....	27 -
Abb. 20: Epimerisierung in den AcOH-/H <sub>2</sub> O-/NaOH – Ofen -Behandlungsverfahren der Proben von <i>G. catenatum</i> .....	27 -
Abb. 21: Decarbamylierung bei hohen pH-Werten der Extraktionsmittel .....	27 -
Abb. 22: Abnehmende GesamtoxinKonzentration über die Zeit .....	28 -
Abb. 23: Toxingehalt und -profil von <i>Alexandrium catenella</i> unter verschiedenen Umweltbedingungen .....	30 -
Abb. 24: Toxingehalt und -profil von <i>Gymnodinium catenatum</i> unter verschiedenen Umweltbedingungen .....	31 -
Abb. 25: Epimerverhältnisse der PSP-Toxine von <i>Alexandrium catenella</i> unter verschiedenen Umweltbedingungen .....	31 -
Abb. 26: Epimerverhältnisse der PSP-Toxine von <i>Gymnodinium catenatum</i> unter verschiedenen Umweltbedingungen .....	32 -

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich im Rahmen meiner Bachelorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Bernd Krock, der mich während meiner Arbeit stets gut betreut hat und mir mit seiner fachlichen und persönlichen Unterstützung immer zur Seite stand.

Vielen Dank Herrn Dr. Urban Tillmann, der mich mit seiner Fachkompetenz bei Fragen rund um die Algenkulturen jederzeit unterstützte.

Frau Professor Heidrun Rosenthal gilt mein besonderer Dank für die gute Fernbetreuung und die stets gute Erreichbarkeit via E-Mail.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Annegret Müller und Herrn Thomas Max, die mir bei der Bedienung der Laborgeräte, insbesondere des LC-MS/MS, jederzeit helfend zur Seite standen.

## 1. Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
AWI	Alfred-Wegener-Institut – Helmholtz Zentrum für Polar- und Meeresforschung
dH <sub>2</sub> O	entionisiertes Wasser
ES-	Elektrospray Ionisation, negativ-Modus
ES+	Elektrospray Ionisation, positiv-Modus
ESI	Electrospray-Interface / Electrospray Ionisation
HCl	Salzsäure
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Ion-Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography / Flüssigkeitschromatographie
[M+H] <sup>+</sup>	Positiv geladenes Molekül mit einem zusätzlichen Proton
[M-H] <sup>-</sup>	Negativ geladenes Molekül mit einem Proton weniger
M	Molar
SRM	Selected Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer
NaOH	Natronlauge
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PST	Paralytic Shellfish Poisoning Toxins
psu	Practical Salinity Unit zur Angabe von Salzgehalten
UHPLC	Ultra Fast High Performance Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Chromatography
Vit.	Vitamin

## 2. Einführung in das Thema: Algenblüten im Meer

Um Algenblüten handelt es sich, wenn sich mikroskopisch kleine Planktonalgen so stark vermehren, dass diese in einer sehr hohen Zelldichte vorkommen. Bei einigen Arten kommt es zu farbigen Algenteppichen auf der Wasseroberfläche. Von den rund 5000 marinen Phytoplanktonarten produzieren ungefähr 80 Arten Toxine. Vor allem sich filtrierend ernährende Schalentiere, die suspendierte Nahrungspartikel aus dem Wasser abfangen, nehmen auf diese Weise große Mengen an Toxinen auf. Während Wirbellose die Gifte in ihrem Gewebe in großen Mengen anreichern können, ohne Schaden davon zu tragen, sind Menschen und andere Wirbeltiere sehr empfindlich gegenüber den schädlichen Substanzen. Diese können sich über die Nahrungskette verbreiten und sich z.B. in Fischen, Walen und anderen Meeressäugern anreichern. Dadurch ist auch der Mensch gefährdet. Anfang des 21. Jahrhunderts wurden durch den Verzehr von toxinbelasteten Meerestieren global nahezu 2000 Erkrankungen jährlich gemeldet. 15% der Fälle endeten tödlich. (G.M. Hallegraeff, 2003)

Schon im Jahr 1937 wurde ein Zusammenhang zwischen Algenblüten und toxischen Muscheln festgestellt. Es stellte sich heraus, dass toxinbelastete Muscheln nach zwei Wochen in gefiltertem, ergo algenfreiem Wasser ihre Toxizität verlieren und sich die Toxine aber anschließend auch wieder anreichern können. Daraufhin wurden Algen für die kontaminierten Muscheln verantwortlich gemacht und biologische Tests eingeführt: Um den Grad der Toxizität in Meerestieren zu untersuchen, wurden Tierversuche an Mäusen durchgeführt. Diese Tests haben allerdings den Nachteil, dass sie nicht toxinspezifisch sind und es aufgrund der ethischen Fragwürdigkeit solcher Versuche einen großen Widerstand in der Bevölkerung gibt. (Luckas, 2005)

In vielen Ländern gibt es Monitoring-Programme zur Überwachung von Algenblüten. Neben dem Schutz der Konsumenten von Fisch und Meeresfrüchten, bezweckt diese Maßnahme auch Schäden an Fisch- und Krustentierressourcen möglichst gering zu halten und einem wirtschaftlichen Verlust in der Fischerei, der Aquakultur und der Tourismusbranche entgegenzuwirken. (G.M. Hallegraeff, 2003)

Algenblüten sind natürliche Phänomene, die in der Vergangenheit immer wieder aufgetreten sind, allerdings scheinen die gesundheitlichen und wirtschaftlichen Probleme in den letzten zwei Dekaden zum einen in ihrer Häufigkeit und zum anderen in ihrer Intensität zugenommen zu haben. Für diese Entwicklung gibt es verschiedene Erklärungen: Diesem Thema wird heutzutage in der Wissenschaft und den Medien mehr Aufmerksamkeit gewidmet als früher. Zudem wurden Muschelvergiftungen in der Vergangenheit oft nicht als solche erkannt, sondern als mikrobiologische Erkrankungen diagnostiziert. Außerdem werden Algenblüten durch menschliche Aktivitäten gefördert, da große Mengen an Nährstoffen durch die Landwirtschaft und andere Abwässer in das Meer eingebracht werden. Durch die zunehmende Anzahl an Aquakulturen in Küstengewässern bekommen Algenblüten und -toxine mehr Bedeutung, da diese die Fische schädigen bzw. töten können, indem sie unter anderem die Kiemengewebe angreifen. Gleichzeitig wird das Wachstum einiger Algenarten auch durch veränderte klimatologische Bedingungen (z.B. erhöhte Wassertemperaturen, stärkere Regenfälle) gefördert. Ein



weiterer Grund ist die Verschleppung von Arten durch das Ballastwasser von Schiffen bzw. durch den globalen Transport von Meerestieren, wodurch das Verbreitungsgebiet der einzelnen Spezies stark vergrößert wird. (G.M. Hallegraeff, 2003)

### 3. Toxinproduzierende Dinoflagellaten

Die in dieser Arbeit relevanten Toxine (PSP-Toxine, siehe Kapitel 4.) werden von Dinoflagellaten der Gattungen *Gymnodinium*, *Alexandrium* und *Pyrodinium* gebildet. Dinoflagellaten sind einzellige, eukaryotische Lebewesen, die sich mittels zweier Geißeln (Flagellen) fortbewegen. (G.M. Hallegraeff, 2003) Alle PSP-produzierenden Arten sind photoautotrophe Organismen und hauptsächlich Kettenbildner. Den größten Anteil mit zehn bekannten toxischen Arten macht die Gattung *Alexandrium* aus. Diese kommt vor allem in Küstenbereichen in gemäßigten Gewässern vor, nur vereinzelt im Mittelmeer, in tropischen Gebieten und der Arktis. Der stark gepanzerte Dinoflagellat *Pyrodinium bahamense* ist für die meistens PSP-Vorfälle in tropischen Gewässern des Indopazifiks und Mittelamerikas verantwortlich, wobei es sich immer um die kettenbildende Variante *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* handelt. Die Gattung *Gymnodinium* hat nur einen einzigen PSP-produzierenden Vertreter: *Gymnodinium catenatum*. (Cembella A. D., 1998)

Für die Untersuchung der zentralen Fragestellung (siehe Kapitel 5.) wurden *Alexandrium catenella*, als Vertreter der Gattung *Alexandrium*, und *Gymnodinium catenatum* gewählt. Von *Pyrodinium bahamense* war kein Stamm verfügbar.

#### 3.1. *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid; Balech 1985)

*Alexandrium catenella* war die erste Spezies, die mit PST in Verbindung gebracht wurde. Sie ist eine kettenbildende Art, wobei sie in Kulturen, wie auch in dem untersuchten Stamm, als einzelne Zellen auftreten können. *Alexandrium catenella* ist in kaltgemäßigten Gewässern wie an der Westküste Nordamerikas von Kalifornien bis Alaska, Japan, Chile, Argentinien, Neuseeland, Australien und Europa (Nordatlantik, Nord- und Ostsee) weit verbreitet. (G.M. Hallegraeff, 2003)



Abb. 1: *Alexandrium catenella*, 32-fache Vergrößerung (Foto: K. Krapf)

Der für diese Arbeit genutzte Stamm *Alexandrium catenella* kommt aus Oberflächensedimenten des argentinischen Schelfs aus 127 m Tiefe. Die Sedimentbeprobung fand am 1. November 2013 im San Matías Golf (Argentinien) statt (Station 23 a: 42° 1'11.34"S; 64° 52'6.24"O) und wurde von Marcela Borel vom Instituto Geológico del Sur (INGEOSUR) der Universidad Nacional del Sur (UNS) durchgeführt. Die Algen-Zysten wurden später am Alfred-Wegener-Institut isoliert und inkubiert, woraus dieser Stamm gewachsen ist.

### 3.2. *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943)

Die Art *Gymnodinium catenatum* ist eine kettenbildende, athekate Alge, die ein breites Spektrum an neurotoxischen Analoga des Saxitoxins bildet. Sie kommt an den Küsten aller Kontinente, außer der Antarktis vor, bevorzugt in Gewässern gemäßigter und subtropischer Klimazonen. An der Atlantikküste der iberischen Halbinsel, der Küste Tasmaniens und Südaustraliens und an der pazifischen Küste Mexikos kommt es aufgrund dieser Art des Öfteren zu Algenblüten. (Durán-Riveroll, Krock, & Cembella, 2017)

Der Stamm *Gymnodinium catenatum* wurde am 3. Juni 2017 während einer Algenblüte an der mexikanischen Pazifikküste in Bahía de la Paz (Niederkalifornien, Mexiko) von Christine Band-Schmidt vom CICIMAR in La Paz isoliert und am Alfred-Wegener-Institut inkubiert.



Abb. 2: *Gymnodinium catenatum*, 20-fache Vergrößerung (Foto: K. Krapf)

## 4. Paralytic Shellfish Poisoning Toxine

Phytoplankton kann eine Vielzahl verschiedener Toxine produzieren. Je nachdem welche Symptome diese beim Menschen verursachen, werden die Toxine in verschiedene Toxinklassen eingeteilt. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Toxine beschrieben.

#### 4.1. Toxizität und Wirkung

Aufgrund der unterschiedlichen Toxizität der Toxine, der vielfältigen Toxinprofile der Mikroalgen und der möglichen Biotransformation der Toxine in Fraßfeinden, stellt die Entwicklung von analytischen Methoden für die quantitative und qualitative Bestimmung von PSP-Toxinen eine Herausforderung dar. In den letzten Jahrzehnten gab es trotzdem große Fortschritte in der Entwicklung von verlässlichen und präzisen chemischen Analysemethoden als Alternative zu Tierversuchen, die bisher, angesichts der gesundheitlich schweren Folgen des Verzehrs kontaminierter Meerestiere, für die Lebensmittelkontrolle notwendig waren. Die Symptome können bei Aufnahme geringer Mengen an Toxinen lokale Taubheitsheitsgefühle, Übelkeit, Kopfschmerzen und Durchfall sein, im extremen Fall Muskellähmung, erschwertes Atmen bis zum Erstickungstod durch Atemlähmung. PSP-Toxine blockieren spannungsabhängige Natriumkanäle in den Membranen der Nervenzellen und hemmen so die Reizweiterleitung und die Kontraktion von Skelettmuskeln. Die Symptome treten zwischen 30 min und drei Stunden nach der Aufnahme der Toxine auf. Die Halbwertszeit von PSP ist mit 90 min relativ gering, was eine sofortige medizinische Behandlung relativ erfolgreich macht. Im Jahr 2003 lag die Rate an PST-Toten zwischen null Fällen in den USA und Europa und 2-14% in anderen Teilen der Welt, je nach Zugang zu medizinischer Behandlung in Krankenhäusern, Erfahrung im Umgang mit PSP-Erkrankungen und dem Umfang von Lebensmittelkontrollen. (G.M. Hallegraeff, 2003)

#### 4.2. Chemische Struktur der PSP-Toxine

Alle Paralytic Shellfish Poisoning Toxine besitzen die gleiche Grundstruktur (siehe Abb. 3). Je nach angehängtem Substituent R<sub>4</sub>, werden diese in verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 1). (Durán-Riveroll, Krock, & Cembella, 2017)

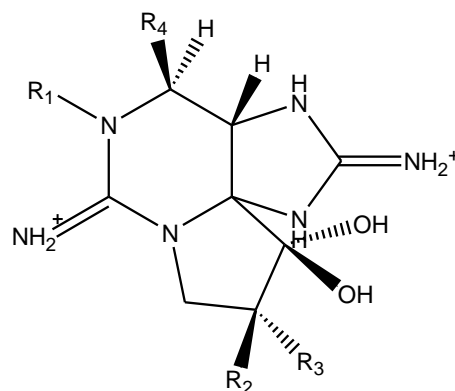
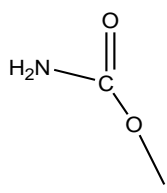
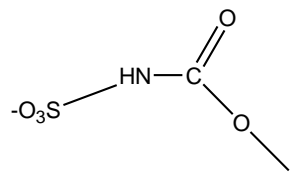

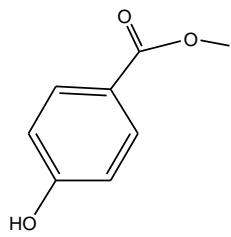
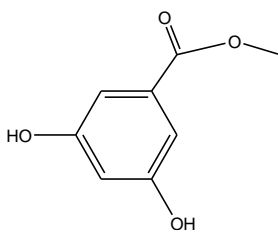
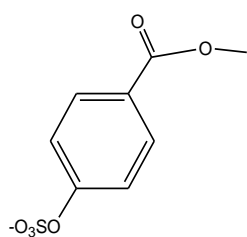


Abb. 3: Grundgerüst der PSP-Toxine (Eigene Abb.). R<sub>1</sub> bis R<sub>4</sub> stellen die variablen Substituenten der einzelnen Toxine dar. (Siehe Tab.1)

Gruppe	Toxin	R1	R2	R3	R4
<b>Carbamoyl-Gruppe</b>	STX	H	H	H	
	NEO	OH	H	H	
	GTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
<b>N-Sulfocarbamoyl-Gruppe</b>	B1 (GTX5)	H	H	H	
	B2 (GTX6)	OH	H	H	
	C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	C3	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	C4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
<b>Decarbamoyl-Gruppe</b>	dcSTX	H	H	H	
	dcNEO	OH	H	H	
	dcGTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dcGTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
<b>p-Hydroxybenzoyl-Gruppe</b>	GC1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GC2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GC3	H	H	H	
	GC4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GC5	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GC6	OH	H	H	
<b>di-Hydroxybenzoyl-Gruppe</b>	GC1a	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GC2a	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GC3a	H	H	H	
	GC4a	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GC5a	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GC6a	OH	H	H	
<b>Sulfo-benzoyl-Gruppe</b>	GC1b	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GC2b	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GC3b	H	H	H	
	GC4b	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GC5b	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GC6b	OH	H	H	

Tab. 1: Übersicht über die PSP-Toxine. (Durán-Riveroll, Krock, & Cembella, 2017)

### 4.3. Epimerisierung

Besitzt ein Molekül Chiralitätszentren, kommt es zur Bildung von Enantiomeren. Das bedeutet, dass an einem der Molekülatome Substituenten geknüpft sind, die bei spiegelbildlicher Anordnung nicht deckungsgleich sind. Kommen beide spiegelbildlichen Anordnungen eines Moleküls vor, das sich in seiner Konfiguration in genau einem Chiralitätszentrum unterscheidet, handelt es sich um Epimere. (Hellwich, 2007). In Tabelle 2 sind die Epimerenpaare der PSP-Toxine aufgelistet. Während der Keto-Enol-Umwandlung (siehe Kapitel 4.4.) können sich die Substituenten  $R_2$  und  $R_3$  vertauschen. In Abbildung 4 ist dies beispielhaft für C1 und C2 dargestellt. Bei C2 ist somit die Sulfatgruppe  $R_2$  statt  $R_3$  und der Wasserstoff  $R_3$  statt  $R_2$  (siehe Abb. 4).

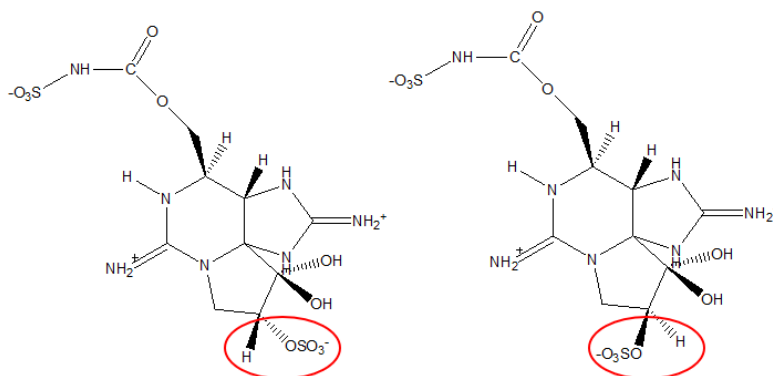


Abb. 4: Darstellung eines PSP-Epimerenpaares: Links: C1, rechts: C2. (Eigene Abb.)

<b>Alphamer</b>	GTX1	GTX2	C1	C3	dcGTX1	dcGTX2	GC1	GC4	GC1a	GC4a	GC1b	GC4b
<b>Betamer</b>	GTX4	GTX3	C2	C4	dcGTX4	dcGTX3	GC2	GC5	GC2a	GC5a	GC2b	GC5b

Tab. 2: Epimerenpaare der PSP-Toxine.

Zwischen den Epimerenpaaren gibt es ein thermodynamisches Äquilibrium. Das Gleichgewichtsverhältnis der Alpha- zu Betamere der Toxine GTX1-4 liegt bei ungefähr 3:1. Die energetisch instabileren Betamere tendieren dazu, sich in die energetisch stabileren Alphamere umzuwandeln. (Krock, Gloria Seguel, & Cembella, 2007)

#### 4.4. Keto-Enol-Tautomerie

Durch die Abspaltung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls können sich PSP-Toxine in Ketone umwandeln (siehe Abb. 5). Dieser Vorgang ist Voraussetzung für den Prozess der Keto-Enol-Tautomerie, der im Folgenden beschrieben wird und in Abbildung 5 dargestellt ist.

Ketone besitzen eine Carbonyl-Gruppe (C=O), die mit zwei C-Atomen verknüpft ist. Aufgrund der positiven Partialladung am Kohlenstoffatom und der negativen Partialladung am Sauerstoffatom hat die Carbonylgruppe polare Eigenschaften. Die Doppelbindung besteht aus einer stärkeren  $\sigma$ -Bindung und einer schwächeren  $\pi$ -Bindung. Durch die relativ schwache  $\pi$ -Bindung ist die Carbonylgruppe reaktiver als eine Kohlenstoff-Sauerstoff-Einfachbindung (C-O). (Patrick, 2004)

Ketone, die am  $\alpha$ -C-Atom (dem Kohlenstoffatom neben der Carbonylgruppe C=O) ein Wasserstoffatom gebunden haben, sind in der Lage sich in Enole umzulagern. Dieser spontan ablaufende reversible Vorgang wird Tautomerie genannt. Zwischen den beiden Tautomeren kommt es zu einem Gleichgewichtszustand, wobei die Keto-Form dominanter ist. Der Prozess kann sowohl in saurem, als auch in basischem Milieu stattfinden. (Patrick, 2004)

Im sauren Milieu geht das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe aufgrund seiner Nukleophilie mit einem seiner Elektronenpaare eine Bindung mit einem Proton (H<sup>+</sup>) ein. Dadurch bekommt es eine positive Ladung, was die Carbonylgruppe sofort versucht wieder auszugleichen. Durch die Abspaltung des  $\alpha$ -Protons (H<sup>+</sup>) durch ein Wassermolekül, kommt es zu einer C=C Doppelbindung und einer Ablösung der Carbonyl- $\pi$ -Bindung, worauf der positiv geladene Sauerstoff wieder neutralisiert wird. (Patrick, 2004)

Im Alkalischen bindet ein OH<sup>-</sup>-Ion das  $\alpha$ -Proton des Ketons an sich und bildet ein freies H<sub>2</sub>O-Molekül. Durch die Umlagerung der Elektronen kommt es zu einer C=C-Doppelbindung, worauf sich die  $\pi$ -Bindung der Carbonylgruppe auflöst und sich die beiden Elektronen am Carbonyl-Sauerstoff anlagern. Hierbei bekommt dieser eine zusätzliche negative Ladung, die er durch die Bindung eines Protons aus einem freien H<sub>2</sub>O-Molekül wieder ausgleicht. (Patrick, 2004)

Beim Umkehrprozess vom Enol zum Keton kann es passieren, dass sich der Wasserstoff auf der anderen Seite der benachbarten Sulfatgruppe anlagert. Wird dann die Doppelbindung des Ketons durch die Aufnahme eines H<sub>2</sub>O-Moleküls wieder aufgelöst, liegt das Toxin als das entsprechende Epimer vor.

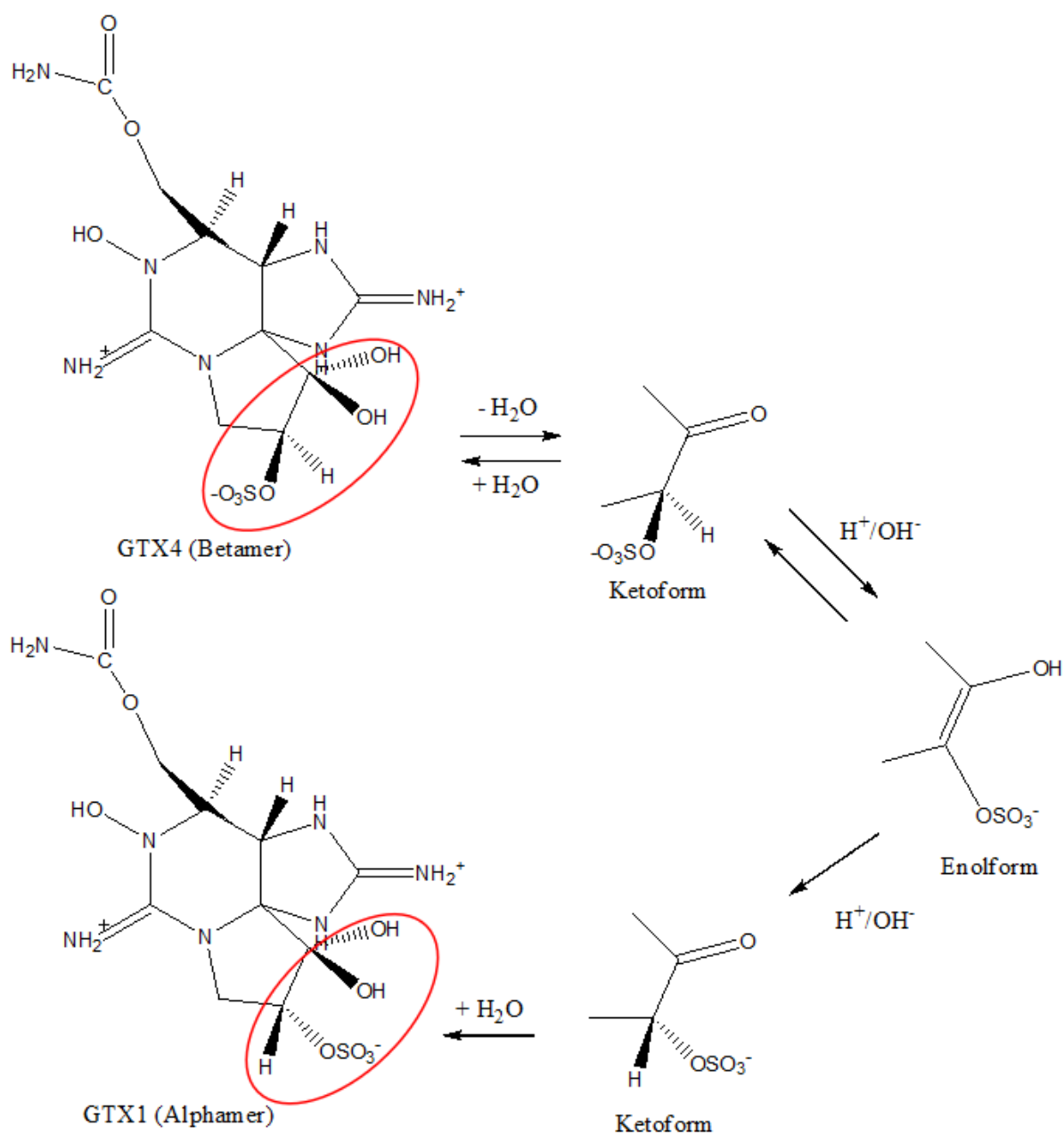


Abb. 5: Darstellung der Epimerisierung am Beispiel von GTX1 und GTX4. (Eigene Abb.)

#### 4.5. Umwandlungsprozesse der Toxine

PSP-Toxine sind in saurem Milieu bei Gefriertemperaturen stabil und können länger als ein Jahr bestehen. Hohe pH-Werte und Temperaturen führen zur Destabilisierung der Moleküle. In früheren Studien zu PSP-Transformationen in marinen Systemen wurden folgende fünf Reaktionen festgestellt (Gary J. Jones, 1997):

- Hydrolyse von Carbamoyl- und N-Sulfocarbamoyl-Toxinen zu Decarbamoyl-Analoga
- Hydrolyse (Desulfonierung) der N-Sulfocarbamoyl-Gruppe zur Carbamoyl-Gruppe
- Reduktive Abspaltung des C<sub>11</sub>-Sulfats (R<sub>2</sub>/R<sub>3</sub>-Sulfat-Substituent)
- Epimerisierung
- Reduktion der N<sub>1</sub>-OH-Gruppe (R<sub>1</sub>-OH-Substituent)

Die erste Reaktion beschreibt die Abspaltung der Carbamoyl- bzw. N-Sulfocarbamoyl-Gruppe am R<sub>4</sub>-Substituenten, sodass nur noch eine OH-Gruppe bestehen bleibt. Dadurch entstehen die entsprechenden Decarbamoyl-Toxine. Beispielsweise wandelt sich das Carbamoyl-Toxin GTX2 zu dcGTX2 bzw. GTX3 zu dcGTX3 um, die N-Sulfocarbamoyl-Toxine C1 zu dcGTX2 bzw. C2 zu dcGTX3 oder B1 zu dcSTX usw. Durch die Umwandlung der C-Toxine zu den Decarbamoyl-Toxinen kommt es zu einer Erhöhung der Toxizität, da erstere nur gering toxisch sind. Bei hohem pH läuft der Abbau zu den Decarbamoyl-Toxinen, aufgrund der Instabilität der PST unter alkalischen Bedingungen, relativ schnell ab. (Gary J. Jones, 1997)

Die Stickstoff-Schwefel (N-S) – Bindung an den C-Toxinen ist die schwächste Bindung des Moleküls. Deshalb kommt es zur Desulfonierung, bei der das Sulfon am Substituenten R<sub>4</sub> der N-Sulfocarbamoyl-Gruppe abgespalten wird. Dadurch wandeln sich die C-Toxine in die entsprechenden Carbamoyl-Toxine um. Verliert beispielsweise C2 seine Sulfongruppe, entsteht daraus GTX3, aus C1 wird GTX2, aus B1 wird STX usw. (Krock, Gloria Seguel, & Cembella, 2007)

Die dritte Reaktion bezieht sich auf die Abspaltung des Sulfats als Substituent R<sub>2</sub> bzw. R<sub>3</sub>. Diese Reaktion kann in allen PST-Gruppen ablaufen. Aus dem Epimerenpaar C1/2 wird B1, aus GTX2/3 wird STX, aus GC1/2 wird GC3 usw.

Ein weiterer wichtiger Vorgang unter den PSP-Toxinen stellt die in Kapitel 4.3. beschriebene Epimerisierung dar. Es wird vermutet, dass Alphamere durch diesen Prozess innerhalb der Zellen bzw. während der Extraktion der Toxine zunehmen, denn Dinoflagellaten produzieren Betamere in größeren Mengen als Alphamere, welche teilweise unterhalb der Nachweisgrenze bzw. nur in Spurenmengen vorliegen. (Pedro R. Costa, 2015) Diese Vermutung soll in dieser Arbeit überprüft werden.

Die fünfte Reaktion beschreibt die Abspaltung des R<sub>1</sub>-OH-Substituenten. Dadurch entstehen Umwandlungen wie zum Beispiel von GTX1 zu GTX2, von B2 zu B1, von NEO zu STX oder von GC6a zu GC3a.



Es ergeben sich zwei Umwandlungsschemata (siehe Abb. 6): Ausgehend von C2 können verschiedene Toxine entstehen. C2 kann zum einen zu C1 epimerisiert werden und zum anderen durch Sulfon-Abspaltung zu GTX3 umgewandelt werden. Durch Epimerisierung von GTX3 bzw. Sulfon-Abspaltung von C1 entsteht GTX2. Das andere Schema geht vom C4-Toxin aus: Dieses kann zu C3 epimerisieren und/oder sich durch Sulfon-Abspaltung zu GTX4 umwandeln. Am Ende entsteht GTX1 durch Epimerisierung von GTX4 bzw. Sulfon-Abspaltung von C3.

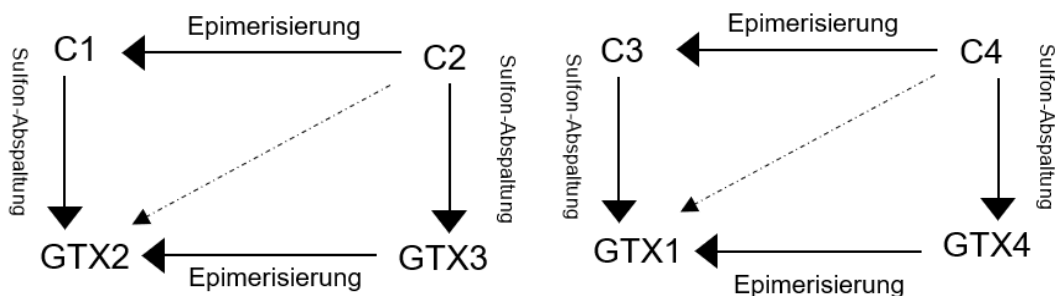


Abb. 6: Umwandlungsschemata einiger PSP-Toxine. (eigene Abb.)

#### 4.6. Toxinprofile der Algen

Bis zum Jahr 2006 war noch keine natürlich vorkommende toxische Dinoflagellaten-Population bekannt, die alle PST-Derivate herstellen kann. Wenngleich das Toxinprofil jeder Spezies anders ist, kann es nur bedingt als charakteristisches Merkmal einer Population zur Identifizierung herangezogen werden, da die Toxinzusammensetzung auch innerhalb der Art je nach geographischer Herkunft und den vorliegenden Umweltbedingungen variiert. (Band-Schmidt C. , 2006)

Bisher untersuchte Stämme von *Alexandrium catenella* bilden große Mengen an N-Sulfocarbamoyl-Toxinen, v.a. das Epimerenpaar C1/2, und an Carbamoyl-Toxinen, v.a. GTX1/4, während Decarbamoyl-Toxine bei dieser Art kaum vorkommen. (Krock, Gloria Seguel, & Cembella, 2007) *Gymnodinium catenatum* biosynthetisiert neben den drei eben aufgeführten Toxin-Gruppen noch die nach derselben Art genannten GC-Toxine (p-Hydroxybenzoyl-, di-Hydroxybenzoyl- und Sulfo-benzoyl-Toxine). (Durán-Riveroll, Krock, & Cembella, 2017)

Untersuchungen an verschiedenen *Gymnodinium catenatum* - Stämmen aus dem Kalifornischen Golf ergaben, dass Toxinprofile sogar zwischen verschiedenen Stämmen aus der gleichen Region variieren können. Sie unterscheiden sich sowohl im Toxinspektrum, als auch im Toxingehalt pro Zelle. Zudem macht es einen Unterschied, ob die Algen aus ihrer natürlichen Umgebung oder aus einer Kultur beprobt werden. Nach Band-Schmidt könnten geringere Toxizitäten unter Feldbedingungen durch variable Umweltbedingungen wie Lichtverhältnisse und Wassertemperatur, sowie geringere Nährstoffverfügbarkeiten zu begründen sein. Oft ist Stickstoff in Küstengewässern der

wachstumslimitierende Faktor. Bei diesen Experimenten konnten keine Unterschiede im Toxinprofil, abhängig vom Alter der Kultur oder vom Ursprung des Stammes (Inkubation aus einer Zyste oder einer vegetativen Zelle) festgestellt werden. (Band-Schmidt C. , 2006)

Die in dieser Arbeit dargestellten Toxinprofile beziehen sich nur auf die beiden untersuchten Stämme der Arten und berücksichtigen die in Kapitel 6.2. beschriebenen Kulturbedingungen. Gemessen wurden nur die Toxingruppen, die von der Art bekanntermaßen gebildet werden.

## 5. Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren kam in der Forschung an Algentoxinen am Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven folgender Verdacht auf: Da Betamer und Alphamer nach der Extraktion aus *Alexandrium spp.* und *Gymnodinium catenatum* häufig im Verhältnis >10:1 vorliegen, wird vermutet, dass nur die Betamere biosynthetisiert werden. (Cembella A. , 1998) Die Frage ist also, ob die Alphamere in den Algenzellen oder danach in der Probenaufbereitung durch physikalisch-chemische Einflussfaktoren (z.B. pH-Wert) aus den Betameren epimerisiert werden. (Krock, Gloria Seguel, & Cembella, 2007) Die der Arbeit zugrunde liegende Nullhypothese besagt, dass sowohl Betamere als auch Alphamere von den Algen gebildet werden und die Alphamere nicht durch Umwandlung aus dem Betamer entstehen.

### 5.1. Physikalisch-chemischer Versuch

Im physikalisch-chemischen Versuch wurde untersucht, wie sich das Verhältnis zwischen den Beta- und Alphameren nach der Toxinextraktion unter Einfluss verschiedener Faktoren mit der Zeit verhält. Es wurde zuerst eine Zeitreihe mit *Alexandrium catenella* durchgeführt, in der die Proben im Abstand von 24 h bzw. nach einigen Messungen in Abständen von bis zu einer Woche gemessen wurden, um eine zeitliche Entwicklung des Isomeren-Verhältnisses beobachten zu können. Nachdem erkannt wurde, dass sich die Umwandlungsprozesse über einige Wochen ziehen, wurden die Messungen im Versuch mit *Gymnodinium catenatum* im Abstand von sechs Tagen durchgeführt. Zum einen wurden die Toxine mit verschiedenen Extraktionsmitteln in Lösung gebracht, zum anderen zwischen den Messungen in unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Für jedes Behandlungsverfahren wurden drei Replikate gemessen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde, solange kein Ausreißer darunter war.

Als Extraktionsmittel wurden 0,1 molare Salzsäure (HCl) mit einem pH-Wert von 1,2, 0,03 molare Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) mit einem pH-Wert von 3,2, Leitungswasser mit einem pH-Wert von 7,8 und eine NaOH-Lösung mit einem pH-Wert von 9,8 genommen. Gelagert wurden die Proben im Gefrierschrank bei -35 °C, im Kühlschrank bei +8 °C, bei Raumtemperatur von 22 °C und im Ofen bei 35 °C (siehe Tab. 3).

Die Wahl der Temperaturen lässt sich folgendermaßen begründen: Toxinproben werden standardmäßig häufig im Gefrierschrank oder zumindest im Kühlschrank gelagert. Daher ist es interessant, ob eine lange Lagerzeit Auswirkung auf die Toxinverhältnisse hat. Eine weitere wichtige Fragestellung ist, ob die Dauer der Extraktion und Probenbearbeitung (bei Raumtemperatur) auf das Messergebnis Einfluss hat. In tropischen Ländern kann es auch zu Temperaturen von bis zu 35 °C kommen. Außerdem laufen die Prozesse bei höheren Temperaturen vermutlich am stärksten ab, wodurch die Vorgänge besser erkennbar sind.

Interessant ist zudem, wie die Epimerisierung bei unterschiedlichen pH-Werten abläuft, da diese bzw. der Vorgang der Keto-Enol-Tautomerie für den Ablauf H<sup>+</sup> bzw. OH<sup>-</sup>-Ionen benötigt. Standardmäßig wird mit 0,1 molarer Salzsäure oder 0,03 molarer Essigsäure extrahiert. Zudem wird noch ein pH im neutralen und alkalischen Bereich gewählt. Die größte H<sup>+</sup>-Konzentration ist in der Salzsäure, die größte OH<sup>-</sup>-Konzentration in der Natronlauge. Die höchste Gesamtkonzentration beider Ionen liegt in der Salzsäure vor. (siehe Tab. 4)

Auswahl der Extraktionsmittel			Temperatur-Behandlung	
pH-Wert	Extraktionsmittel	Stammlösung	Temperatur	Lagerort
1,2	0,1 M HCl		-35 °C	Gefrierschrank
3,2	0,03 M CH <sub>3</sub> COOH		+8 °C	Kühlschrank
7,8	Leitungswasser		+22 °C	Labor
9,8	1 µl der Stammlösung in 100 ml dH <sub>2</sub> O	5 g NaOH / 1 dH <sub>2</sub> O	+35 °C	Ofen

Tab. 3: Extraktionsmittel und Lagerungstemperaturen im physikalisch-chemischen Versuch

Extraktionsmittel	pH	H <sup>+</sup>	OH <sup>-</sup>	Summe H <sup>+</sup> / OH <sup>-</sup>
HCl	1,2	6,31E-02	1,58489E-13	6,31E-02
AcOH	3,2	6,31E-04	1,58489E-11	6,31E-04
H <sub>2</sub> O	7,8	1,58E-08	6,30957E-07	6,47E-07
NaOH	9,8	1,58E-10	6,30957E-05	6,31E-05

Tab. 4: H<sup>+</sup> - und OH<sup>-</sup>-Ionenkonzentration

## 5.2. Biologischer Versuch

Der biologische Versuch soll zeigen, ob die Epimerisierung, abhängig von den vorliegenden Umweltbedingungen, schon in der Alge stattfindet. Physikalische Faktoren, die die Organismen in ihrer Toxinproduktion beeinflussen können, sind zum Beispiel Licht-, Temperatur- und Salinitäts-Verhältnisse (Cembella A. D., 1998). In diesem Experiment wurde untersucht, welche Auswirkungen unterschiedliche Temperatur- und Salinitäts-Verhältnisse auf das Epimerverhältnis haben. Hierfür wurde der Stamm von *Alexandrium catenella* statt den üblichen Kultivierungsbedingungen (15 °C, Salinität ~31 psu) auch Temperaturen von 20 und 24 °C und Salzgehalten von 20 und 25 psu ausgesetzt. Ebenso wurde *Gymnodinium catenatum* statt in den für die Art optimalen Bedingungen von 24 °C und einem Salzgehalt von ~31 psu auch bei einer Temperatur von 15 bzw. 20 °C und einer Salinität von 20 und 25 psu kultiviert (siehe Tab. 5). Die Wahl der Parametereinstellungen ist ökologisch zu begründen. Da beide Algen weltweit vorkommen, wurden Temperaturen und Salzgehalte aus dem Wertebereich der Weltmeere genommen. In Küstengewässern, die für den Menschen in Bezug auf Algenblüten von Belang sind, kann sich der Salzgehalt durch Süßwasserzustrom aus Flüssen durchaus sehr verringern.

	<i>Alexandrium catenella</i>	<i>Gymnodinium catenatum</i>
<b>Optimale Bedingungen</b>	15 °C – 31 psu	24 °C – 31 psu
<b>Temperaturstress</b>	20 °C – 31 psu	20 °C – 31 psu
<b>Temperaturstress</b>	24 °C – 31 psu	15 °C – 31 psu
<b>Salinitäts-Stress</b>	15 °C – 25 psu	24 °C – 25 psu
<b>Salinitäts-Stress</b>	15 °C – 20 psu	24 °C – 20 psu

Tab. 5: Verschiedene Kultivierungsbedingungen der Algen im biologischen Versuch.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Herstellung des Nährmediums

Algen werden in Nährmedium kultiviert, um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten und somit eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen zu fördern. Die Nährlösung wurde in Anlehnung an das Rezept für K-Medium bzw. f/2-Medium des Nationalen Zentrums für marine Algen und Mikroorganismen Bigelow hergestellt (siehe Anhang: Tab. 13-15).

Für die Herstellung von ca. einem Liter K-Medium werden je 1 ml Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) und Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) zu einem Liter Meerwasser gegeben. Dazu kommt noch 0,1 ml Selenige Säure ( $\text{H}_2\text{SeO}_3$ ). Als pH-Puffer dient 1 ml TRIS-Puffer ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ). Des Weiteren benötigen die Algen Spurenmetalle für das Wachstum. Von der Spurenmetalllösung wird ebenfalls 1 ml hinzugegeben. Diese setzt sich zusammen aus Dinatrium-EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), Eisen(III)-chlorid ( $\text{FeCl}_3$ ), Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ ), Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4$ ), Cobaltdichlorid ( $\text{CoCl}_2$ ), Dinatriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) und Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ). Ebenso sind Vitamine für den Stoffwechsel der Algen essentiell. Für das Nährmedium werden 0,1 ml Vitamin – Lösung hinzugegeben, welche sich aus Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin H (Biotin) und Vitamin B12 (Cyanocobalamin) zusammensetzt. Danach wird das Medium durch Zugabe von Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) auf einen pH-Wert zwischen 8,0 und 8,2 eingestellt, um ähnliche Bedingungen wie im Meer zu schaffen. Zuletzt werden die durch das Meerwasser in das Nährmedium eingebrachten Fremdorganismen mithilfe einer Vakuumpumpe, welche das Medium durch einen Filter mit 2  $\mu\text{m}$  Maschenweite pumpt, entfernt. Die Nährlösung wird in einem auf 10 °C klimatisierten Raum gelagert.

### 6.2. Kultivierung der Algen

Die Algenkulturen wurden in f/2-Medium kultiviert. Da sich die beiden Arten in ihren physiologischen Bedürfnissen unterscheiden, wurden sie unterschiedlich gehalten: *Alexandrium catenella* bei 15 °C und 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Lichtstrahlung in einem hell:dunkel-Verhältnis von 14:10 h/d, die wärmeliebende Art *Gymnodinium catenatum* in einem Temperaturschrank in 24 °C bei einer Lichtstrahlung von 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  und einem hell:dunkel-Zyklus von 12:12 h/d.

Bei der statischen Kultivierung durchlaufen die Algen vier Phasen: Die Anlaufphase beginnt beim Einbringen in das Nährmedium, wenn sich die Algen an die Umgebung anpassen und mit der Zellteilung beginnen. Darauf folgt die exponentielle Phase, in der die Kultur die maximale Teilungsrates erreicht und die Zellzahl exponentiell zunimmt. In der folgenden stationären Phase halten sich Wachstums- und Sterberate die Waage. Durch Nährstofflimitierung kommt es dann zur Absterbephase, in der die Algen

nach und nach absterben. Bei natürlichen Algenpopulationen sind auch mikrobiologische oder virale Infektionen, interspezifische Konkurrenz, Fraßfeinde oder Verdriftungen durch Meeresströmungen Gründe für den Abbruch einer Algenblüte. Das Wachstum kann sich aus verschiedenen Gründen zu jedem Zeitpunkt verlangsamen, beschleunigen oder komplett abbrechen. (G.M. Hallegraeff, 2003)

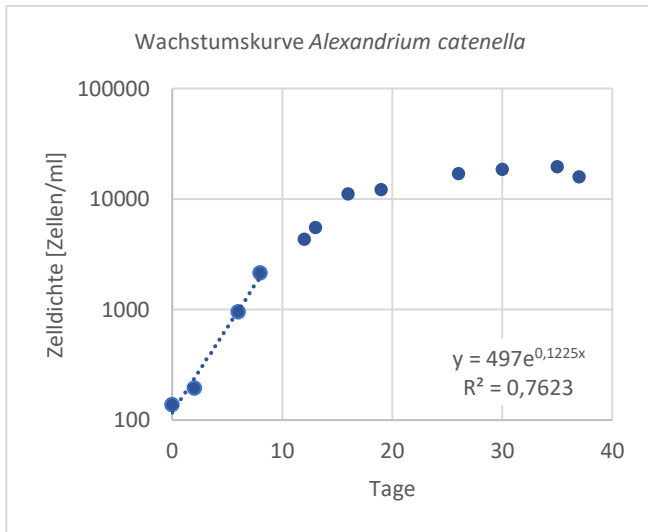


Abb. 7: Wachstumskurve von *Alexandrium catenella*

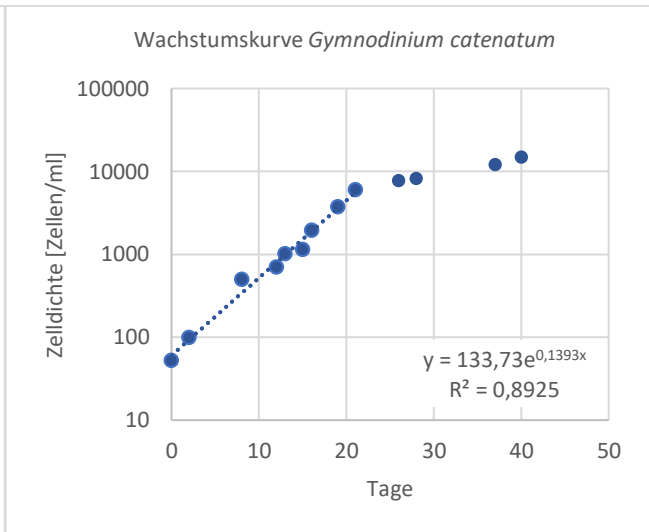


Abb. 8: Wachstumskurve von *Gymnodinium catenatum*

In Abb. 7 und 8 sind die Wachstumskurven der beiden Arten dargestellt. Diese können je nach vorliegenden Umweltbedingungen der Algen variieren. Oft spielt der pH-Wert eine große Rolle. Die Anfangszelldichte von *A. catenella* lag bei 137 Zellen/ml. Knapp 10 Tage lang befand sich die Kultur dann in der exponentiellen Phase, welche die Formel  $y = 497 e^{0,1225x}$  beschreibt. Danach verlangsamte sich das Wachstum und die Kultur ging in die stationäre Phase über, bis sie schließlich nach 37 Tagen abstarb. Die Wachstumskurve von *G. catenatum* ging von einer Anfangszelldichte von 53 Zellen/ml aus. Darauf folgte über 21 Tage exponentielles Wachstum, das durch die Formel  $y = 133,73 e^{0,1393x}$  ausgedrückt werden kann. Anschließend nahm die Wachstumsrate ab, bis die Algen schließlich nach 40 Tagen abstarben.

### 6.3. Ernte der Algenkulturen

Die Algen wurden kultiviert, bis eine ausreichende Zellzahl für die Ernte vorhanden war. Die Toxinkonzentrationen in den Proben sollten die Nachweisgrenze des Messgeräts, die bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei festgelegt ist, nicht unterschreiten. Um die Chromatogramme gut auswerten zu können, wird für die Quantifizierungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von zehn angenommen,

ausgehend von dem Toxin, das in der kleinsten Menge gebildet wird. Über die Zellquote (Toxinmasse pro Algenzelle) kann berechnet werden, wie viele Zellen für eine ausreichende Toxinkonzentration in den Proben nötig sind.

Die Zelldichte im Medium wurde unter dem Mikroskop bestimmt. Nachdem die Kultur durch Schwenken und Schütteln gut homogenisiert wurde, wurde ein kleines Volumen (z.B. 1 ml) in eine Sedimentationskammer pipettiert und zur Fixierung des Phytoplanktons ein Tropfen Lugol'sche Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung) hinzugegeben. Nach 10-15 min, sobald die Algen sedimentiert waren, wurden die Zellen in der Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Anschließend wurde berechnet, wie viele Zellen in einem Milliliter und wie viele Zellen in der ganzen Kultur vorhanden waren.

War eine ausreichende Zelldichte erreicht, wurde das entsprechende Volumen an Kultur geerntet: Je nach gewünschter Probenanzahl, wurde das Kulturvolumen in eine bestimmte Anzahl an 50 ml-Zentrifugationsröhrchen pipettiert und diese anschließend 15 min bei 3220 x g und 4 °C (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Kulturabfallgefäß abdekantiert. Die als Presslinge zurückbleibenden Zellen wurden mit 0,5 ml K-Medium mit dem Vortex-Gerät (Press-To-Mix, cenco-instrumenten b.v., Breda, Niederlande) suspendiert und in 2 ml Zentrifugationsröhrchen umpipettiert. Diese wurden dann 15 min bei 16100 x g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der Überstand in ein Kulturabfallgefäß pipettiert und zurück blieben die Zellpresslinge in den jeweiligen 2 ml Zentrifugationsröhrchen.

#### 6.4. Extraktion der Toxine

Für den Zellaufschluss und die Toxinextraktion wurden jeweils circa 9 g Lysing Matrix D Kügelchen und 300 µl Extraktionsmittel zu den zurückbleibenden Algen hinzugegeben. Die Proben kamen 45 Sekunden lang bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s in einen Homogenisator (Fast Prep FP120, Thermo Electron Corporation, MA 01757, US), durch welchen die Zellen durch die Stöße der Kügelchen aufgebrochen wurden. Die in den Algen enthaltenen Toxine gingen so mithilfe des Extraktionsmittels in Lösung. Die Zellfragmente wurden dann mit der Zentrifuge (15 min, 4 °C, 16100 x g, Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert. Die Toxinlösung konnte anschließend abpipettiert und durch einen Zentrifugationsfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert werden (30 s, 4 °C, 3220 x g, Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg), um auch die kleineren Zellbruchstücke herauszufiltern. Als letztes wurde die Lösung jeweils in ein Glasmessröhrchen pipettiert und entsprechend beschriftet.

## 6.5. Hydrophile Interaktionschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie

Um die Toxine zu analysieren, müssen diese erst analytisch getrennt und anschließend detektiert werden. Ersteres wurde mit Hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC) und letzteres mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) durchgeführt.

Die Chromatographie ist eine Methode in der Chemie, mit der verschiedene Analyten mithilfe zweier unterschiedlicher Phasen getrennt werden. Der entscheidende Prozess dabei ist die sich von Analyt zu Analyt unterscheidende Wechselwirkung mit der stationären Phase. Dies führt zu unterschiedlichen Erfassungszeiten (Retentionszeiten) im Chromatogramm. Hierin wird das Signal des Analyten (Ordinate) als Peak an der entsprechenden Retentionszeit (Abszisse) aufgetragen. (Gey, 2015)

Vor ca. 40 Jahren wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC: high performance liquid chromatography) entwickelt. Diese zeichnet sich aus durch miniaturisierte und optimierte Trennapparaturen und -materialien, welche eine Detektion und eine klare Trennung kleinster Toxinmengen im Nano- und Picogrammbereich innerhalb weniger Minuten zulassen. Diese Technik wurde noch weiter optimiert zur UHPLC (Ultra fast HPLC). Die eingesetzten Säulen mit Porengrößen um 2 µm und einer Länge im Zentimeterbereich und die kurze Analysendauer garantieren Effektivität und Wirtschaftlichkeit. (Gey, 2015)

Die HILIC wird aufgrund ihrer Phasen zur Säulenflüssigkeitschromatographie gezählt. Sie ist eine neue Trenntechnik innerhalb der HPLC, die besonders für polare Substanzen geeignet ist. Bei der stationären Phase handelt es sich um eine Säule mit polarem Packungsmaterial, bei der mobilen Phase um wässrige organische Lösungen. Die Besonderheit ist der Mindestwassergehalt von 2% im Eluenten, der eine dauerhafte Deckschicht aus Wasser auf der Säulenoberfläche als Abtrennung zur Organik in der mobilen Phase sichert (siehe Abb. 9). Bei der HILIC werden folglich polare Substanzen später am Detektor ankommen, da sie stärker mit der polaren Säule wechselwirken. Hydrophobere Analyten haben geringere Retentionszeiten. (Gey, 2015)

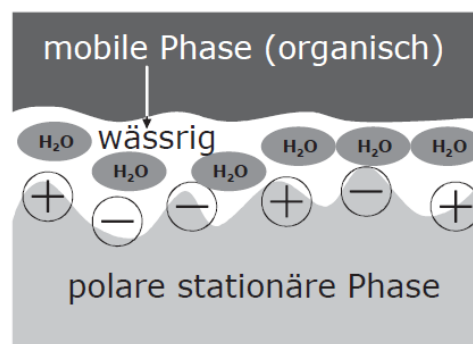


Abb. 9: Darstellung der Phasen bei der HILIC (Gey, 2015)

Die durch die Chromatographie getrennten Toxine werden zur Detektion in ein Massenspektrometer weitergeleitet. Dieses besteht aus einer Einheit für den Einlass der Analyten ins System und die Ionisierung der Moleküle, einem Massentrennsystem und einem Detektor am Ende, der die Signale verarbeitet und an eine Ausgabeeinheit (z.B. PC) weitergibt. (Cammann, 2000)



Die Einleitung der Moleküle von der UHPLC in das Massenspektrometer findet mit einem Elektrospray-Verbindungsstück (ESI) statt. Die Analytlösung wird durch eine Kapillare, an der eine Spannung angelegt ist, in das System geleitet. Am Ausgang der Kapillare bilden sich feine, stark geladene Eluatropfchen, die mit Unterstützung des Trägergases Stickstoff zerstäubt werden. Gleichzeitig wird dabei das Lösungsmittel verdampft, was dazu führt, dass sich die Ladungsdichte auf dem Tröpfchen erhöht. Dies wiederum fördert durch die Abstoßungskräfte gleichartiger Ladungen eine weitere Verkleinerung der Tröpfchen, sogenannte Coulomb-Explosionen. Im System herrscht Atmosphärendruck. Die Elektrospray-Ionisierung zählt zu den weichen Ionisierungsmethoden, denn die Moleküle werden dabei in der Regel nicht fragmentiert. Es entstehen dabei nur Molekülionen und Quasimolekülionen wie z.B.  $[M+H]^+$  und  $[M-H]^-$ . (Cammann, 2000)

Danach werden die Ionen durch Quadrupolmassenfilter nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt. (Cammann, 2000) „Quadrupolfilter sind aus vier konzentrischen parallel zueinander angeordneten Stabelektroden (...) aufgebaut, die gegenüberliegend paarweise an eine variable jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle (...) angeschlossen sind“ (Cammann, 2000). Durch Einstellen einer bestimmten Frequenz und Spannung können so die gewünschten Ionen auf der entsprechenden Wellenbahn in den Detektor geleitet werden. Hierbei findet eine Massenselektion statt, da nur eine einzige Ionenmasse auf eine Bahn gelenkt wird, die das Ziel erreicht (siehe Abb. 10: Ion mit blauer Flugbahn). (Gey, 2015)

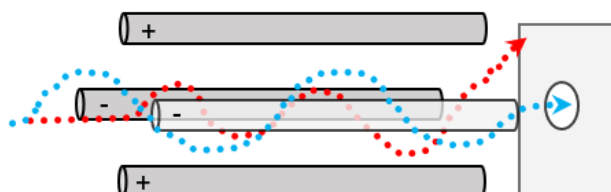


Abb. 10: Quadrupol-Massenfilter: Rotes Ion mit instabiler Flugbahn trifft nicht in den Detektor. Blaues Ion mit stabiler Flugbahn trifft in den Detektor. (Eigene Abb.)

Bei der Tandem-Massenspektrometrie sind zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet, wobei dazwischen noch eine Kollisionszelle eingebaut ist (siehe Abb. 11). Die durch das erste Massenspektrometer anhand ihres  $m/z$ -Verhältnisses selektierten Ionen werden in die Stoßkammer geleitet, in der sie durch die Kollision mit Gasmolekülen spezifisch in leichtere Ionen zerfallen. Ist das typische Fragmentierungsschema eines Moleküls bekannt, kann es auf diese Weise quantifiziert werden. Wird im zweiten Massenspektrometer nur ein einziges bestimmtes Produkt- bzw. Fragmention selektiert, handelt es sich um das Selected Reaction Monitoring (SRM). (Gey, 2015)

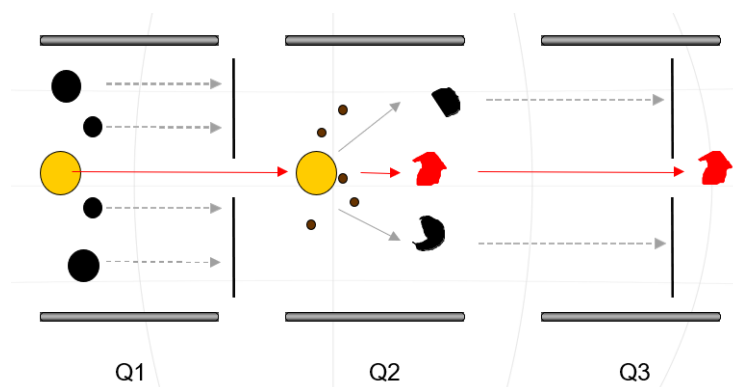


Abb. 11: Selected Reaction Monitoring (SRM). Triple Quadrupol MS/MS: Quadrupol Q1: Massenfilter für Mutterion, Quadrupol Q2: Kollisionszelle, Quadrupol Q3: Massenfilter für Produktion. (Abbildung von Bernd Krock)

Die letzte Komponente ist der Detektor, der die auftreffenden Ionen in einen elektrischen Strom umwandelt. Dieser variiert abhängig von der Intensität des Ionenstroms, ergo der Konzentration des spezifischen Toxins in der Probe und kann so in die entsprechende Peakform übersetzt werden. (Cammann, 2000)

## 6.6. Identifikation und Quantifizierung der Toxinkonzentrationen

Für die Auswertung der Ergebnisse aus der LC-MS/MS wurde die TargetLynx - Auswertesoftware im MassLynx V4.2 Programm genutzt. Die Software zeigt für jeden Massenübergang (Masse Mutterion > Masse Tochterion) die zugehörigen Chromatogramme an (siehe beispielhafte Auswertung in Abb. 12). Eines der beiden wird zur Quantifizierung genutzt, d.h. die Fläche unter dem Peak, der zum jeweiligen Toxin gehört, wird integriert. Um sicherzugehen, dass dieser Peak der entsprechende Toxinpeak ist, gibt es noch ein weiteres Chromatogramm zur Qualifizierung. In diesem wird ein anderer für dieses Toxin spezifischer Übergang angezeigt. Kommt in beiden Chromatogrammen der Peak zur gleichen Zeit, ist davon auszugehen, dass es sich um das gesuchte Toxin handelt. Eine weitere Absicherung der Identifikation ist der Vergleich der Retentionszeit des Peaks mit derjenigen im Standard, dessen Toxinzusammensetzung genau bekannt ist.

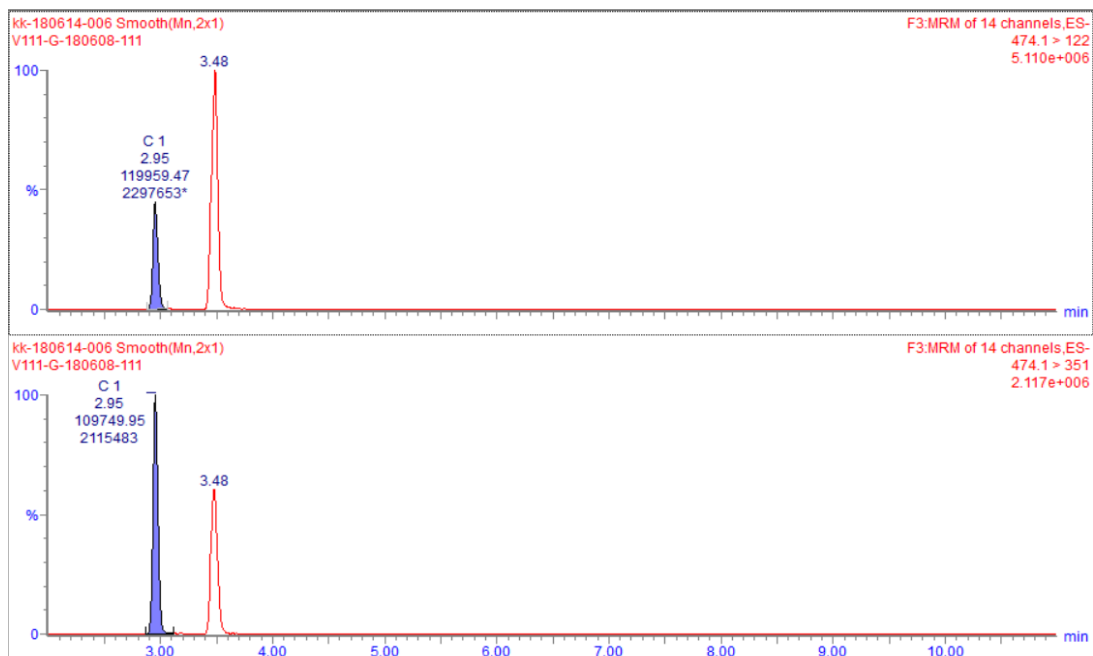


Abb. 12: Beispielhafte Auswertung des Toxins C1: Oberes Chromatogramm zur Quantifizierung (Übergang 474,1 > 122), unteres Chromatogramm zur Qualifizierung (Übergang 474,1 > 351). Die Retentionszeit von C1 liegt bei 2,95 min. Der Peak bei 3,48 min ist das entsprechende Betamer C2. Die integrierte Fläche beträgt 119959,47.

Bei jeder Messung wurden für die Toxine vier Standards mit bekannter Toxinkonzentration mit der folgenden Verdünnungsstufe mitgemessen: 1:20, 1:10, 1:5 und 1:1. Durch eine Regressionskurve aus den integrierten Flächen der Standards zu den Konzentrationen, konnte über die Regressionsgerade für jede Peakfläche der Proben die Konzentration des jeweiligen Toxins berechnet werden (siehe beispielhafte Regressionskurve in Abb. 13).

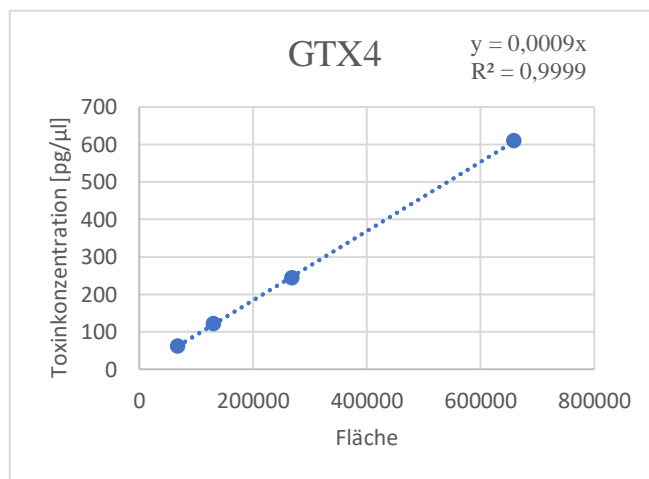


Abb. 13: Beispielhafte Regressionskurve von GTX4. Die Konzentrationsberechnung erfolgt mit angegebener Formel  $y=0,0009x$ . Das Bestimmtheitsmaß liegt bei 0,9999.

Für einige der Toxine waren keine Standards erhältlich. Folglich konnte der toxinspezifische Response-Faktor, also die analytspezifische Anzeigeempfindlichkeit des Detektors, in diesem Fall nicht berücksichtigt werden und die Konzentrationen wurden als Äquivalente eines als Standardlösung vorliegenden Toxins angegeben. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von dcNEO als NEO-Äquivalent, von dcGTX1 als GTX1-Äquivalent, von dcGTX4 als GTX4-Äquivalent, von B2 als B1-Äquivalent, von C3/4 und den GC-Toxinen als C1-Äquivalent berechnet.

## 6.7. Messgerät für die Toxinanalyse und Methoden

Für die Qualifizierung und Quantifizierung der Toxine wurde ein LC-MS/MS genutzt (siehe Abb. 14). Das Gerät (XEVO TQ-XS, Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA 01757 USA) besteht aus einem UPLC System und einem Tandem Quadrupol Massenspektrometer.

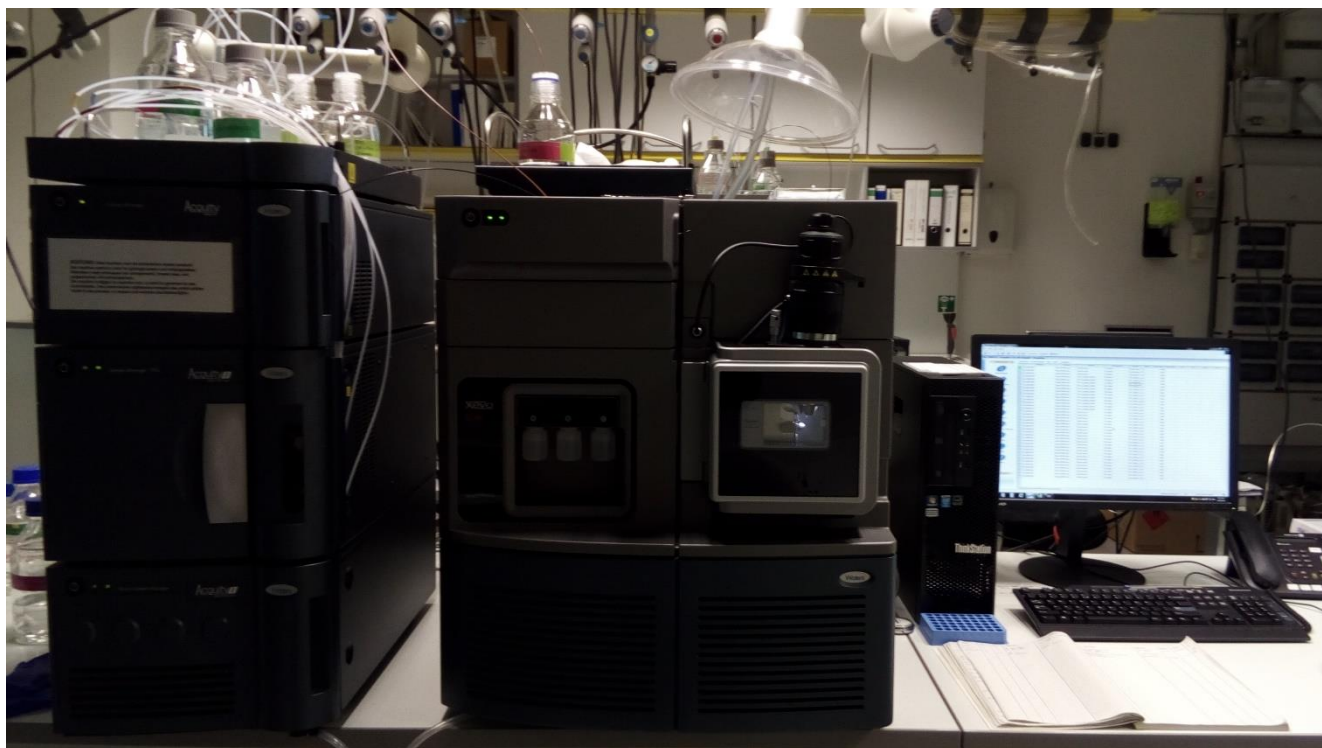


Abb. 14: Verwendetes LC-MS/MS für die Toxinanalyse: XEVO TQ-XS, Waters Corporation. Links: UPLC mit den Eluenten darauf, Mitte: Massenspektrometer, Rechts: Computer. (Foto: K. Krapf)

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit der HILIC-Methode durchgeführt. Acetonitril stellte die mobile Phase, bzw. das organische Lösungsmittel dar. Folgende zwei Eluenten wurden als Gemisch eingesetzt: Eluent A1 bestand aus 500 ml dH<sub>2</sub>O, 75 µl 100%iger Ameisensäure und 100 µl 25%iger Ammoniaklösung. Eluent B1 setzte sich aus 700 ml Acetonitril, 300 ml dH<sub>2</sub>O und 100 µl 98-100%iger Ameisensäure zusammen. Die Eluenten wurden mit dem in Tab. 19 (siehe Anhang) dargestellten Gradientenverlauf eingesetzt. Die stationäre Phase war eine polare Glycan Amid Säule (Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide Column) mit einem Durchmesser von 2,1 mm, einer Länge von 150 mm und einer Partikelgröße von 1,7 µm. Vor der Hauptsäule war eine kürzere Glycan Amid Vorsäule (Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide VanGuard Pre-Column) mit den Maßen 2,1 x 5 mm und einer Partikelgröße von 1,7 µm eingebaut. Die verwendete SRM-Methode am Massenspektrometer wurde im positiven und negativen Modus mit den in Tab. 20 (siehe Anhang) aufgelisteten Übergängen und Kollisionsenergien in der Stoßzelle durchgeführt. Weitere Einstellungen und Parameter sind in Tab. 21 im Anhang aufgelistet.

## 7. Ergebnisse

Um einen Überblick zu bekommen, welche Toxine und vor allem welche Epimertoxine von den beiden Stämmen gebildet werden, wurden zuerst Toxinprofile erstellt (siehe Abb. 15 und Tab. 6).

In Abb. 15 ist erkennbar, dass *Alexandrium catenella* hauptsächlich die beiden Epimerenpaare GTX1/4 und C1/2 herstellt. Beide machen jeweils über 40% der gesamten Toxinkonzentration aus. Die Epimerenpaare GTX2/3 und C3/4 werden von dieser Art nur in geringen Mengen gebildet. Nicht epimerisierende Toxine machen knapp 2% aus.

Der untersuchte Stamm von *Gymnodinium catenatum* bildet größtenteils (64,46%) PSP-Toxine, die nicht zur Epimerisierung fähig sind. Wie bei *Alexandrium catenella* macht das Epimerenpaar C1/2 mit circa 17% des Gesamttoxingehalts in der Zelle den größten Anteil der Epimere aus. Auch das andere Epimerenpaar der C-Toxine, C3/4, wird in größerer Menge mit 12,38% gebildet. GTX1-4 macht dagegen bei *Gymnodinium catenatum* nur weniger als 1% des Toxingehalts pro Zelle aus. Zusätzlich liegen bei dieser Art im Gegensatz zu *A. catenella* noch dcGTX1-4, GC1/2 und GC1a/2a vor.

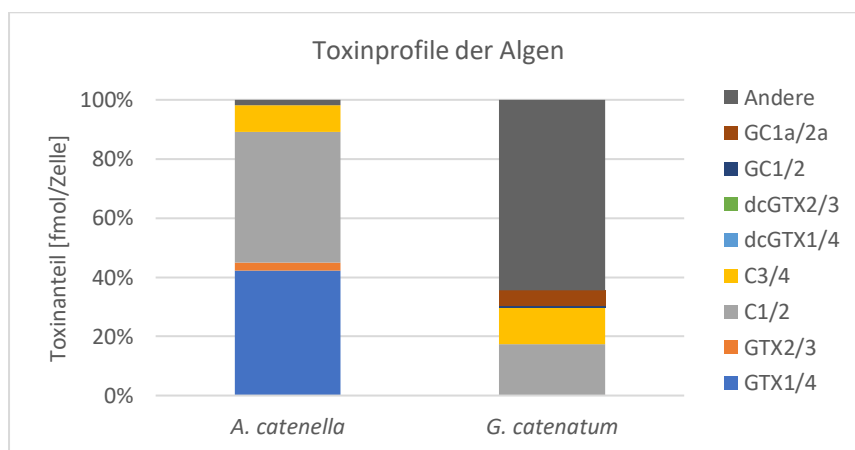


Abb. 15: Toxinprofil von *Alexandrium catenella* und *Gymnodinium catenatum*.

		GTX1/4	GTX2/3	C1/2	C3/4	dcGTX1/4	dcGTX2/3	GC1/2	GC1a/2a	Andere	Summe
<i>Alexandrium catenella</i>	Zellquote [fmol/Zelle]	8,31	0,52	8,68	1,76					0,38	19,65
	Anteil pro Zelle [%]	42,30	2,64	44,19	8,95					1,91	100
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Zellquote [fmol/Zelle]	0,14	0,12	35,16	25,28	0,06	0,26	0,97	10,61	131,64	204,23
	Anteil pro Zelle [%]	0,07	0,06	17,22	12,38	0,03	0,13	0,47	5,19	64,46	100

Tab. 6: Zellquoten von *Alexandrium catenella* und *Gymnodinium catenatum*.

Werden die beiden Toxinprofile absolut miteinander verglichen, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Zellquote. Schon die Gesamtmenge an Toxinen unterscheidet sich stark. *A. catenella* bildet nur knapp 20 fmol/Zelle im Gegensatz zu *G. catenatum*, welches mehr als das 10-fache produziert. Während *A. catenella* ungefähr 8,31 fmol GTX1/4 pro Zelle bildet, liegt die Menge von *G. catenatum* nicht einmal bei 0,14 fmol. GTX2/3 liegt in ähnlich geringen Gehalten vor (0,52 bei *A. catenella* bzw. 0,12 fmol/Zelle bei *G. catenatum*). Größere Unterschiede zeigen sich bei C1/2: Während eine Zelle von *A. catenella* 8,68 fmol bildet, sind es bei einer *G. catenatum* – Zelle mehr als viermal so viel (35,16 fmol/Zelle). Auch das Epimerenpaar C3/4 wird von *Gymnodinium catenatum* in größerer Menge produziert (25,28 fmol/Zelle) als von *A. catenella* (1,76 fmol/Zelle). Weitere Epimerenpaare kommen nur bei *G. catenatum* vor. Hier macht GC1a/2a mit 10,61 fmol/Zelle den größten Anteil aus. Die anderen Epimere dcGTX1-4 und GC1/2 kommen nur in geringerer Menge als 1 fmol/Zelle vor. Außerdem produziert *G. catenatum* eine große Menge anderer nicht epimerisierender PSP-Toxine (131,64 fmol/Zelle).

#### 7.1. Physikalisch-chemischer Versuch

Im Folgenden wird der Einfluss der Toxinextraktion auf die PSP-Epimere erläutert.

Es ist zu beobachten, dass die Epimerisierung der Toxine verstärkt bei höheren Temperaturen stattfindet (siehe Tab. 7 und 8). Die größten Veränderungen sind bei den Proben, die bei 35 °C im Ofen gelagert wurden, zu sehen. Auch bei einer Lagerung bei 22 °C sind diese Trends erkennbar, wenngleich auch nicht so stark ausgeprägt. Die Epimerverhältnisse der Proben mit -35 °C Lagertemperatur sind über die Zeit stabil. Es finden keine signifikanten Umwandlungen statt. Abbildung 16 zeigt die Stabilität der Epimerverhältnisse bei einer Temperatur von -35 °C. Die Proben, die im Kühlschrank untergebracht waren, scheinen auch noch relativ konstant zu sein, nur beim Extraktionsmittel Wasser kommt es in geringem Maße zu Veränderungen.

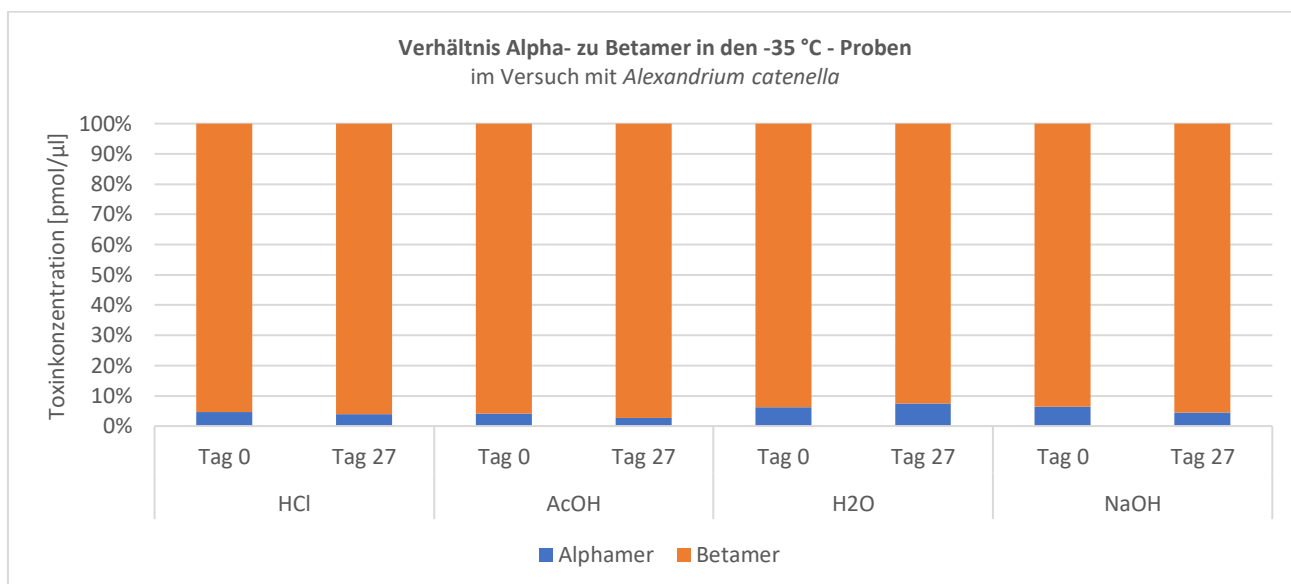


Abb. 16: Stabile Epimerverhältnisse in den Gefrierschrank-Proben von *Alexandrium catenella*.

Temperatur	Messtag	HCl		AcOH		H <sub>2</sub> O		NaOH	
		Alphamere	Betamere	Alphamere	Betamere	Alphamere	Betamere	Alphamere	Betamere
-35 °C	Tag 0	5%	95%	4%	96%	6%	94%	6%	94%
	Tag 27	4%	96%	3%	97%	7%	93%	4%	96%
8 °C	Tag 0	5%	95%	3%	97%	7%	93%	6%	94%
	Tag 27	3%	97%	3%	97%	21%	79%	5%	95%
22 °C	Tag 0	6%	94%	5%	95%	8%	92%	9%	91%
	Tag 27	3%	97%	9%	91%	54%	46%	24%	76%
35 °C	Tag 0	6%	94%	4%	96%	12%	88%	9%	91%
	Tag 27	6%	94%	29%	71%	61%	39%	44%	56%

Tab. 7: Epimerverhältnisse im Versuch mit *Alexandrium catenella*. (dunkelgrün: erkennbare Epimerisierung)

Temperatur	Messtag	HCl		AcOH		H <sub>2</sub> O		NaOH	
		Alphamere	Betamere	Alphamere	Betamere	Alphamere	Betamere	Alphamere	Betamere
-35 °C	Tag 0	34%	66%	32%	68%	29%	71%	27%	73%
	Tag 6	33%	67%	33%	67%	31%	69%	27%	73%
8 °C	Tag 0	29%	71%	33%	67%	30%	70%	26%	74%
	Tag 6	30%	70%	33%	67%	35%	65%	29%	71%
22 °C	Tag 0	34%	66%	30%	70%	31%	69%	28%	72%
	Tag 6	25%	75%	33%	67%	56%	44%	41%	59%
35 °C	Tag 0	34%	66%	30%	70%	28%	72%	31%	69%
	Tag 6	29%	71%	35%	65%	66%	34%	61%	39%

Tab. 8: Epimerverhältnisse im Versuch mit *Gymnodinium catenatum*. (dunkelgrün: erkennbare Epimerisierung)

Neben der Temperatur hat auch das Extraktionsmittel einen starken Einfluss auf die Umwandlungsprozesse. In den mit Salzsäure extrahierten Proben kommt es stark zur Desulfonierung (siehe Abb. 17, 18). Der Anteil der N-Sulfocarbamoyl-Toxine nimmt innerhalb der ersten Woche signifikant ab während der Anteil der Carbamoyl-Toxine stark zunimmt. Gleichzeitig verändern sich die Decarbamoyl-Toxine in den Proben von *Gymnodinium catenatum* nur unwesentlich. Das Epimerenpaar C1/2 nimmt stark ab während die Menge an GTX2/3 stark zunimmt. Die Desulfonierung findet nur bei den 22 und 35 °C – Proben im Extraktionsverfahren mit Salzsäure statt. Aufgrund der stark schwankenden Toxinesamtkonzentrationen zwischen den Messtagen, die auf Probleme mit der Messung zurückzuführen sind, wird das Diagramm für *A. catenella* prozentual dargestellt.

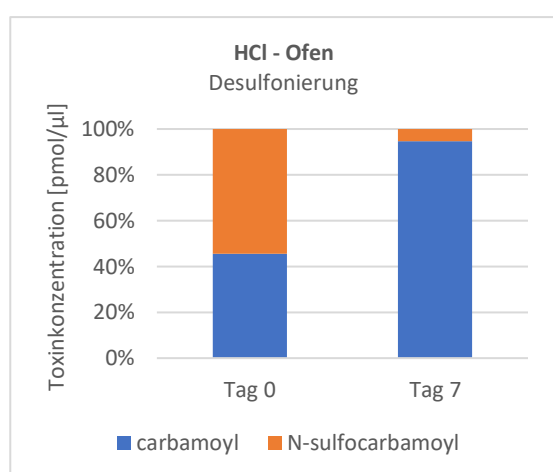


Abb. 17: Desulfonierung in den *Alexandrium catenella* – Proben im HCl-Ofen – Behandlungsverfahren.

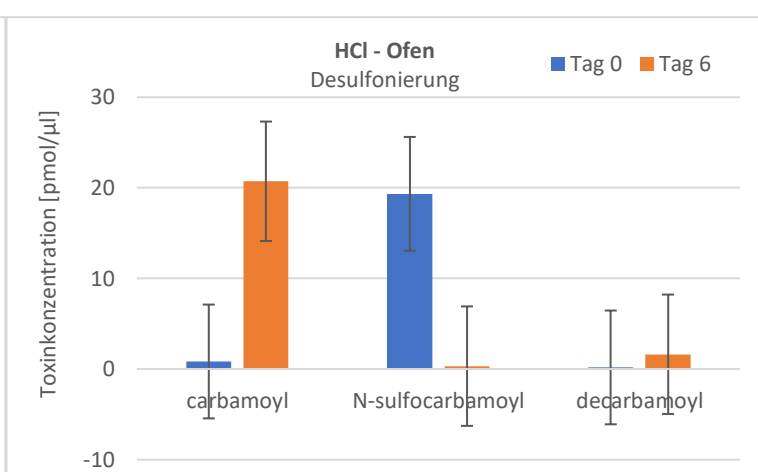


Abb. 18: Desulfonierung in den *Gymnodinium catenatum*-Proben im HCl-Ofen – Behandlungsverfahren.

Bei den anderen drei Lösungsmitteln kommt es zur Epimerisierung der Toxine, welche in Abbildung 19 und 20 dargestellt ist. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden für *Alexandrium catenella* Messtage in ähnlichen Zeitabständen zum Versuch mit *Gymnodinium catenatum* gewählt. Für erstere sind nur die Epimerverhältnisse der Carbamoyl- und N-Sulfocarbamoyl-Toxine dargestellt, für letztere zusätzlich die Decarbamoyl-Toxine. Da die Epimere der GC-Toxine analytisch in den Chromatogrammen nicht getrennt werden konnten, wurden diese nicht berücksichtigt. Wie in den Abbildungen ersichtlich, nimmt der generelle Anteil an Alphameren in den mit Essigsäure, Wasser und Natronlauge extrahierten Proben über die Zeit stark zu, während sich der der Betamere verringert. Vor allem bei *Alexandrium catenella* ist erkennbar, dass die Epimerisierung in Wasser sehr stark stattfindet. Auffällig ist, dass das Anfangsverhältnis von Alpha- zu Betamer direkt nach der Extraktion der Toxine in den Proben von *A. catenella* viel höher liegt (Alphamere <15%), als in denen von *G. catenatum* (Alphamere um die 30%).



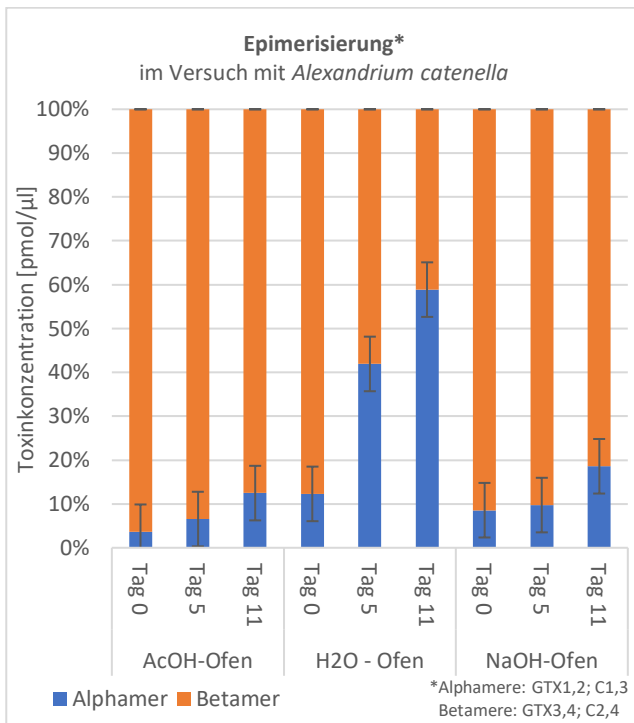


Abb. 19: Epimerisierung in den AcOH-/H<sub>2</sub>O-/NaOH – Ofen-  
Behandlungsverfahren der Proben von *Alexandrium catenella*.

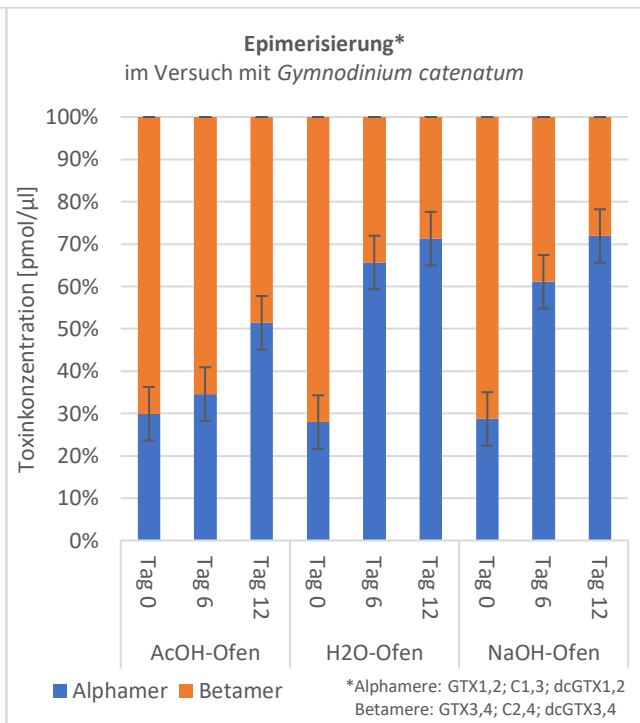


Abb. 20: Epimerisierung in den AcOH-/H<sub>2</sub>O-/NaOH – Ofen -  
Behandlungsverfahren der Proben von *Gymnodinium catenatum*.

Ein weiterer deutlich erkennbarer Umwandlungsprozess der PSP-Toxine ist die Decarbamoylierung, welche in Abbildung 21 dargestellt ist. Diese findet hauptsächlich in Wasser bei neutralem und in Natronlauge bei alkalischem pH-Wert statt. Hier erhöht sich vor allem die Menge an dcGTX2/3 beachtlich, was sich dadurch erklären lässt, dass vor allem die beiden Edukte C1 und C2 sowohl in *Alexandrium catenella* als auch in *Gymnodinium catenatum* sehr dominant sind. Diese Umwandlung findet schon innerhalb der ersten sechs Tage nach der Extraktion statt.

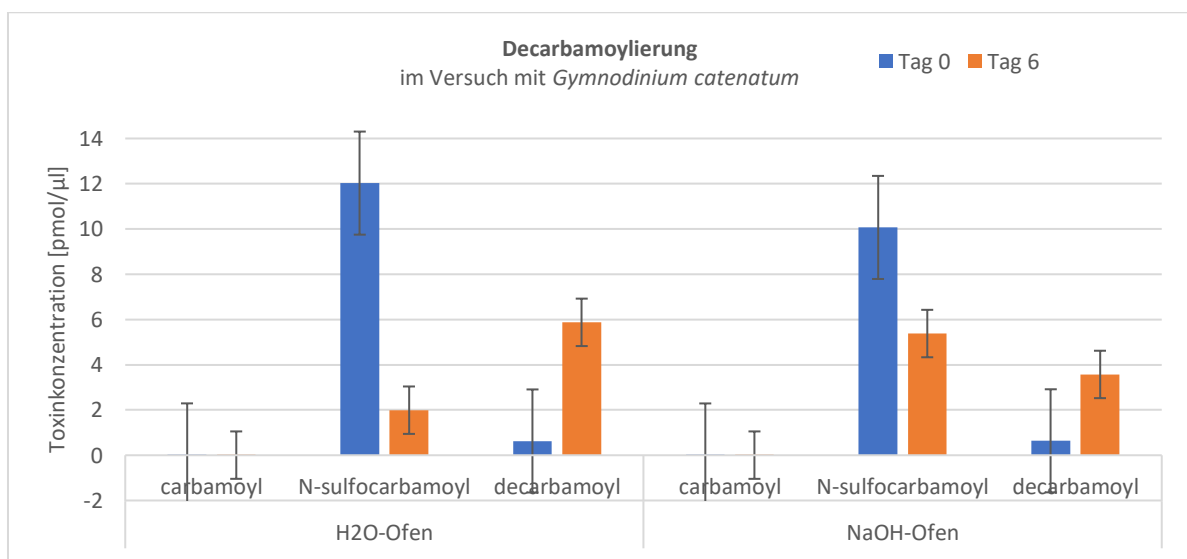


Abb. 21: Decarbamoylierung bei hohen pH-Werten der Extraktionsmittel.

In folgender Abbildung 22 ist erkennbar, dass die Gesamttoxinstoffmenge in den mit Wasser extrahierten *Gymnodinium catenatum* - Proben bei 35 °C stark abnimmt (Benzoyl-Toxine ausgenommen). Die Konzentration nimmt jeweils über sechs Tage um circa ein Drittel ab. Nach 12 Tagen ist dann nur noch gut ein Drittel der Ausgangskonzentration in der Probe. Gut zu sehen ist die Decarbamoylierung von C1/2 zu dcGTX2/3. Bei *Alexandrium catenella* wurden die Decarbamoyl-Toxine nicht mitgemessen, deshalb können weder die Toxinabnahme noch die Decarbamoylierung dargestellt werden.

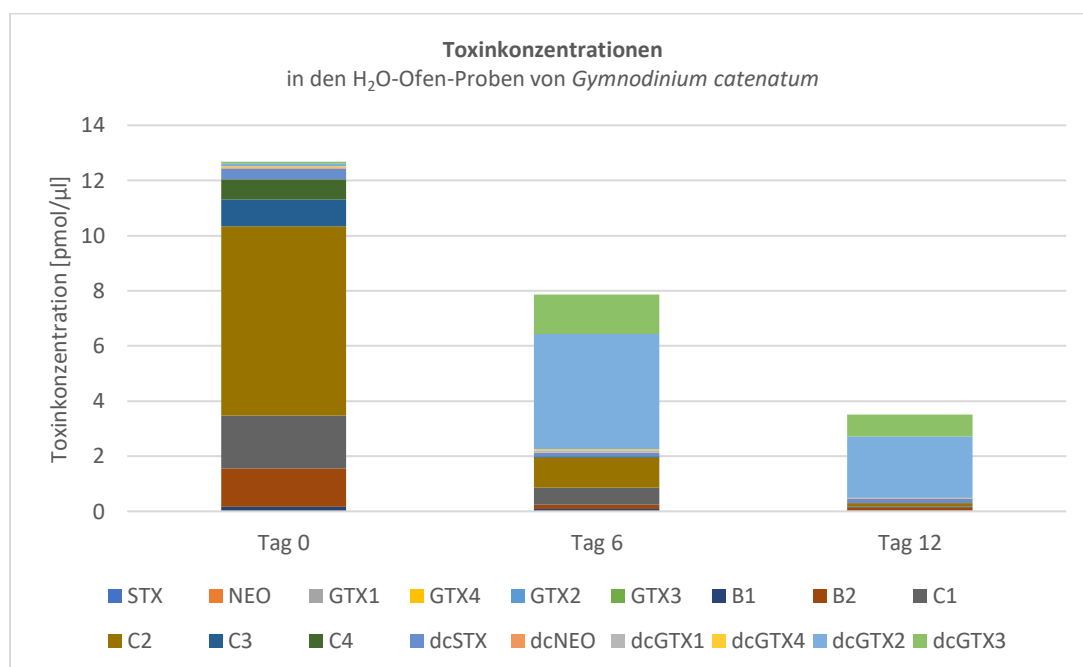


Abb. 22: Abnehmende Gesamttoxinkonzentration über die Zeit. Fortschreitende Decarbamoylierung.

Das Extraktionsmittel hat außerdem starken Einfluss auf das Lösungsverhalten der Toxine, welches mit den folgenden Tabellen 9-12 veranschaulicht wird. Im Versuch mit *Gymnodinium catenatum* verhalten sich die Toxine folgendermaßen: Die Gruppe der Carbamoyl-Toxine geht am stärksten in Salzsäure in Lösung. Die N-Sulfocarbamoyl-Toxine und die Benzoyl-Toxine lösen sich besser, je niedriger der pH ist. Die gelöste Toxinmenge ist bei HCl am höchsten und nimmt bis zum Extraktionsmittel Natronlauge ab. Die Decarbamoyl-Toxine wiederum haben ihre höchste Löslichkeit bei neutralem pH in Wasser und ihre schlechteste bei stark saurem pH in HCl. Die Toxine dcGTX3 und GC3 fallen etwas aus dem Schema. Im Versuch mit *Alexandrium catenella* kann die Theorie für einige der Toxine nicht bestätigt werden.

Ausgangskonzentration [pmol/μl]	STX	NEO	GTX1	GTX4	GTX2	GTX3
HCl	0,01	0,03	0,01	0,03	0,17	0,60
Essigsäure	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
Wasser	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
NaOH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 9: Ausgangskonzentrationen der Carbamoyl-Toxine aus *Gymnodinium catenatum* direkt nach der Extraktion.\*

Ausgangskonzentration [pmol/μl]	B1	B2	C1	C2	C3	C4
HCl	0,26	2,63	3,99	9,79	1,72	1,77
Essigsäure	0,24	2,23	3,39	9,44	1,61	1,37
Wasser	0,16	1,49	2,19	7,19	1,10	0,81
NaOH	0,12	1,08	1,47	5,41	0,77	0,58

Tab. 10: Ausgangskonzentrationen der N-Sulfocarbamoyl-Toxine aus *Gymnodinium catenatum* direkt nach der Extraktion.\*

Ausgangskonzentration [pmol/μl]	dcSTX	dcNEO	dcGTX1	dcGTX4	dcGTX2	dcGTX3
HCl	0,06	0,01	0,00	0,02	0,03	0,04
Essigsäure	0,27	0,04	0,01	0,05	0,03	0,04
Wasser	0,43	0,04	0,01	0,05	0,10	0,05
NaOH	0,36	0,04	0,01	0,06	0,04	0,03

Tab. 11: Ausgangskonzentrationen der Decarbamoyl-Toxine aus *Gymnodinium catenatum* direkt nach der Extraktion.\*

Ausgangskonzentration [pmol/μl]	GC1/2	GC3	GC6	GC1a/2a	GC3a	GC6a	GC6b
HCl	0,47	15,86	3,32	0,07	111,34	7,65	0,11
Essigsäure	0,46	19,27	3,28	0,07	63,24	4,79	0,09
Wasser	0,28	11,61	1,69	0,03	11,24	0,96	0,04
NaOH	0,17	6,91	0,76	0,02	5,50	0,45	0,02

Tab. 12: Ausgangskonzentrationen der Benzoyl-Toxine aus *Gymnodinium catenatum* direkt nach der Extraktion.\*

\*Farben: je dunkler, desto höher die Konzentration.

Weitere signifikante Umwandlungsprozesse waren nicht erkennbar. Sowohl die reduktive Abspaltung des C<sub>11</sub>-Sulfats (R<sub>2</sub>/R<sub>3</sub>-Sulfat-Substituent), als auch die Reduktion der N<sub>1</sub>-OH-Gruppe (R<sub>1</sub>-OH-Substituent) wurden nicht beobachtet.

## 7.2. Biologischer Versuch

Im biologischen Versuch ist zu erkennen, dass Toxingehalt und -profil von den jeweiligen Umweltbedingungen abhängig sind. Sowohl die Kultivierungstemperatur, als auch die Salinität haben Einfluss darauf.

Die verschiedenen Toxinprofile von *Alexandrium catenella* in Bezug auf die Umweltbedingungen der Algen sind in Abbildung 23 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass sich der Gesamttoxingehalt bei einer Temperatur von 24 °C im Gegensatz zur Referenztemperatur der üblichen Kultivierung stark erhöht. Bei 20 °C liegt dieser allerdings nur halb so hoch wie bei der Referenz. Bei einer Senkung der Salinität von 31 auf 20 psu kommt es zu keiner offensichtlichen Änderung im Toxinprofil von *A. catenella*. Bei dem dazwischen liegenden Salzgehalt von 25 psu beträgt die Toxinmenge jedoch weniger als die Hälfte der Referenz.

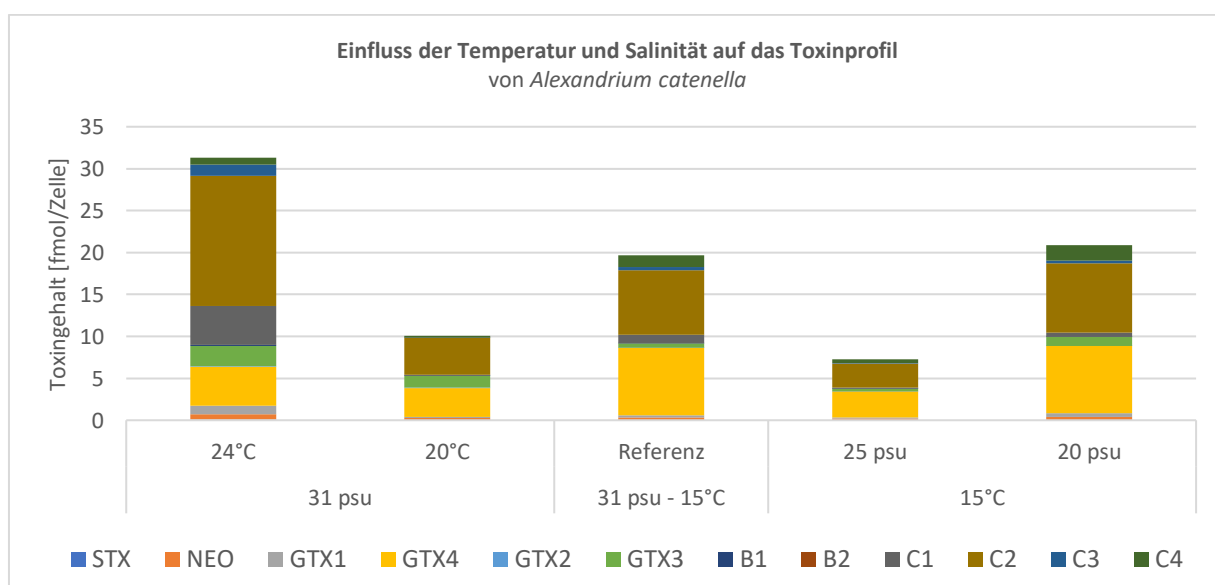


Abb. 23: Toxingehalt und -profil von *Alexandrium catenella* unter verschiedenen Umweltbedingungen.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse des Versuchs mit *Gymnodinium catenatum* zu sehen. Dadurch, dass die Kulturen bei einer Temperatur von 15 °C bzw. bei einer Salinität von 20 psu nicht gewachsen sind, gibt es zusätzlich zur Referenz zu beiden Parametern nur ein weiteres Toxinprofil. Der Temperaturunterschied zwischen 24 und 20 °C scheint keine Änderung der Toxinproduktion in den Algen hervorzurufen. Bei einem Salzgehalt von 25 statt 31 psu liegt die Gesamtmenge der PSP-Toxine allerdings bei knapp der Hälfte.

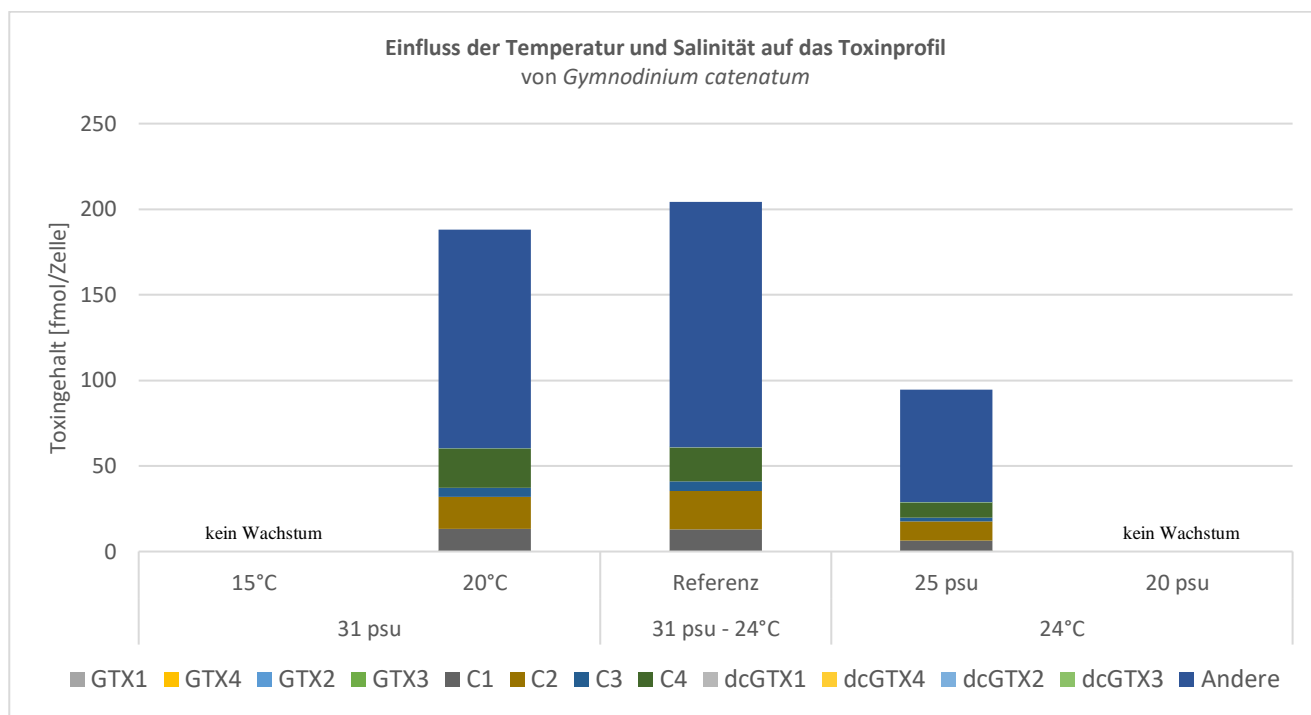


Abb. 24: Toxingehalt und -profil von *Gymnodinium catenatum* unter verschiedenen Umweltbedingungen.

Die Temperatur scheint Einfluss auf das Epimerverhältnis in *Alexandrium catenella* zu haben. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die Alge bei einer erhöhten Temperatur von 24 °C im Vergleich zur 15 °C-Temperatur einen erhöhten Anteil an Alphameren beinhaltet. Bei 20 °C sind keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Referenz festzustellen. Der Salinitätsbereich zwischen 20 und 31 psu scheint die Epimerisierung nicht zu beeinflussen.

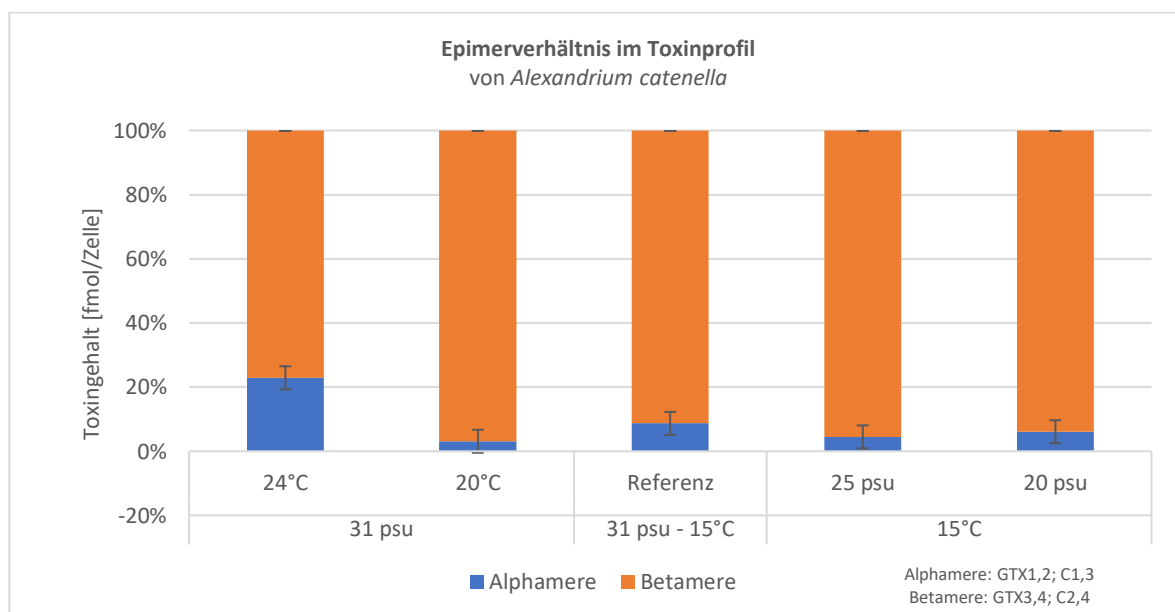


Abb. 25: Epimerverhältnisse der PSP-Toxine von *Alexandrium catenella* unter verschiedenen Umweltbedingungen.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, ändert sich das Epimerverhältnis in *Gymnodinium catenatum* weder bei einer geringeren Temperatur von 20 °C, noch bei einer geringeren Salinität von 25 psu. Der Alphameranteil liegt in allen drei Toxinprofilen bei circa 30%.

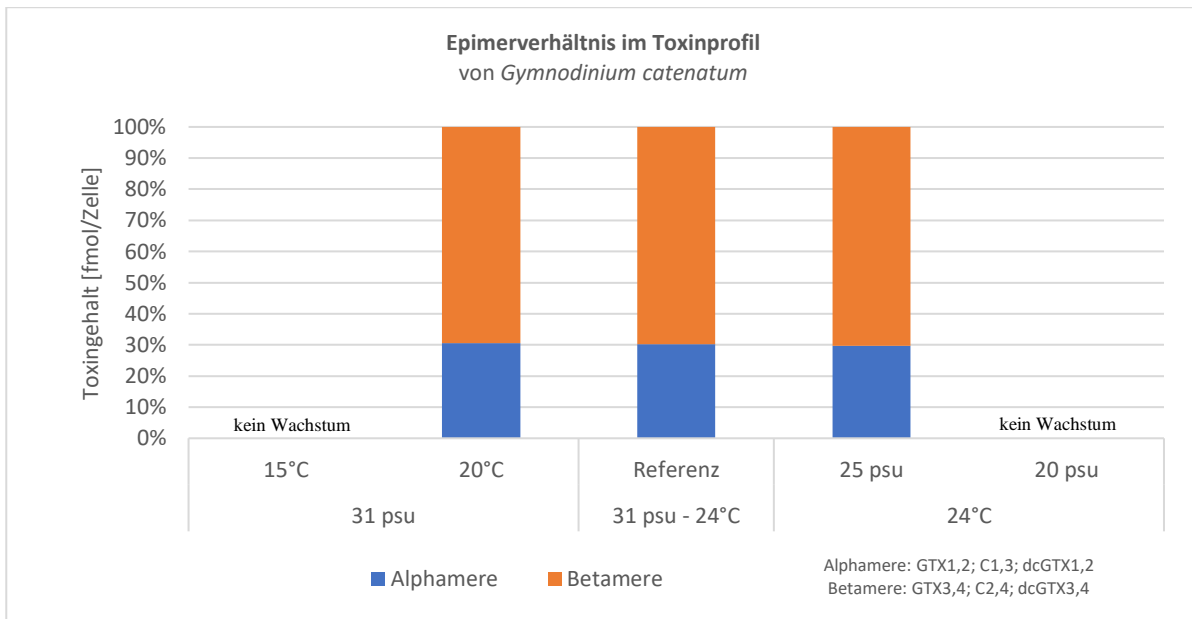


Abb. 26: Epimerverhältnisse der PSP-Toxine von *Gymnodinium catenatum* unter verschiedenen Umweltbedingungen.

## 8. Diskussion

Zunächst ist zu erwähnen, dass die Messergebnisse zwischen den Tagen starken Schwankungen unterlagen. Diese können an der Bedienung des Geräts liegen. Da die Säule sehr empfindlich ist, war es förderlich diese bzw. den pH-Wert vorher durch die Messung von Blindproben über einige Stunden vor der eigentlichen Messung einzustellen und direkt danach ohne Unterbrechung die Proben zu starten. Es kann sein, dass an den ersten Messtagen aufgrund von Unwissenheit nicht darauf geachtet wurde. An einem der Messtage kam es zu einer drastischen Retentionszeitverschiebung, sodass STX und NEO nicht mehr im Chromatogramm zu sehen waren. Scheinbar gab es hier ein Problem mit dem pH-Wert der Säule, da hauptsächlich dieser Einfluss auf die Detektionszeiten hat. Ursache könnten Ungenauigkeiten oder Fehler beim Ansetzen der Eluenten gewesen sein. Ein weiterer möglicher Grund, der die inkonstanten Messergebnisse erklären könnte, sind die zu langen Zeiten zwischen dem Auswechseln der Vorsäule, die als Schutzfunktion der Hauptsäule agiert, oder die zu seltene Reinigung der Quelle im Massenspektrometer. Beides sind Faktoren, die die Messergebnisse stark beeinflussen können, da Unreinheiten bei solchen geringen Konzentrationen eine große Wirkung haben. Verunreinigungen könnten auch durch zwischenzeitliche Messungen anderer Projekte entstanden sein. Das LC-MS/MS am AWI wird von verschiedenen Forschern gemeinsam genutzt, weshalb auch Proben mit anderen Toxingruppen und anderer Aufbereitung dazwischen gemessen wurden. Trotz der 1,5-stündigen Konditionierung vor jeder Messung könnten so eventuelle Unreinheiten in das System gelangt sein. Auffällig waren außerdem die Messtage, nachdem das Gerät abgestürzt ist. Danach waren die Peaks der Standards um einiges kleiner, als bei den vorherigen Messungen. Durch die externe Kalibration mithilfe von Regressionskurven und der Messung dreier Replikate für jedes Proben- bzw. Algenbehandlungsverfahren, wurde allerdings trotzdem eine gewisse Qualität der Messergebnisse sichergestellt.

Die Toxinprofile der beiden Stämme entsprechen weitestgehend Untersuchungen dieser Arten aus der Literatur. *Alexandrium catenella* produziert, wie auch in anderen Versuchen festgestellt (Krock, Gloria Seguel, & Cembella, 2007), eine relativ große Menge an C1/2 und GTX1/4, während STX und NEO kaum vorkommen. *Gymnodinium catenatum* bildet eine große Menge an N-Sulfocarbamoyl-Toxinen, v.a. C1-4, was mit den Angaben in der Literatur übereinstimmt (Oshima Y. , 1993). Zu den GC-Toxinen gibt es bis jetzt kaum Untersuchungen. In bisherigen Versuchen wurden hauptsächlich Carbamoyl-, N-Sulfocarbamoyl und Decarbamoyl-Toxine analysiert.

Das Verhalten der Benzoyl-Toxine ist aufgrund der für diese Toxine unausgereiften Messmethode und fehlender Standards schwer zu beurteilen. Zum einen ließen sich die Epimerenpaare in den Chromatogrammen nicht trennen, da sich die Peaks des entsprechenden Alpha- und Betamers überlagerten. Zum anderen wurde hier der toxinspezifische Response-Faktor nicht beachtet und die Konzentrationen wurden als C1-Äquivalent berechnet.

Aufgrund der Variationen zwischen verschiedenen Stämmen gleicher Art wird zwar in einigen Artikeln beschrieben, dass *G. catenatum* eine Temperaturtoleranz von 11,5-29 °C aufweist, diverse andere Quellen geben jedoch zum Beispiel einen Temperaturbereich von 16-33 °C an. (Band-Schmidt C. J., 2014) Der untersuchte Stamm dieser Art verhält sich wohl eher nach zweitem Schema, da die Kultur in 15 °C nicht überleben konnte. Laut Band-Schmidt (2006) liegt die Toleranz gegenüber dem Salzgehalt im Kulturmedium bei dieser Art zwischen 25 und 40 psu mit einer optimalen Wachstumsrate zwischen 28 und 38 psu. Tatsächlich hat auch dieser Stamm die Kultivierung in 25 psu noch gut ertragen, ist aber in 20 psu nach einer Woche abgestorben. Der Stamm von *Alexandrium catenella* hingegen hat alle Versuche gut überstanden. Daraus lässt sich schließen, dass diese Art einen weiteren Toleranzbereich aufweist, als *Gymnodinium catenatum*.

Die Toxinanalysen zeigen, dass Wärme chemische Umwandlungen begünstigt und somit zur Epimerisierung beiträgt. Außerdem lässt sich folgern, dass der Vorgang der Epimerisierung stark vom Extraktionsmittel bzw. dem pH-Wert abhängt. Die These aus der Literatur, dass hohe pH-Werte und Temperaturen zur Destabilisierung der PSP-Moleküle führen (siehe Kapitel 4.5.), kann also bestätigt werden. Trotz der Tatsache, dass die Gesamtkonzentration der H<sup>+</sup> und OH<sup>-</sup> -Ionen in Salzsäure am höchsten ist, findet die Epimerisierung bei neutralem pH in Wasser am stärksten statt. Da die Keto-Enol-Tautomerie eben genannte Ionen zum Ablauf benötigt, war die Vermutung, dass die Epimerisierung in Salzsäure verstärkt abläuft. Folglich ist die Menge an H<sup>+</sup>- und OH<sup>-</sup>-Ionen für den Grad der Epimerisierung nicht von Bedeutung, es sei denn, es spielen noch weitere Faktoren eine Rolle, die diesen Effekt überlagern. Im Gegensatz zur Epimerisierung ist offenbar für den Prozess der Desulfonierung eine hohe Konzentration an H<sup>+</sup> - Ionen erforderlich, da dieser nur in stark saurem Milieu, allerdings auch nur in höheren Temperaturen, abläuft. Hier scheint der Prozess sehr dominant zu sein. Die Decarbamoylierung hingegen scheint nur in höheren pH-Werten zu erfolgen. Dies konnte durch den physikalisch-chemischen Versuch mit *A. catenella* nicht überprüft werden, da die Decarbamoyl-Toxine nicht mitgemessen wurden. Weitere PSP-Umwandlungsvorgänge konnten zwar nicht beobachtet werden, sind aber nicht ausgeschlossen, da sie möglicherweise in so geringem Maße auftraten, dass sie durch die vorherrschenden Prozesse überlagert wurden. Die sinkenden Gesamtkonzentrationen der H<sub>2</sub>O-Proben im Ofen deuten auf einen Toxinabbau hin.

Der Toxinanteil pro Zelle für die Toxinprofile wurde für die Proben, die mit Essigsäure extrahiert wurden berechnet. Dies scheint eine große Rolle zu spielen, da die gelöste Toxinmenge im physikalisch-chemischen Versuch bei *Gymnodinium catenatum* stark vom Extraktionsmittel abhängt. Vermutlich haben die PSP-Toxine durch den unterschiedlichen Substituenten R<sub>4</sub> nicht das gleiche Lösungsverhalten und lösen sich abhängig von diesem in bestimmten pH-Werten besser als in anderen. Dies konnte allerdings in demselben Versuch mit *A. catenella* nur für wenige Toxine bestätigt werden. Womöglich liegt es an Messfehlern des LC-MS/MS.



Die Erhöhung der Gesamtoxinmenge in *Alexandrium catenella* bei 24 °C kann an dem stark verlangsamten Wachstum bei höherer Temperatur liegen. Da weniger Nährstoffe und Energie für die Zellteilung aufgewendet werden müssen, können diese für die Toxinproduktion genutzt werden. Allerdings erklärt diese Theorie nicht die im Vergleich zur Referenz halbierte Toxinkonzentration bei 20 °C. Hier könnte es ein Problem mit der Messung gegeben haben. Der gleiche Verdacht liegt bei der Salinität von 25 psu vor, indem die Gesamtoxinkonzentration ebenfalls nur halb so groß ist, wie die der Referenz. Unter der Annahme, dass das Toxinprofil bei 20 psu korrekt ist, dürfte es bei einer Verringerung der Salinität von 31 auf 20 psu keine Änderungen in der Toxinproduktion der Alge geben. Möglicherweise hatten trotz des Einstellens gleicher Lichtverhältnisse und der Benutzung des gleichen Mediums auch noch andere Umweltfaktoren Einfluss. In der Literatur wird vermutet, dass der Zellgehalt an Toxin bei *Alexandrium catenella* durch unterschiedliche Temperaturen, Salinitäten und Lichtbedingungen stark schwanken kann, dass jedoch die relative Zusammensetzung der Toxine fast konstant bleibt, solange es nicht zu extremen Wachstumsbedingungen kommt (Laabir, 2013).

Die Gesamtoxinmenge von *Gymnodinium catenatum* unterscheidet sich nicht signifikant zwischen 20 und 24 °C. Möglicherweise liegen diese beiden Werte im optimalen Temperaturbereich der Alge. Bei einem um 5 psu geringeren Salzgehalt halbiert sich die Menge an Toxin. Offensichtlich wirkt sich der Salinitäts-Stress auf die Toxinproduktion der Alge aus.

Bei einer Erhöhung der Kultivierungstemperatur von *Alexandrium catenella* von 15 auf 24 °C liegt der Anteil an Alphameren höher als in der Referenz. Dies lässt vermuten, dass es auch in der Alge zur Epimerisierung kommt, da auch im physikalisch-chemischen Experiment festgestellt wurde, dass bei dieser Temperatur der Prozess der Epimerisierung stattfindet, solange das Milieu nicht stark sauer ist. Dass bei der Kultivierungstemperatur von 20 °C keine Unterschiede zu sehen sind, könnte daran liegen, dass die Temperatur nicht ausreichend hoch war oder andere unbekannte Faktoren eine Rolle spielen bzw. tatsächlich ein Messproblem vorlag. Die Salinität hat in den eingestellten Umgebungsbedingungen der Algen bei beiden Arten keine Änderung im Epimerverhältnis hervorgerufen. Dies wurde auch in anderen Untersuchungen von *G. catenatum* festgestellt. Laut Band-Schmidt (2014) konnten keine Unterschiede im Toxinprofil, abhängig von der Salinität festgestellt werden. Bei einer leicht niedrigeren Kultivierungstemperatur von *Gymnodinium catenatum* lag das Alpha- zu Betamerverhältnis, wie vorher bestimmt, bei circa 30:70. Literaturrecherchen ergaben, dass das Toxinprofil und die Zelltoxizität stabiler sind als für einige *Alexandrium*-Arten und dass das Toxinprofil dieser Art generell sehr langsam auf sich verändernde Umweltbedingungen reagiert (Band-Schmidt C. J., 2014). Temperaturbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Toxine sollen zwar den größten Anteil haben (Band-Schmidt C. J., 2014), allerdings ist der eingestellte Temperaturunterschied bei *Gymnodinium catenatum* eher gering.

Um auf die zentrale Fragestellung dieser Arbeit zurück zu kommen: Die Vermutung liegt in der Tat nahe, dass die Algen selbst nur die Betamere bilden, da die Epimerverhältnisse, wie in der Literatur beschrieben (siehe Kapitel 5.), direkt nach der Extraktion sehr hoch sind, vor allem bei *Alexandrium catenella*. Da die Epimerisierung auch in der Alge stattzufinden scheint, kann der höhere Alphamer-Anteil in den *G. catenatum* – Proben auf die höhere Kultivierungstemperatur zurückzuführen sein. Beide Vermutungen der Fragestellung von Bernd Krock (Krock, Gloria Seguel, & Cembella, 2007) können so bestätigt werden: Einerseits die schon in der Alge stattfindende Epimerisierung, andererseits die Epimerisierung in der Probe, wobei hier anzumerken ist, dass diese unter bestimmten Bedingungen unterbunden werden kann. Die Nullhypothese dieser Arbeit, dass sowohl die Betamere als auch die Alphamere von den Algen gebildet werden und die Alphamere nicht durch Umwandlung aus dem Betamer entstehen, kann zwar nicht mit 100%iger Sicherheit widerlegt werden, allerdings angesichts der überall möglicherweise stattfindenden Epimerisierung stark angezweifelt werden.

## 9. Fazit

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, unter welchen Bedingungen die Epimerisierung der PSP-Toxine stattfindet. Dies spielt eine große Rolle, wenn exakte Toxinprofile erstellt werden sollen, denn dann kann zumindest in der Probenaufbereitung und -lagerung eine Epimerisierung gezielt vermieden werden. Falls dies nicht möglich ist, oder die Unterscheidung von Alpha- und Betamer keine Rolle spielt, kann das Epimerenpaar auch als Summe angegeben werden. Für die Praxis in der Toxinanalytik sind die Ergebnisse zu den neben der Epimerisierung stattfindenden Umwandlungsprozessen von großer Relevanz, da diese das Toxinprofil und die -analyse stark verfälschen würden.

Um die Thesen dieser Arbeit zu stützen und die Richtigkeit abzusichern, wäre es auf jeden Fall sinnvoll, die Zeitreihen zu wiederholen. Des Weiteren sollte der Ursache der Schwankung der Messwerte auf den Grund gegangen werden. Der biologische Versuch könnte zudem mit einer größeren Anzahl an Behandlungsverfahren durchgeführt werden, um mögliche Trends besser zu erkennen, oder die Schlussfolgerung durch eine höhere Anzahl an Toxinprofilen im jeweiligen Parameter zu stützen. Zudem sollte das Schema zur Löslichkeit der unterschiedlichen PSP-Toxingruppen nachgeprüft werden, da es Unstimmigkeiten zum *Alexandrium* – Versuch gab.

Außerdem ist es für zukünftige Messungen und Projekte einerseits essentiell das Gerät regelmäßig den notwendigen Reinigungsverfahren zu unterziehen und stark genutztes Material rechtzeitig zu wechseln und andererseits eine ausreichende Geräte-Kenntnis zu besitzen. Damit wird die Qualität der Messergebnisse gesichert.

Abschließend ist zu sagen, dass PST-Proben mit saurem Extraktionsmittel extrahiert werden sollten und zumindest im Kühlschrank-Temperaturbereich, besser noch im Gefrierschrank gelagert werden sollten, um die Toxinverhältnisse stabil zu halten.

## 10. Zusammenfassung

Algenblüten sind natürliche Phänomene, die weltweit aufgrund ihrer gesundheitlichen und wirtschaftlichen Auswirkungen eine große Rolle spielen. Von den rund 5000 marinen Phytoplanktonarten produzieren circa 80 Arten Toxine, welche nach ihrer Wirkung auf die Gesundheit in verschiedene Toxinklassen eingeteilt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Paralytic Shellfish Toxine (PST) werden von Arten der Gattung *Alexandrium*, von *Gymnodinium catenatum* und *Pyrodinium bahamense* gebildet. Untersucht wurde ein Stamm von *Alexandrium catenella* aus Argentinien und ein Stamm von *Gymnodinium catenatum* aus Mexiko.

PSP-Toxine blockieren spannungsabhängige Kanäle der Nervenzellen und verursachen unter anderem Muskellähmungen, was in besser entwickelten Ländern aber keine Todesursache mehr darstellt, da relativ wenig wilde Schalentiere verzehrt werden und gleichzeitig Lebensmittelkontrollen sehr effektiv sind. Die chemische Struktur aller Toxine lässt sich von der Grundstruktur des Saxitoxins ableiten und unterscheidet sich jeweils durch vier verschiedene Substituenten. Durch die Keto-Enol-Tautomerie kommt es durch die spiegelbildliche Anordnung einer Sulfatgruppe zu einem Epimerenpaar. Der Prozess der Epimerisierung, der in dieser Arbeit untersucht wurde, beschreibt die Umwandlung des Betamers in das entsprechende Alphamer.

Für die Versuche wurden die beiden Stämme kultiviert und bei ausreichender Zellmasse geerntet. Anschließend wurden die Toxine extrahiert und mit Hydrophiler Interaktionschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie gemessen. Die Chromatographie ist ein analytisches Trennverfahren in der Chemie, das mit dem Prinzip zweier unterschiedlicher Phasen und den unterschiedlichen Wechselwirkungs-Eigenschaften der Analyten funktioniert. Das Massenspektrometer selektiert dann die für das gesuchte Toxin charakteristischen Molekülfragmente, die anschließend detektiert werden und von einem Rechner in Chromatogramme umgewandelt werden. Durch Integration der Peaks und einer externen Kalibration über die Regression von parallel mitgemessenen Standards, wurde die Toxinkonzentration in der Probe berechnet.

Für die Untersuchung der Epimerisierung in den Algen und den Proben wurden physikalisch-chemische und biologische Versuche durchgeführt. In ersteren wurden die Einflussfaktoren Extraktionsmittel bzw. pH-Wert und Temperatur in der Probe in einer Zeitreihe untersucht. In letzteren die auf die Algen wirkenden Umweltfaktoren Salinität und Temperatur.

Es wurde festgestellt, dass die Epimerisierung sowohl in der Alge, als auch in der Probe stattfindet. In den Proben und in den Algen findet sie nur bei höheren Temperaturen und nicht stark sauren pH-Werten statt. Gleichzeitig laufen auch noch andere Umwandlungsprozesse ab: In hohem pH-Wert bei Wärme kommt es zur Decarbamylierung, im stark sauren Milieu bei Wärme zur Desulfonierung. Die Nullhypothese, dass die Alge sowohl Alpha- als auch Betamer bildet, kann durch das hohe Epimerverhältnis direkt nach der Extraktion stark angezweifelt werden, da der Verdacht besteht, dass der geringe Alphameranteil durch die Epimerisierung in der Alge und während der Extraktion entsteht.

## 11. Ausblick

Eine intensive Forschung an Phytoplanktontoxinen ist auch in der Zukunft von großer Bedeutung. Aufgrund der negativen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Auswirkungen auf den Menschen ist es wichtig, ein Verständnis dafür zu bekommen, wie und welche Faktoren auf Algenblüten, Toxinbildung und Toxizität Auswirkungen haben. Angesichts der Tatsache, dass Algenblüten in ihrer Intensität und Häufigkeit zunehmen und die Ursache hierfür teilweise auf den Menschen zurückzuführen ist, kann dies bei genaueren Kenntnissen verhindert werden. Des Weiteren finden schon jetzt Veränderungen mariner ökologischer Parameter statt, die durch den Klimawandel bedingt sind: Sich wandelnde Wassertemperaturen, Meeresströmungen und Salzgehalte, sowie die Ozeanversauerung beeinflussen das Plankton. Daher ist es wichtig, den Einfluss all dieser Faktoren zu erforschen.

Die Paralytic Shellfish Toxine stellen durch ihre hohe Toxizität und ihr häufiges Auftreten eine bedeutende Toxinklasse dar, die es noch genauer zu untersuchen gilt. Die mangelnden Kenntnisse über die Benzoyl-Toxine sollten in Zukunft behoben werden. Auch für die Epimerisierung muss ein größeres Verständnis erlangt werden, um mögliche (bio-)chemische Interaktionen besser zu verstehen und vorauszusagen.

Abschließend ist zu sagen, dass das Thema Algentoxine in Zukunft weiterhin ein spannendes Thema bleiben wird und einen großen Bereich der Forschung darstellen wird.

## Literaturverzeichnis

- Band-Schmidt, C. (2006). Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the gulf of California, Mexico. Phycological Society of America.
- Band-Schmidt, C. (August 2014). Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Pacific coast of Mexico. Elsevier.
- Cammann, K. (2000). Instrumentelle Analytische Chemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Cembella, A. (1998). Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag .
- Cembella, A. (1998). Ecophysiology and Metabolism of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Microalgae. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Durán-Riveroll, L., Krock, B., & Cembella, A. (2017). Characterization of Benzoyl Saxitoxin Analogs from the Toxicogenic Marine Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by Hydrophilic Interaction Liquid Ion-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Natural Products Chemistry & Research, S. 14.
- G.M. Hallegraeff, D. A. (2003). Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris: UNESCO.
- Gary J. Jones, A. P. (1997). Persistence and Degradation of cyanobacterial Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) in Freshwaters. Elsevier Science, Ltd.
- Gey, M. H. (2015). Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hellwich, K.-H. (2007). Stereochemie Grundbegriffe. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Krock, B., Gloria Seguel, C., & Cembella, A. (2007). Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Elsevier B.V.
- Laabir, M. (2013). Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) Isolated from the Mediterranean Sea. Marine Drugs.
- Luckas, B. (2005). Overview of Key Phytoplankton Toxins and Their Recent Occurrence in the North and Baltic Seas. Wiley Periodicals, Inc.
- NCMA. National Center for Marine Algae and Microbiota, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences: [https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_K\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_K_1.pdf) [09.04.2018]
- Oshima, Y. (1993). Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. Marine Biology, S. 471-476.
- Oshima, Y. (1993). Toxin Production by the Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In Y. S. Theodore J. Smayda, Toxic Phytoplankton in the Sea (S. 907-912). Amsterdam: ELSEVIER.
- Patrick, G. (2004). Organic Chemistry. New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Pedro R. Costa, A. R. (13. April 2015). Toxin Profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Portuguese Coast, as Determined by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Marine Drugs.

## Anhang

Stoffkomponente	Stammlösung	Menge	Molkonzentration im Endmedium
NaNO <sub>3</sub>	75,00 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	8,82 x 10 <sup>-4</sup> M
NH <sub>4</sub> Cl	2,67 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	5,00 x 10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1 ml	1,00 x 10 <sup>-5</sup> M
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	12,9 mg/l dH <sub>2</sub> O	0,1 ml	1,00 x 10 <sup>-8</sup> M
TRIS-Puffer (pH 7,2)	121,10 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	1,00 x 10 <sup>-3</sup> M
Spurenmetaillösung	siehe Tab. 14	1 ml	
Vitaminlösung	siehe Tab. 15	0,5 ml	

Tab. 13: Stoffkomponenten in einem Liter Nährmedium. (NCMA, Rezept verändert von Krapf)

Stoffkomponente	Stammlösung	Menge	Molkonzentration im Endmedium
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O		41,60 g	1,11 x 10 <sup>-4</sup> M
FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O		3,150 g	1,17 x 10 <sup>-5</sup> M
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O		0,178 g	9,00 x 10 <sup>-7</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	23,00 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	8,00 x 10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	10,00 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	5,00 x 10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	6,3 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	2,60 x 10 <sup>-8</sup> M
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	2,50 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	1,00 x 10 <sup>-8</sup> M

Tab. 14: Stoffkomponenten in einem Liter Metalllösung. (NCMA)

Stoffkomponente	Stammlösung	Menge	Molkonzentration im Endmedium
Thiamin * HCl (Vit. B1)		200 mg	2,96 x 10 <sup>-7</sup> M
Biotin (Vit. H)	0,1 g/l dH <sub>2</sub> O	10 ml	2,05 x 10 <sup>-9</sup> M
Cyanocobalamin (Vit. B <sub>12</sub> )	1,0 g/l dH <sub>2</sub> O	1 ml	3,69 x 10 <sup>-10</sup> M

Tab. 15: Stoffkomponenten in einem Liter Vitaminlösung. (NCMA)

<b>Tag</b>	0	2	6	8	12	13	16	19	26	30	35	37
<b>Zelldichte [Zellen/ml]</b>	137	194	952	2123	4285	5491	11070	12024	16845	18490	19568	15738

Tab. 16: Basisdaten der Wachstumskurve von *Alexandrium catenella*

<b>Tag</b>	0	2	8	12	13	15	16	19	21	26	28	37	40
<b>Zelldichte [Zellen/ml]</b>	52	98	492	694	1012	1131	1934	3720	5952	7719	8138	12028	14840

Tab. 17: Basisdaten der Wachstumskurve von *Gymnodinium catenatum*

<b>Verdünnung Standard</b>	<b>Fläche</b>	<b>Konzentration [pg/μl]</b>
<b>1:20</b>	67950	61
<b>1:10</b>	130989	122
<b>1:5</b>	269110	244
<b>1:1</b>	658944	609

Tab. 18: Basisdaten der Regressionskurve in Abb. 13

<b>Gradient</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Flussrate [ml/min]</b>	<b>Anteil Eluent A1 [%]</b>	<b>Anteil Eluent B1 [%]</b>	<b>Verlauf</b>
1		0,400	2	98	
2	5,0	0,400	2	98	6
3	7,0	0,400	50	50	6
4	11,0	0,500	50	50	6
5	11,5	0,500	2	98	6
6	12,0	0,800	2	98	6
7	12,6	0,800	2	98	6
8	13,0	0,400	2	98	1

Tab. 19: Gradientenverlauf der Eluenten

**Positive Ionisierung ES+**

<b>Toxin</b>	<b>Mutterion (m/z)</b>	<b>Tochterion (m/z)</b>	<b>Kollisionsenergie (eV)</b>
dcSTX	257,1	126,1	19
dcSTX	257,1	239,1	16
dcNEO	273,1	126,1	20
dcNEO	273,1	225,1	20
STX	300,1	138,1	28
STX	300,1	204,1	23
NEO	316,1	298,1	18
NEO	316,1	220,1	23
dcGTX 3	353,1	255,1	18
dcGTX 4	369,1	271,1	18
GC3	377,2	257,2	30
GC3	377,2	359,2	20
GC3a	393,2	257,2	30
GC6	393,2	273,2	30
GC6/GC3a	393,2	375,2	20
C 2	396,1	298	20
GTX 3	396,1	298,1	17
B2	396,1	316,1	20
GC6a	409,2	273,2	30
GC6a	409,2	391,2	20
C 4	412,1	314	20
GTX 4, C3	412,1	314,1	18
C 3,4	412,1	332,1	16
GC3b	457,2	377,2	30
GC3b	457,2	359,2	20
GC1/2 / GC6b	473,2	393,2	30
GC1/2	473,2	455,2	30
GC1/2	473,2	375,2	20
GC4/5 / GC1a/2a	489,2	409,2	30
GC4/5, GC1a/2a	489,2	471,2	30
GC4a/GC5a	505,2	425,2	30
GC4a/GC5a	505,2	487,2	30



GC1b/2b	553,2	393,2	30
GC1b/2b	553,2	473,2	30
GC4b/5b	569,2	409,2	30
GC4b/5b	569,2	489,2	30

### Negative Ionisierung ES-

dcGTX 2	351,1	164	30
dcGTX 2	351,1	333,1	17
dcGTX 1,4	367,1	274,1	20
dcGTX 1,4	367,1	349,1	17
GTX 5	378,1	122	25
GTX 5	378,1	360,1	16
GTX6	394,1	122	25
GTX 2,3	394,1	333,1	22
GTX 2	394,1	351,1	16
GTX 1	410,1	349,1	22
GTX 1,4	410,1	367,1	15
C 1,2	474,1	122	30
C 1	474,1	351	25

Tab. 20: Massenübergänge der Toxine und entsprechende Kollisionsenergie.

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Dwell Time [s]	0,003	Collision Gas Flow [ml/min]	0,15
Cone Voltage [V] (ES+/-)	40 / 45	Source Temperature [°C]	150
Capillary Voltage [kV]	0,3	Run Time [min]	13
Desolvation Temperature [°C]	600	Pre-Injection Wash / Post-Injection Wash [s]	0 / 6
Desolvation Gas Flow [l/h]	1000	Sample Temperature [°C]	4
Cone Gas Flow [l/h]	150	Column Temperature [°C]	60
Nebulizer Gas Pressure [bar]	7,0	Purge Solvent	ACN:H2O 900:100
		Wash Solvent	ACN:H2O 750:300

Tab. 21: Einstellungen der Parameter am LCMS/MS

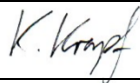
## Erklärung

Verfasser/in: Krapf, Karina

Betreuer/in: Rosenthal, Heidrun

Thema der Arbeit: Untersuchung der Epimerverhältnisse von PSP-Toxinen aus *Alexandrium catenella* und *Gymnodinium catenatum*

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst, noch nicht anderweitig zu Prüfungszwecken vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Bremerhaven	10.07.2018	
Ort	Datum	Unterschrift Verfasser

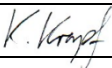
## Erklärung bzgl. der Zugänglichkeit von Diplom-/Bachelor-/Masterarbeiten

Verfasser/in (Name, Vorname): Krapf, Karina  
Betreuer/in (Name, Vorname): Rosenthal, Heidrun; Krock, Bernd (AWI)  
Thema der Arbeit: Untersuchung der Epimerverhältnisse von PSP-Toxinen aus *Alexandrium catenella* und *Gymnodinium catenatum*

Ich bin damit einverstanden, dass die von mir angefertigte Arbeit mit o.g. Titel innerhalb des Bibliothekssystems der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf aufgestellt und damit einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich gemacht wird. Die Arbeit darf im Bibliothekskatalog der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (und zugeordneten Verbundkatalogen) nachgewiesen werden und steht allen Nutzern der Bibliothek entsprechend den jeweils gültigen Nutzungsmodalitäten der Hochschulbibliothek der HSWT zur Verfügung. Ich bin mir auch darüber im Klaren, dass die Arbeit damit von Dritten ohne mein Wissen kopiert werden kann.

Die Veröffentlichung der Arbeit habe ich mit meinem Betreuer und falls zutreffend, mit der Firma/Institution abgesprochen, die eine Mitbetreuung übernommen hatte.

<input checked="" type="checkbox"/>	Ja
<input type="checkbox"/>	Ja, nach Ablauf einer Sperrfrist von ____ Jahren
<input type="checkbox"/>	Nein

Bremerhaven	10.07.2018	
Ort	Datum	Unterschrift Verfasser

### Fachgebiet:

#### Umweltsicherung

- Abfall
- Boden
- Wasser
- Analytik, Mikrobiologie
- Ökologie & Naturschutz
- Umwelttechnik, EDV
- Verwaltung, Recht, Wirtschaft
- Umweltmanagement
- Erneuerbare Energien

#### Landwirtschaft

- Pflanzliche Erzeugung
- Tierische Erzeugung
- Agrarökonomie
- Landtechnik
- Erneuerbare Energien
- Agrarökologie
- Vieh und Fleisch

#### Ernährung und Versorgungsmanagement

- Lebensmittelmanagement

#### Master:

- Energiemanagement und Energietechnik
- MBA Agrarmanagement
- MBA Regionalmanagement

Als Betreuer bin ich mit der Aufnahme in das Bibliothekssystem der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf einverstanden.

Ort	Datum	Unterschrift Betreuer